

POLITECHNIKA ŚLĄSKA

WYDZIAŁ CHEMICZNY

KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ, BIOORGANICZNEJ

I BIOTECHNOLOGII

**mgr inż. Agata Wawoczny**

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Chemoenzymatyczne przetwarzanie biomasy roślinnej  
z użyciem mieszanin głęboko eutektycznych**

Chemoenzymatic plant biomass processing  
with deep eutectic solvents

Promotor pracy: dr hab. inż. Danuta Gillner, prof. PŚ

Gliwice 2025

*W pierwszej kolejności pragnę podziękować mojej Promotor,  
dr hab. inż. Danucie Gillner, prof. PŚ,  
za wieloletnią współpracę, codzienne motywowanie do dalszego działania oraz wspaniałą  
atmosferę pracy. Dziękuję również za zaufanie, które pozwoliło mi rozwinąć skrzydła.*

*Składam serdeczne podziękowania dr hab. inż. Katarzynie Szymańskiej, prof. PŚ,  
dr hab. inż. Sylwii Bajkacz, prof. PŚ, dr hab. inż. Gabrieli Dudek, prof. PŚ,  
dr hab. inż. Katarzynie Krukiewicz, prof. PŚ oraz mgr inż. Joannie Wilk,  
za współpracę naukową oraz cenne wskazówki dotyczące prowadzonych badań.*

*Pragnę również podziękować prof. dr hab. inż. Beacie Orlińskiej,  
dr inż. Dawidowi Lisickiemu oraz dr inż. Kamilowi Peckhowi,  
za współpracę w rodzinnej atmosferze.*

*Dziękuję również moim Kolegom i Koleżankom z Wydziału Chemicznego, w szczególności  
mgr inż. Aleksandrze Lambarskiej, dr Alemu Maruf, mgr inż. Magdalenie Skawińskiej,  
mgr inż. Dominice Kozickiej, mgr inż. Julii Szreder, mgr inż. Katarzynie Dudzisz,  
mgr inż. Kindze Plasie oraz mgr inż. Aleksandrze Gulec,  
dzięki którym doktorat to była też świetna zabawa, a każdy dzień sprawiał mi wiele radości.*

*Dziękuję mojemu Mężowi Piotrowi,  
który jest najbardziej wyrozumiałym i cierpliwym człowiekiem na świecie.*

*Na koniec składam podziękowania mojej rodzinie - Rodzicom, Dziadkom oraz Bratu,  
którzy zawsze mi kibicowali i wspierali.*

## Spis treści

|                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Streszczenie rozprawy doktorskiej .....                                                                                                 | 5  |
| Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim .....                                                                             | 6  |
| Wykaz publikacji monotematycznych składających się na rozprawę doktorską .....                                                          | 7  |
| Spis skrótów .....                                                                                                                      | 8  |
| Cel pracy .....                                                                                                                         | 9  |
| Wprowadzenie literaturowe .....                                                                                                         | 11 |
| 1. Rozpuszczalniki głęboko eutektyczne .....                                                                                            | 11 |
| 1.1 Budowa rozpuszczalników głęboko eutektycznych .....                                                                                 | 11 |
| 1.2 Właściwości rozpuszczalników głęboko eutektycznych .....                                                                            | 12 |
| 1.3 Zastosowania rozpuszczalników głęboko eutektycznych .....                                                                           | 14 |
| 2. Biomasa lignocelulozowa .....                                                                                                        | 15 |
| 2.1 Budowa biomasy lignocelulozowej .....                                                                                               | 15 |
| 2.2 Metody przetwarzania biomasy lignocelulozowej .....                                                                                 | 15 |
| 2.3 Zastosowanie DESs w przetwarzaniu biomasy lignocelulozowej .....                                                                    | 16 |
| 2.3.1 Delignifikacja biomasy roślinnej z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych .....                                           | 17 |
| 2.3.2 Wpływ rodzaju rozpuszczalników głęboko eutektycznych na efektywność delignifikacji biomasy .....                                  | 18 |
| 2.3.3 Wpływ temperatury na efektywność delignifikacji biomasy .....                                                                     | 19 |
| 2.3.4 Recykł rozpuszczalników głęboko eutektycznych po delignifikacji biomasy .....                                                     | 20 |
| 2.4 Zastosowanie enzymów celulolitycznych w przetwarzaniu biomasy roślinnej .....                                                       | 20 |
| 3. Ekstrakcja związków bioaktywnych z biomasy roślinnej .....                                                                           | 21 |
| 3.1 Związki bioaktywne występujące w roślinach .....                                                                                    | 21 |
| 3.2 Zastosowanie rozpuszczalników głęboko eutektycznych w ekstrakcji związków bioaktywnych z biomasy roślinnej .....                    | 25 |
| 3.2.1 Wpływ rodzaju rozpuszczalnika głęboko eutektycznego na efektywność ekstrakcji .....                                               | 27 |
| 3.2.2 Wpływ warunków ekstrakcji z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych na wydajność wyizolowanych związków bioaktywnych ..... | 27 |
| 3.2.3 Recykł rozpuszczalników głęboko eutektycznych po ekstrakcji związków bioaktywnych .....                                           | 28 |
| 3.2.4 Przełączalne, hydrofobowe rozpuszczalniki głęboko eutektyczne .....                                                               | 28 |
| Omówienie wyników .....                                                                                                                 | 30 |

|       |                                                                                                                      |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.    | Delignifikacja biomasy roślinnej z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych.....                               | 30 |
| 5.    | Hydroliza enzymatyczna biomasy roślinnej po delignifikacji z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych .....    | 36 |
| 6.    | Wpływ cieczy jonowych i rozpuszczalników głęboko eutektycznych na aktywność enzymatyczną celulaz .....               | 38 |
| 7.    | Ekstrakcja związków bioaktywnych z materiału roślinnego z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych .....       | 42 |
| 7.1   | Ekstrakcja związków bioaktywnych z liści pomidora z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych.....              | 43 |
| 7.1.1 | Zastosowanie ekstraktów z liści pomidora w biodegradowalnych opakowaniach do żywności .....                          | 48 |
| 7.2   | Ekstrakcja związków bioaktywnych z kwiatu nagietka lekarskiego z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych..... | 49 |
| 7.2.1 | Selektywna ekstrakcja związków bioaktywnych z nagietka lekarskiego w podwójnym układzie DES-HDES.....                | 53 |
|       | Podsumowanie i wnioski .....                                                                                         | 57 |
|       | Całkowity dorobek naukowy .....                                                                                      | 60 |
|       | Literatura .....                                                                                                     | 66 |
|       | Spis tabel .....                                                                                                     | 84 |
|       | Spis rysunków .....                                                                                                  | 85 |
|       | Wkład autorski Doktorantki .....                                                                                     | 86 |
|       | Załącznik 1. Wkład autorski współautorów publikacji .....                                                            | 88 |
|       | Załącznik 2. Kopie publikacji wraz z materiałami dodatkowymi.....                                                    | 99 |

## Streszczenie rozprawy doktorskiej

Ze względu na konieczność ograniczenia zużycia paliw kopalnych, w przemyśle wzrasta zainteresowanie zastosowaniem surowców odnawialnych, do których zaliczana jest biomasa roślinna. Równocześnie zmieniają się technologie, w których zastępuje się toksyczne chemikalia ich bardziej ekologicznymi alternatywami. Przykładem są rozpuszczalniki głęboko eutektyczne (DESs), które mogą być zastosowane w procesach waloryzacji lignocelulozy. Celem przeprowadzonych badań było opracowanie metod przetwarzania biomasy roślinnej z użyciem DESs na drodze delignifikacji i następczej hydrolizy enzymatycznej oraz poprzez ekstrakcję substancji bioaktywnych.

Wybrane DESs zapewniły wysoki stopień delignifikacji biomasy, szczególnie w procesie prowadzonym w reaktorze koszykowym StatBioChem®, którego budowa umożliwia intensyfikację wymiany masy w procesie, a także ułatwia separację biomasy od rozpuszczalnika. Obróbka lignocelulozy pozwoliła na zwiększenie porowatości materiału, co skutkowało polepszeniem efektywności następczej hydrolizy enzymatycznej z użyciem celulaz. Wybrane DESs w większości wykazywały jednak dezaktywujący wpływ na stosowane biokatalizatory, co wskazuje na konieczność oczyszczania lignocelulozy z pozostałości rozpuszczalnika po procesie delignifikacji.

DESs okazały się również efektywnymi rozpuszczalnikami do ekstrakcji związków bioaktywnych, wydzielanych z liści pomidora i kwiatu nagietka lekarskiego (np. rutyny, kwasu chlorogenowego). Dodatkowo, wydajność izolowanych polifenoli była wyższa z użyciem DESs, w porównaniu z konwencjonalnymi rozpuszczalnikami organicznymi. Otrzymane ekstrakty z liści pomidora wykazywały właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz przeciwutleniające, co umożliwiło ich zastosowanie jako aktywnych składników biodegradowalnych opakowań chitozanowych, przedłużających świeżość produktów spożywczych. Ekstrakcję kwiatu nagietka przeprowadzono w podwójnym układzie ekstrakcyjnym, w którym równocześnie zastosowano dwa rozpuszczalniki DESs o charakterze hydrofilowym, jak i hydrofobowym. Umożliwiło to selektywne wydzielenie substancji bioaktywnych o różnych właściwościach.

## **Abstract of doctoral dissertation**

Due to the necessity to reduce the consumption of fossil fuels, there is a growing interest in the use of renewable raw materials in the industry, such as plant biomass. At the same time, technologies themselves are undergoing changes, replacing toxic chemicals with more ecological alternatives. An example is the application of deep eutectic solvents (DESs), which can be used in lignocellulose valorization processes. The aim of the conducted research was to develop methods for processing plant biomass using DESs through delignification and subsequent enzymatic hydrolysis as well as *via* the extraction of bioactive compounds.

Selected DESs provided a high degree of biomass delignification, particularly in processes carried out in the StatBioChem® basket reactor. Its design enables intensified mass transfer during the process and facilitates the separation of solid material from the solvent. The treatment of lignocellulose led to increased material porosity, which improved the efficiency of subsequent enzymatic hydrolysis using cellulases. However, most of the selected DESs showed a deactivating effect on the biocatalysts used, indicating the need to remove residual solvent from the lignocellulose after the delignification process.

DESs also proved to be effective solvents for the extraction of bioactive compounds from tomato leaves and calendula flowers (e.g., rutin, chlorogenic acid). Additionally, the yield of the extracted polyphenols was higher when using DESs compared to conventional organic solvents. Extracts obtained from tomato leaves showed antimicrobial and antioxidant properties, which allowed their use as active components in biodegradable chitosan-based packaging materials, extending the freshness of food products. The extraction of calendula flowers was carried out using a dual-solvent extraction system, which simultaneously employed two DESs, one hydrophilic and one hydrophobic. This allowed for the selective isolation of bioactive compounds, depending on the properties of extracted chemicals.

## Wykaz publikacji monotematycznych składających się na rozprawę doktorską

[P1] A. Wawoczny, D. Gillner. The most potent natural pharmaceuticals, cosmetics, and food ingredients isolated from plants with deep eutectic solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2023**, 71, 29, 10877–10900.

IF<sub>2023</sub> = 5,7; MNiSW<sub>2023</sub> = 140

[P2] A. Wawoczny, K. Szymańska, D. Gillner. Novel stationary basket reactor for effective biomass delignification with deep eutectic solvent. *Bioresource Technology* **2024**, 413, 131455.

IF<sub>2024</sub> = 9,7; MNiSW<sub>2024</sub> = 140

[P3] A. Wawoczny, M. Przypis, D. Gillner. Enzymatic valorization of lignocellulosic biomass - the influence of deep eutectic solvents and ionic liquids on the activity of cellulolytic enzymes. *Sustainability* **2023**, 15(24), 16726.

IF<sub>2023</sub> = 3,3; MNiSW<sub>2023</sub> = 100

[P4] A. Wawoczny, J. Wilk, D. Y. Shyntum, S. Shakibania, K. Krukiewicz, J. Gibas, M. Machulik, J. Płonka, S. Bajkacz, G. Dudek, D. Gillner. Valorization of waste tomato leaves with natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry* **2025**, 472, 142884.

IF<sub>2025</sub> = 8,5; MNiSW<sub>2025</sub> = 200

[P5] J. Jakubska, A. Wawoczny, D. Kluska, P. Grzybek, A. Hudecki, M. Kołodziej, K. Jasiak-Jaroń, A. Abdullah, D. Y. Shyntum, K. Gołombek, W. Pakieła, K. Krukiewicz, D. Gillner, G. Dudek. Dual functionality of deep eutectic solvents in chitosan-based biodegradable films for food packaging applications. *Industrial Crops and Products* **2025**, 232, 121268.

IF<sub>2025</sub> = 5,6; MNiSW<sub>2025</sub> = 200

[P6] A. Wawoczny, J. Wilk, S. Bajkacz, D. Gillner. Natural bioactive chemicals extracted from *Calendula officinalis* using efficient binary deep eutectic solvent system. *Journal of Molecular Liquids* **2025**, 433, 127929.

IF<sub>2025</sub> = 5,3; MNiSW<sub>2025</sub> = 100

## Spis skrótów

|             |                                                                                                |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ChCl        | Chlorek choliny                                                                                |
| Dec         | Dekan-1-ol                                                                                     |
| DecA        | Kwas dekanowy                                                                                  |
| DES         | Rozpuszczalnik głęboko eutektyczny (j. ang. <i>deep eutectic solvent</i> )                     |
| [emim][OAc] | Octan 1-etylo-3-metyloimidazoliowy                                                             |
| GEt         | Glikol etylenowy                                                                               |
| Glyc        | Gliceryna                                                                                      |
| HDES        | Hydrofobowy rozpuszczalnik głęboko eutektyczny                                                 |
| 5-HMF       | 5-hydroksymetylofurfural                                                                       |
| HPLC        | Wysokosprawna chromatografia cieczowa (j. ang. <i>high-performance liquid chromatography</i> ) |
| IL          | Ciecz jonowa (j. ang. <i>ionic liquid</i> )                                                    |
| LacA        | Kwas mlekowy                                                                                   |
| LauA        | Kwas laurynowy                                                                                 |
| LevA        | Kwas lewulinowy                                                                                |
| Ment        | DL-mentol                                                                                      |
| NADES       | Naturalne rozpuszczalniki głęboko eutektyczne (j. ang. <i>natural deep eutectic solvents</i> ) |
| Oct         | Oktan-1-ol                                                                                     |
| OctA        | Kwas oktanowy                                                                                  |
| SEM         | Skaningowy mikroskop elektronowy                                                               |
| SPE         | Ekstrakcja do fazy stałej (j. ang. <i>solid phase extraction</i> )                             |
| U           | Mocznik                                                                                        |

## Cel pracy

Wzrastająca świadomość ekologiczna oraz wprowadzane przez Unię Europejską normy i restrykcje dotyczące wykorzystania paliw kopalnych oraz materiałów nieulegających recyklingowi lub biodegradacji powodują wzrost zainteresowania zastosowaniem surowców odnawialnych, w tym odpadów roślinnych, w wielu gałęziach przemysłu. Biomasa stanowi jeden z najbardziej powszechnych surowców odnawialnych. Zgodnie z raportem UE z 2023 r., średnie roczne zasoby biomasy pochodzącej z rolnictwa i przemysłu drzewnego w całej UE wynoszą ok. 950 milionów ton, z czego 74% stanowią odpady przemysłu rolnego. Spośród krajów UE, największe ilości biomasy produkowane są we Francji, Niemczech i Polsce (ok. 86 milionów ton rocznie)<sup>1</sup>. Biomasę roślinną wykorzystuje się głównie do produkcji pasz zwierzęcych, biomateriałów oraz w celach energetycznych. Zgodnie z założeniami zielonej chemii i gospodarki obiegu zamkniętego, oprócz zwiększenia stopnia wykorzystania surowców odnawialnych, zmianie powinny ulec również same technologie, w celu redukcji negatywnego wpływu na środowisko naturalne. Opracowywane są nowe metody, w których konwencjonalne chemikalia zastępuje się ekologicznymi odpowiednikami, takimi jak rozpuszczalniki głęboko eutektyczne DESs (j. ang. *deep eutectic solvents*). Zainteresowanie ich wykorzystaniem stale wzrasta, ze względu na ich biodegradowalność, nietoksyczność, w większości pochodzenie ze źródeł naturalnych oraz szeroki zakres zastosowań, w tym w przetwarzaniu biomasy. DESs mogą stanowić ekologiczną alternatywę rozpuszczalników stosowanych zarówno na etapie obróbki wstępnej odpadów lignocelulozowych, jak i w procesach transformacji do produktów o dużej wartości dodanej (np. *fine chemicals*). Innym przykładem może być ich zastosowanie w procesach ekstrakcji związków bioaktywnych z materiału roślinnego.

Niniejsza rozprawa doktorska stanowi przewodnik po publikacjach monotematycznych. Celem pracy było opracowanie efektywnych metod waloryzacji biomasy lignocelulozowej z użyciem ekologicznych rozpuszczalników i katalizatorów. Główną uwagę skupiono na zastosowaniu rozpuszczalników głęboko eutektycznych (DESs) oraz enzymów z klasy celulaz w procesach przetwarzania biomasy roślinnej, czy też w procesach izolacji bioaktywnych składników z tego typu surowców. Wykonano również przegląd najnowszej literatury (dotyczący związków bioaktywnych występujących w roślinach oraz ich ekstrakcji

za pomocą DESs), który przedstawiony został w publikacji [P1]. Szczegółowe cele niniejszej pracy można podzielić na dwa główne punkty:

1. Zastosowanie DESs w obróbce wstępnej i enzymatycznym przetwarzaniu lignocelulozy pochodzącej z biomasy roślinnej, obejmujące:

- Ewaluację efektywności wybranych DESs w procesie obróbki wstępnej biomasy (delignifikacji) [P2].
- Określenie wpływu warunków prowadzenia procesu delignifikacji biomasy (temperatury, czasu, stosunku masy lignocelulozy do ilości rozpuszczalnika) oraz użytego układu reakcyjnego na efektywność wydzielania ligniny z użyciem DESs [P2].
- Ocenę wpływu delignifikacji lignocelulozy na jej późniejszą hydrolizę enzymatyczną do cukrów prostych [P2, P3].
- Określenie wpływu wybranych DESs i cieczy jonowych (ILs) na aktywność enzymatyczną enzymów celulolitycznych, stosowanych w procesie konwersji lignocelulozy do monosacharydów (szczególnie glukozy) [P3].

2. Zastosowanie DESs w izolacji substancji bioaktywnych z biomasy roślinnej, obejmujące:

- Określenie efektywności wytypowanych DESs jako rozpuszczalników w ekstrakcji związków bioaktywnych (głównie związków fenolowych oraz flawonoidów) z wybranych materiałów roślinnych oraz porównanie z konwencjonalnymi rozpuszczalnikami [P4, P6].
- Określenie wpływu parametrów ekstrakcji (temperatury, czasu, stosunku masy lignocelulozy do ilości rozpuszczalnika) na wydajność izolowanych związków [P4, P6].
- Określenie właściwości przeciwdrobnoustrojowych oraz przeciwutleniających przygotowanych ekstraktów roślinnych [P4].
- Zastosowanie otrzymanych ekstraktów roślinnych jako składników aktywnych w foliach chitozanowych, stosowanych jako biodegradowalne opakowania do żywności [P5].
- Zaprojektowanie systemu rozpuszczalników DESs, pozwalającego na selektywne wydzielenie związków aktywnych o różnej hydrofilowości [P6].
- Opracowanie metody odzysku DESs po procesie delignifikacji oraz ekstrakcji i zastosowanie rozpuszczalnika w kolejnych cyklach ekstrakcji [P2, P4, P6].

## Wprowadzenie literaturowe

### 1. Rozpuszczalniki głęboko eutektyczne

Nazwa *ropuszczalniki głęboko eutektyczne* została po raz pierwszy wprowadzona w 2003 roku w publikacji przedstawionej przez zespół A. P. Abbotta<sup>2</sup>. Są to mieszaniny dwóch lub kilku składników, tworzących jednorodny układ, stabilny w temperaturze pokojowej. Określenie rozpuszczalniki *głęboko eutektyczne* odnosi się do mieszanin, dla których na wykresie fazowym obserwujemy wyraźne obniżenie temperatury topnienia wyznaczonego eksperymentalnie punktu eutektycznego mieszaniny, w porównaniu do przewidywanego punktu, wyznaczonego metodami matematycznymi (często nazywanego punktem idealnej mieszaniny eutektycznej)<sup>3</sup>. Rozpuszczalniki głęboko eutektyczne (DESs) można podzielić na pięć głównych typów, ze względu na zastosowane związki chemiczne, z których składa się mieszanina<sup>4,5</sup>. W dalszej części pracy skupiono się na typach III i V rozpuszczalników, z uwagi na ich wykorzystanie w części badawczej.

#### 1.1 Budowa rozpuszczalników głęboko eutektycznych

Struktura DESs typu III opiera się głównie na oddziaływaniach niekowalencyjnych pomiędzy składnikami, spośród których najbardziej istotne są wiązania wodorowe<sup>6</sup>. Składniki DESs najczęściej dzieli się na akceptory (j. ang. *hydrogen bond acceptor* – HBA) i donory wiązań wodorowych (j. ang. *hydrogen bond donor* – HBD). Do najczęściej stosowanych HBA zalicza się chlorek choliny, betainę, octan choliny oraz bromek tetrabutylamoniowy. W przypadku HBD, grupa możliwych do wykorzystania substancji jest znacznie obszerniejsza – są to kwasy karboksylowe (np. kwas mlekowy, kwas lewulinowy, kwas jabłkowy), polialkohole (np. gliceryna, glikol etylenowy), cukry (np. glukoza, fruktoza) oraz inne związki, mogące tworzyć wiązania wodorowe z HBA (np. mocznik). W zależności od budowy HBA i HBD, w DESs występują również oddziaływania elektrostatyczne, oddziaływania  $\pi$ - $\pi$ , które także wpływają na stabilność rozpuszczalnika<sup>7</sup>. W najnowszych doniesieniach literaturowych coraz więcej uwagi poświęca się hydrofobowym HDESs typu V (j. ang. *hydrophobic deep eutectic solvents*), do utworzenia których najczęściej stosuje się mentol, tymol, alkohole długołańcuchowe (np. oktan-1-ol, dekan-1-ol) oraz kwasy tłuszczowe (np. kwas laurynowy, kwas oktanowy, kwas dekanowy). W tego typu HDESs, żaden ze związków będących składnikami rozpuszczalnika nie występuje w formie jonowej,

a mieszanina nie jest stabilizowana przez oddziaływania elektrostatyczne<sup>8</sup>. Ich główną cechą, odróżniającą od pozostałych rodzajów DESs, jest hydrofobowy charakter, dzięki czemu możliwe jest utworzenie układu dwóch niemieszających się faz, w przypadku procesów prowadzonych w środowisku wodnym (np. oczyszczanie wód z zanieczyszczeń organicznych)<sup>9,10</sup>.

## 1.2 Właściwości rozpuszczalników głęboko eutektycznych

Właściwości fizykochemiczne DESs mogą znacznie różnić się w zależności od związków tworzących dany rozpuszczalnik. Można jednak stwierdzić, że wspólną cechą wszystkich DESs jest ich niska lotność, co jest dużą zaletą z punktu widzenia ekologii oraz bezpieczeństwa pracy, natomiast stanowi wyzwanie w procesach ich odzyskiwania<sup>11</sup>. Właściwością, która ma istotny wpływ na przebieg procesów, w których stosuje się te rozpuszczalniki, jest ich lepkość. Zależy ona w głównej mierze od rodzaju HBD w rozpuszczalniku<sup>12</sup>. DESs zbudowane z kwasów karboksylowych mają wyższą lepkość, niż te zawierające polialkohole (np. glicerynę, glikol etylenowy). Przykładowo, lepkość DES zbudowanego z chlorku choliny i gliceryny (1:1 mol/mol) wynosi 301 mPa·s, natomiast w przypadku zastąpienia gliceryny kwasem mlekowym, lepkość rozpuszczalnika wzrasta do 3230 mPa·s<sup>12</sup>. Ponadto, jeżeli użyty do otrzymania DES kwas karboksylowy zawiera kilka grup karboksylowych (np. kwas szczawiowy, kwas malonowy, kwas cytrynowy), lepkość rozpuszczalnika wzrasta jeszcze bardziej (np. lepkość DES zbudowanego z chlorku choliny i kwasu cytrynowego w stosunku molowym 1:1 mol/mol wynosi ponad 14 tys. mPa·s)<sup>12,13</sup>. Podobny efekt obserwuje się wraz z wydłużeniem łańcucha węglowego w cząsteczce HBD<sup>14</sup>. Problem wysokiej lepkości wybranych DESs może zostać rozwiązany poprzez dodatek wody do rozpuszczalnika, co jest powszechnie stosowane w procesach ekstrakcji związków bioaktywnych z roślin<sup>15</sup>. Dodatek wody nie powinien przekroczyć 40-50% objętości DES, ze względu na możliwość zniszczenia struktury rozpuszczalnika, opierającej się na oddziaływaniach wodorowych i utratę jego właściwości jako medium ekstrakcyjnego<sup>16</sup>. Kolejnym sposobem obniżenia lepkości DESs jest prowadzenie procesów w podwyższonej temperaturze. Większość DESs wykazuje stabilność termiczną (do około 190°C), zależnie od rodzaju HBA i HBD<sup>17</sup>. Najmniej stabilnym rozpuszczalnikiem, spośród najczęściej opisywanych w literaturze, jest ten zawierający kwas malonowy jako HBD, który w relatywnie niskiej temperaturze (80°C) ulega rozkładowi do kwasu octowego<sup>18</sup>. Należy podkreślić, że omawiane w niniejszej pracy procesy

przetwarzania biomasy są zazwyczaj prowadzone w podwyższonej temperaturze, co powoduje znaczne obniżenie lepkości rozpuszczalników, często do wartości zbliżonych do lepkości wody<sup>19</sup>.

W przypadku HDESs, lepkość nie wpływa znacząco na przebieg procesów z zastosowaniem tych rozpuszczalników. Przykładowo, w temperaturze pokojowej HDESs zbudowane z tymolu i wybranych kwasów tłuszczowych charakteryzują się lepkością od 3 do 26 mPa·s (np. dla kwasu oktanowego 3,2 mPa·s, dla kwasu undecylenowego 25,8 mPa·s)<sup>20</sup>.

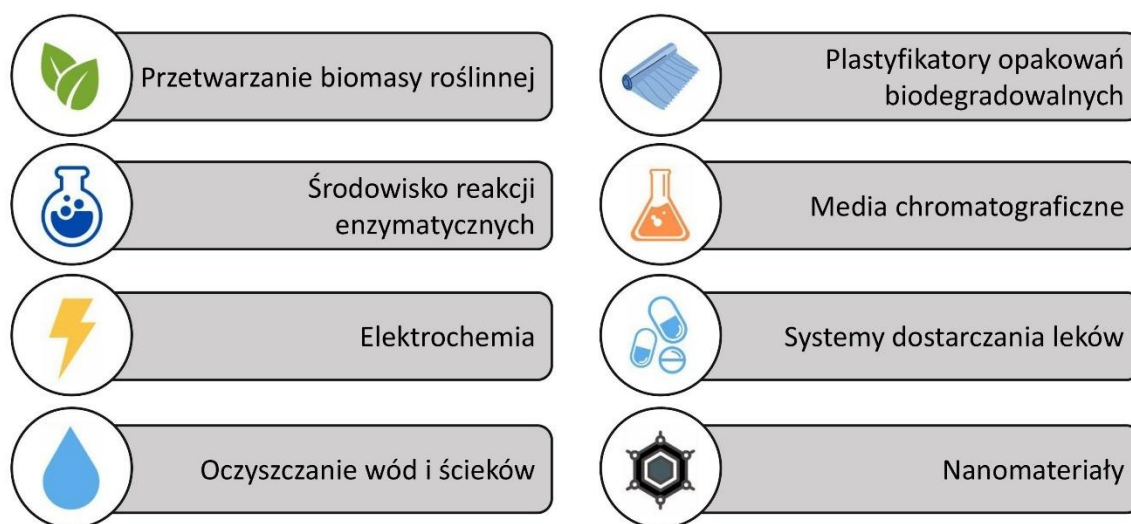
DESs i HDESs zaliczane są do rozpuszczalników alternatywnych, które mają niewielki wpływ na środowisko, dlatego cały czas zwiększa się zainteresowanie ich wykorzystaniem na skalę przemysłową. Rozpuszczalniki te otrzymywane są często z substancji naturalnych, które zazwyczaj mają stosunkowo niską cenę i są łatwo dostępne (ta grupa DESs jest często nazywana NADESs – z j. ang. *natural deep eutectic solvents*)<sup>21</sup>. Należy podkreślić, że większość z nich jest biodegradowalna (np. DES zbudowany z chlorku choliny i mocznika ulega biodegradacji w około 90% po upływie 28 dni)<sup>22</sup>, co dodatkowo zwiększa ich konkurencyjność wobec tradycyjnych związków chemicznych stosowanych w przemyśle<sup>23</sup>. W przypadku HDESs, badania nad biodegradowalnością nie zostały jeszcze przeprowadzone, jednakże można przewidywać, że biodegradowalność składników użytych do otrzymania rozpuszczalników (np. kwas dekanowy, mentol, tymol) wpłynie korzystnie na zdolność degradacji całej mieszaniny. Wątpliwości może budzić toksyczność DESs wobec mikroorganizmów i organizmów wodnych. Ilość przeprowadzonych dotychczas badań jest niewystarczająca, aby całkowicie wykluczyć toksyczność tych rozpuszczalników. W wybranych doniesieniach literaturowych wskazuje się, że DESs nie mają wpływu lub w niewielkim stopniu wpływają na organizmy wodne (algi, bakterie, wybrane gatunki ryb)<sup>24–26</sup>. Przykładowo, w badaniach wpływu DESs na karpie (*Cyprinus carpio*), wartości LC<sub>50</sub> dla rozpuszczalników zbudowanych z chlorku choliny i glikolu etylenowego, gliceryny lub mocznika wynosiły powyżej 4000 mg/L, co klasyfikuje te DESs jako substancje nieszkodliwe<sup>27</sup>. Niektóre doniesienia literaturowe opisują przeciwstawne wyniki badań, w których wykazano toksyczność DESs względem organizmów wodnych, np. artemii (tzw. słonaczka, *Artemia salina*), gdzie obecność DESs (zbudowanych z chlorku choliny jako HBA i gliceryny, mocznika lub glikolu etylenowego jako HBD) powodowała śmierć larw. Autorzy badań zasugerowali jednak, że może to być spowodowane innymi czynnikami – brakiem tlenu i wysoką lepkością rozpuszczalnika<sup>28</sup>.

Należy podkreślić, że toksyczność DESs w środowisku wodnym (wobec organizmów żyjących w wodzie) powinna być rozpatrywana względem oddzielnych związków budujących rozpuszczalnik oraz ich potencjalnego synergicznego działania, ze względu na rozpad struktury DES, opierającej się głównie na wiązaniach wodorowych, w tych warunkach. Badania nad toksycznością DESs mają na celu sprawdzenie ich wpływu w momencie przedostania się do zbiorników wodnych. Konieczne jest więc przeprowadzenie takich badań w warunkach imitujących środowisko naturalne, gdzie występowałyby w niskim stężeniu. Toksyczność HDESs wobec organizmów wodnych nie została jeszcze zbadana.

Badania cytotoksyczności DESs wobec bakterii chorobotwórczych (np. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*) wykazały, że mogą one hamować wzrost mikroorganizmów, szczególnie jeśli zawierają w swojej budowie kwasy karboksylowe jako HBD<sup>29,30</sup>. Działanie takie sprawia, że DESs mogą zostać potencjalnie zastosowane jako składniki środków przeciwbakteryjnych.

### 1.3 Zastosowania rozpuszczalników głęboko eutektycznych

Jak już wspomniano, zainteresowanie DESs i HDESs stale wzrasta, ze względu na właściwości jakie posiadają oraz możliwość ich regulacji poprzez zmianę składników mieszaniny. Rysunek 1 przedstawia dziedziny, w których udokumentowano wykorzystanie DESs lub HDESs.



**Rysunek 1.** Wybrane zastosowania DESs i HDESs<sup>31–35</sup>.

## 2. Biomasa lignocelulozowa

Biomasa roślinna stanowi jeden z najbardziej powszechnych, a zarazem najmniej wykorzystanych surowców odnawialnych. Może być wykorzystana w wielu procesach, zarówno jako źródło energii, jak i cennych związków chemicznych.

### 2.1 Budowa biomasy lignocelulozowej

Głównymi składnikami biomasy lignocelulozowej są 3 polimery: celuloza, lignina oraz hemicelulozy. W zależności od gatunku rośliny, warunków jej uprawy oraz klimatu, procentowa zawartość poszczególnych frakcji może się znacząco różnić. Tabela 1 przedstawia zestawienie przykładowych rodzajów biomasy, wraz z oznaczoną zawartością głównych polimerów. Oprócz głównych komponentów, w materiałach roślinnych występują również białka, składniki mineralne (np. krzemionki), woski, chlorofil i inne barwniki (np. karoteny), a także związki biologicznie aktywne<sup>36</sup>.

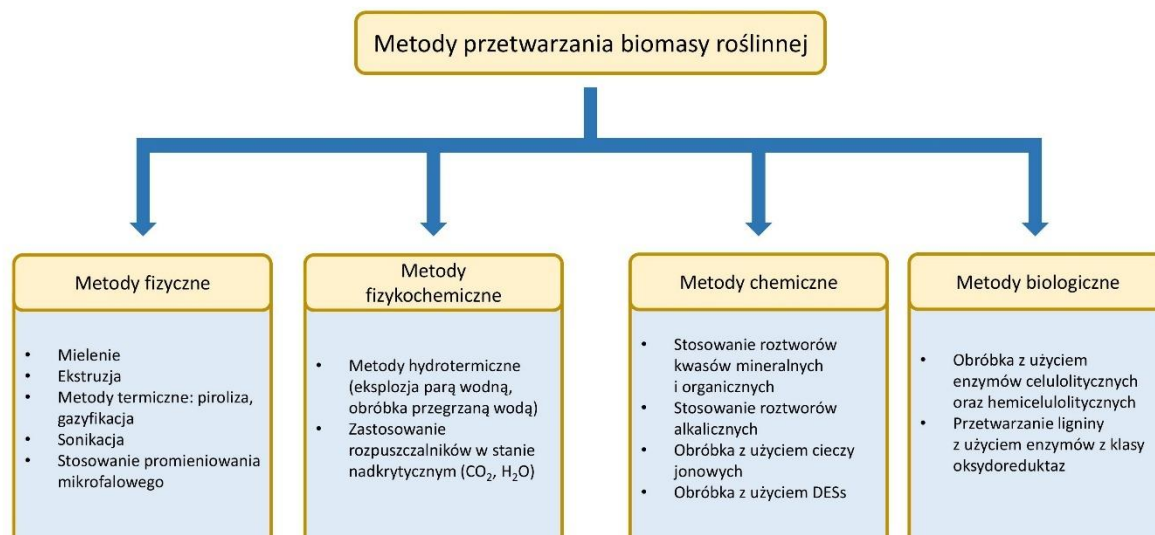
**Tabela 1.** Procentowa zawartość celulozy, ligniny oraz hemiceluloz w wybranych rodzajach biomasy roślinnej.

| Rodzaj biomasy              | Zawartość frakcji [%] |         |              | Lit. |
|-----------------------------|-----------------------|---------|--------------|------|
|                             | Celuloza              | Lignina | Hemicelulozy |      |
| Słoma z pszenicy            | 52,4                  | 18,8    | 18,2         | 37   |
|                             | 36,8                  | 23,6    | 25,0         | 38   |
| Drewno bambusowe            | 35,9                  | 29,7    | 34,4         | 39   |
| Miskant                     | 45,3                  | 13,0    | 23,4         | 40   |
| Drzewo brzozy               | 54,2                  | 11,1    | 28,1         |      |
| Łupiny orzecha włoskiego    | 12,0                  | 24,0    | 44,0         | 41   |
| Wysłodki z trzciny cukrowej | 37,2                  | 26,5    | 22,1         | 42   |
| Słoma ryżowa                | 45,7                  | 22,5    | 19,6         | 43   |

### 2.2 Metody przetwarzania biomasy lignocelulozowej

Obserwowany obecnie trend zagospodarowania jak największej ilości odpadów roślinnych, produkowanych głównie przez przemysł rolniczy i leśny, sprawia, że stale poszukuje się nowych, efektywnych i ekologicznych metod przetwarzania biomasy. Przeróbka lignocelulozy do produktów o dużej wartości dodanej często poprzedzona jest tzw. obróbką wstępną, która ma na celu rozbicie zwartej struktury materiału oraz odsłonięcie włókien celulozowych. Często obróbka wstępna połączona jest z kolejnymi transformacjami, w celu ograniczenia liczby etapów procesu. Innym podziałem metod przetwarzania biomasy jest

podział ze względu na stosowany czynnik – są to metody fizyczne, fizykochemiczne, chemiczne oraz biologiczne. Przykładowe metody obróbki lignocelulozy zostały przedstawione na Rysunku 2.



**Rysunek 2.** Wybrane metody obróbki biomasy lignocelulozowej<sup>44–53</sup>.

### 2.3 Zastosowanie DESs w przetwarzaniu biomasy lignocelulozowej

Zainteresowanie zastosowaniem DESs w waloryzacji biomasy stale wzrasta. Dzięki temu, że poprzez zmianę składu można regulować ich właściwości, możliwe jest uzyskanie zaplanowanego efektu waloryzacji tego surowca. W literaturze można spotkać również liczne doniesienia dotyczące przetwarzania lignocelulozy z użyciem cieczy jonowych (ILs), jednak badania wykazały, że DESs są mniej toksyczne, niż tradycyjne ILs<sup>51</sup>. Na podstawie przeglądu literaturowego można wnioskować, że DESs najczęściej stosowane są w procesach delignifikacji biomasy oraz ekstrakcji związków bioaktywnych z materiału roślinnego. Istnieją również nieliczne doniesienia dotyczące zastosowania kwasowych DESs jako katalizatorów i rozpuszczalników w procesach konwersji polisacharydów roślinnych do furfuralu, 5-HMF oraz kwasu lewulinowego (częściej opisywane są jednak kwasowe ILs)<sup>54–56</sup>. Należy jednak podkreślić, że informacje dotyczące efektywności DESs w tych procesach oraz ich opłacalności są wciąż ograniczone.

Wysoka zawartość ligniny w materiale roślinnym może negatywnie wpływać na przetwarzanie celulozy i hemiceluloz do docelowych produktów (np. cukrów, kwasu lewulinowego, furfuralu, 5-HMF). W przypadku procesów biokatalitycznych, mających na celu przetworzenie polisacharydów (np. hydroliza celulozy i hemiceluloz do monosacharydów),

stosowane enzymy mogą wchodzić w interakcje z obecną w materiale ligniną (głównie przez wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe i elektrostatyczne), co obniża efektywność procesu<sup>57</sup>. Dodatkowo, lignina może stanowić fizyczną barierę ograniczającą dostęp biokatalizatorów do polisacharydów<sup>58</sup>. Z tego powodu, usunięcie części ligniny jest jedną z istotnych metod obróbki biomasy, zwiększającą efektywność jej późniejszych transformacji. Warto dodać, że pozyskiwana lignina również może znaleźć zastosowanie w przemyśle. Tradycyjną metodą delignifikacji biomasy jest obróbka alkaliczna, powszechnie stosowana w przemyśle papierniczym. Technologia ta wykorzystuje roztwory siarczku sodu oraz wodorotlenku sodu w celu oczyszczenia celulozy z pozostałości – mieszaniny ligniny, wosków oraz barwników - określanej jako czarny ług (j. ang. *black liquor*). Wadami tego procesu są zastosowanie szkodliwych chemikaliów zanieczyszczających środowisko, wysokie temperatury prowadzenia procesu (100-180°C) oraz otrzymywanie zanieczyszczonej ligniny<sup>59</sup>. W efekcie otrzymywana frakcja czarnego ługu traktowana jest jako odpad.

### 2.3.1 Delignifikacja biomasy roślinnej z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych

Alternatywą metod konwencjonalnych może być wykorzystanie takich DESs, które są dobrymi rozpuszczalnikami ligniny. Przykładowe uzyskane stopnie delignifikacji biomasy przedstawione zostały w Tabeli 2.

**Tabela 2.** Stopień delignifikacji biomasy, zależny od rodzaju lignocelulozy, DESs, temperatury oraz czasu.

| Rodzaj biomasy           | DES                                  | Stosunek molowy HBA:HBD | Temperatura [°C] | Czas [h] | Stopień delignifikacji [%] | Lit.          |
|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------|------------------|----------|----------------------------|---------------|
| Bambus                   | ChCl:Kwas szczawiowy                 | 1:1                     | 120              | 4        | ~90                        | <sup>60</sup> |
| Miskant                  | ChCl:Kwas mrówkowy                   | 1:2                     | 130              | 1        | 82                         | <sup>40</sup> |
| Topola (drewno)          | ChCl:Kwas mlekowy                    | 1:10                    | 120              | 12       | 90                         | <sup>61</sup> |
| Łuski ryżowe             | Glikol etylenowy:<br>Kwas cytrynowy  | 1:1                     | 90               | 4        | 15                         | <sup>62</sup> |
|                          |                                      |                         | 120              |          | 57                         |               |
| Słoma z pszenicy         | ChCl:Kwas <i>p</i> -toluenosulfonowy | 1:2                     | Tp               | 6        | 64                         | <sup>63</sup> |
| Łupiny orzecha włoskiego | ChCl:Kwas mrówkowy                   | 1:2                     | 60               | 8        | 20                         | <sup>64</sup> |

ChCl – chlorek choliny, Tp – temperatura pokojowa

Wpływ poszczególnych parametrów na stopień delignifikacji biomasy zostanie omówiony w poszczególnych podrozdziałach.

### 2.3.2 Wpływ rodzaju rozpuszczalników głęboko eutektycznych na efektywność delignifikacji biomasy

W procesie delignifikacji biomasy najczęściej stosowane są DESs typu III, w których HBA jest chlorek choliny, natomiast jako HBD używane są kwasy organiczne lub glikole. W większości doniesień literaturowych wskazuje się, że kwasowe HBD zapewniają wyższy stopień delignifikacji. Takie działanie wynika z proponowanego mechanizmu delignifikacji biomasy, który zakłada, że w środowisku DESs z kwasowym HBD następuje zerwanie eterowych wiązań obecnych w strukturze ligniny, jak również wiązań glikozydowych występujących pomiędzy łańcuchami hemiceluloz, co prowadzi do częściowej depolimeryzacji oraz rozluźnienia struktury lignocelulozy<sup>65,66</sup>. Efektem tego jest nie tylko ekstrakcja ligniny, ale również częściowe usunięcie hemiceluloz z materiału roślinnego<sup>67</sup>. Aktywność DESs w tym przypadku jest związana nie tylko z kwasowym charakterem HBD, ale również strukturą chemiczną stosowanego kwasu organicznego. Wśród opublikowanych doniesień literaturowych, porównujących wpływ HBD na stopień delignifikacji biomasy, najbardziej skutecznym okazał się kwas mlekowy. Grupa hydroksylowa występująca w tym kwasie jest potencjalnym miejscem utworzenia wiązania wodorowego z grupami funkcyjnymi ligniny, co wpływa na polepszenie efektywności delignifikacji z tego rodzaju HBD<sup>68</sup>. Użycie kwasów di- i tri- karboksylowych, takich jak kwas szczawiowy, kwas malonowy lub kwas cytrynowy, powoduje obniżenie wydajności izolowanej ligniny, ponieważ obecność dodatkowych grup karboksylowych zwiększa ilość wiązań wodorowych tworzonych pomiędzy cząsteczkami HBD, a także pomiędzy HBD oraz HBA, co obniża mobilność tworzonych cząstek DES. Efektem tego jest ograniczone oddziaływanie pomiędzy rozpuszczalnikiem, a lignocelulozą<sup>69,70</sup>.

Wpływ HBA na stopień delignifikacji biomasy jest opisany w niewielu doniesieniach literaturowych. Najczęściej wybieranym HBA jest chlorek choliny. DES zawierający chlorek choliny zapewnia uzyskanie wysokiego stopnia usunięcia ligniny, co związane jest z kolejnym elementem mechanizmu delignifikacji. Oprócz zerwania wiązań istniejących w lignocelulozie w wyniku oddziaływania z kwasowym HBD, tworzone są wiązania wodorowe pomiędzy jonem chlorkowym w HBA, a grupami hydroksylowymi ligniny, co dodatkowo powoduje rozluźnienie struktury lignocelulozy<sup>65</sup>. Znaczenie jonu chlorkowego zostało zbadane przez Smink'a i in.,

którzy przeanalizowali wpływ anionu w HBA na efektywność przetwarzania drewna eukaliptusowego. Spośród wybranych anionów, użycie anionów halogenowych ( $\text{Cl}^-$  oraz  $\text{Br}^-$ ) pozwoliło na uzyskanie wysokiego stopnia delignifikacji materiału, niezależnie od zastosowanego kationu<sup>71</sup>. Wpływ jonu chlorkowego zaobserwowano również w delignifikacji drewna eukaliptusowego, przeprowadzonej z wykorzystaniem DESs, w których jako HBD zastosowano kwas mlekowy, natomiast jako HBA użyto betainę lub chlorowoderek betainy. W przypadku procesu w 120°C z DES zawierającym chlorowoderek betainy, stopień delignifikacji biomasy wynosił ok. 70%, a z użyciem betainy jako HBA tylko 40%<sup>72</sup>.

Ilość publikacji naukowych dotyczących zastosowania betainy w DESs w procesie wydzielania ligniny jest niewielka, a przedstawiane wyniki badań nie prowadzą do jednoznacznych wniosków. Przykładowo, DES zbudowany z betainy i kwasu mlekowego, w stosunku molowym 1:2 (mol/mol), umożliwił wydzielenie 81,6% ligniny z materiału pozostałego po wydzieleniu ksylozy z kolb kukurydzy, w temperaturze 120°C<sup>73</sup>. W innym eksperymencie przeprowadzonym w 155°C, ten sam DES okazał się mniej efektywny w procesie obróbki łusek ryżowych (stopień delignifikacji 6%), niż jego odpowiednik zawierający chlorek choliny (stopień delignifikacji 13%)<sup>74</sup>. W przedstawianych badaniach często stosowany jest różny stosunek molowy HBA do HBD oraz inna temperatura procesu, co może mieć znaczący wpływ na stopień delignifikacji biomasy i uniemożliwia porównywanie wyników ze sobą.

### 2.3.3 Wpływ temperatury na efektywność delignifikacji biomasy

Temperatura procesu delignifikacji biomasy ma bardzo istotny wpływ na jego efektywność, szczególnie, jeżeli jest prowadzony z udziałem DESs. Rozpuszczalniki te mają wysoką lepkość, co może ograniczać wymianę masy, dlatego zalecane jest prowadzenie wydzielania ligniny w podwyższonej temperaturze (najczęściej od 80 do 150°C, w zależności od przetwarzanego surowca lignocelulozowego)<sup>65,75</sup>. Ponadto, w wysokiej temperaturze rozpad wiązań eterowych, występujących w strukturze ligniny oraz pomiędzy ligniną i łańcuchami hemiceluloz, zachodzi łatwiej, co pozytywnie wpływa na efektywność izolacji polimeru<sup>76</sup>. Jednakże, przekroczenie optymalnej temperatury procesu może skutkować degradacją ligniny<sup>77</sup>. Dodatkowo, jeżeli delignifikacja prowadzona jest w środowisku kwasowych DESs, w wysokiej temperaturze może dochodzić do powstawania humin

(produktów polimeryzacji furfuralu i jego pochodnych), co niekorzystnie wpływa na efektywność procesu<sup>78</sup>.

#### 2.3.4 Recykling rozpuszczalników głęboko eutektycznych po delignifikacji biomasy

Etapem, który przysparza największych trudności w procesach delignifikacji biomasy, jest odzysk DES oraz jego ponowne użycie, z zachowaniem wysokiej wydajności izolowanej ligniny. Ze względu na niską prężność par DESs, niemożliwy jest ich recykling poprzez destylację, stąd konieczne jest przeprowadzenie odzysku rozpuszczalnika w kilkietapowym procesie. Najczęściej stosowaną metodą jest dodatek takiej ilości przeciwrozpuszczalnika (wody, acetonu, etanolu lub metanolu), aby osłabić, a nawet zerwać wiązania wodorowe pomiędzy składnikami DES, co skutkuje wytrąceniem wysokocząsteczkowej ligniny z roztworu<sup>79</sup>. Sposób ten pozwala na użycie prostych technik laboratoryjnych – filtracji stałych pozostałości oraz odparowania przeciwrozpuszczalnika z roztworu DES. Należy również zwrócić uwagę na to, że w trakcie delignifikacji biomasy za pomocą DES, ekstrahowane mogą być inne substancje obecne w materiale roślinnym (np. polifenole, chlorofile, karotenoidy, substancje woskowe). Dodatkowo, w podwyższonej temperaturze, w kwasowym środowisku może dojść do częściowej degradacji ligniny i hemiceluloz do niskocząsteczkowych związków, które również będą obecne w rozpuszczalniku. Związki te nie mogą zostać oddzielone od DES poprzez dodatek przeciwrozpuszczalnika, ponieważ metoda ta pozwala na wytrącenie tylko wysokocząsteczkowych substancji<sup>75</sup>. Z tego powodu, po wydzieleniu ligniny z DES, rozpuszczalnik nadal jest zanieczyszczony małowcząsteczkowymi związkami, co po kilku recykloch DES może obniżać jego efektywność. Konieczne jest oczyszczanie DES poprzez ekstrakcję ciecz-ciecz (najczęściej z użyciem octanu etylu lub butan-1-olu), ekstrakcję do fazy stałej, za pomocą chromatografii kolumnowej lub oczyszczania za pomocą membran, jednakże metody te stosowane są w badaniach prowadzonych na skalę laboratoryjną<sup>79–81</sup>.

#### 2.4 Zastosowanie enzymów celulolitycznych w przetwarzaniu biomasy roślinnej

Przetwarzanie biomasy lignocelulozowej do użytecznych związków może być również prowadzone z zastosowaniem biokatalizatorów, wśród których najczęściej stosowane są enzymy z grupy hydrolaz i oksydoreduktaz (np. celulazy, hemicelulazy, lakazy). Hydrolizę wiązań glikozydowych w celulozie katalizują m.in. celulazy, endoglukanazy oraz  $\beta$ -glukozydazy. W przypadku hemicelulaz, najczęściej stosowane są ksylanazy, które również katalizują hydrolizę wiązań  $\beta$ -1,4-glikozydowych, jednakże w łańcuchu zbudowanym z jednostek ksylozy.

W celu intensyfikacji przetwarzania lignocelulozy na drodze enzymatycznej, najczęściej stosuje się preparaty składające się z kilku enzymów<sup>82</sup>. Procesy te prowadzone są w łagodnych warunkach, produkty otrzymywane są z wysoką selektywnością, a w wielu przypadkach możliwy jest również recykł biokatalizatorów (np. w przypadku katalizatorów immobilizowanych). Jak już wspomniano wcześniej, ze względu na złożoną strukturę lignocelulozy, m.in. wysoki stopień krystaliczności celulozy oraz obecność ligniny, konieczne jest przeprowadzenie obróbki wstępnej materiału, przed procesami biotransformacji jego składników.

### 3. Ekstrakcja związków bioaktywnych z biomasy roślinnej

Jednym z bardzo ważnych zastosowań DESs w dziedzinie waloryzacji biomasy roślinnej jest izolacja związków bioaktywnych występujących w roślinach. Pomimo, że właściwości lecznicze różnych roślin (np. działanie przeciwdrobnoustrojowe, antyoksydacyjne czy przeciwnowotworowe) znane były od czasów starożytnych, zainteresowanie przemysłu kosmetycznego czy farmaceutycznego konkretnymi substancjami bioaktywnymi pochodzenia naturalnego, w szczególności roślinnego, stale wzrasta. Opracowywane są wciąż nowe, bardziej ekologiczne i wydajne metody pozyskiwania tego typu związków z roślin. Najczęściej stosowane są różne metody ekstrakcji, z użyciem rozpuszczalników. Zastosowanie DESs w tych procesach pozwala nie tylko izolować bioaktywne związki z dużą wydajnością, ale przede wszystkim, dzięki właściwościom i budowie tych rozpuszczalników, w znacznie mniejszym stopniu wpływa na środowisko naturalne. Na efektywność ekstrakcji mają wpływ nie tylko rodzaj rozpuszczalnika, ale również warunki prowadzenia ekstrakcji, takie jak temperatura, czas trwania procesu, a także dodatek wody do DES, mający na celu obniżenie lepkości cieczy.

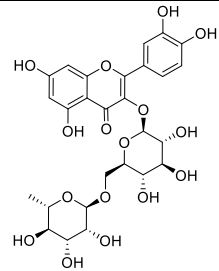
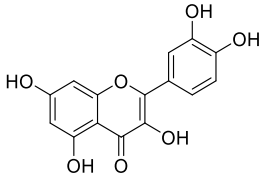
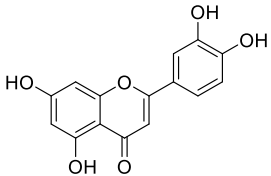
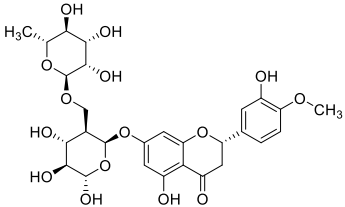
Przegląd literaturowy stanu wiedzy z tego zakresu został opublikowany w czasopiśmie *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (publikacja [P1])<sup>83</sup>. W kolejnych podrozdziałach zamieszczono najważniejsze informacje dotyczące właściwości związków występujących w poszczególnych roślinach, przykładów ekstrakcji i nowoczesnych rozwiązań w zakresie recyklu DES.

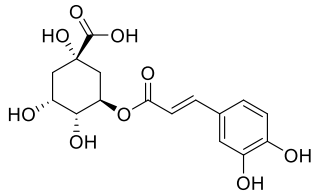
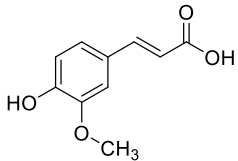
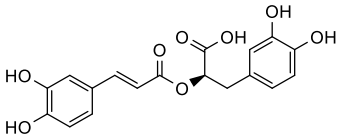
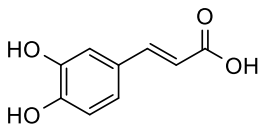
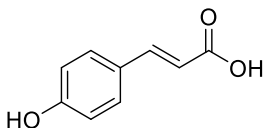
#### 3.1 Związki bioaktywne występujące w roślinach

Związki bioaktywne zawarte w roślinach należą głównie do kwasów fenolowych, flawonoidów, alkaloidów czy terpenów. Pełnią one szereg funkcji w roślinach, m. in. regulują

procesy fotosyntezy i wzrostu rośliny, odpowiadają za odporność na infekcje bakteryjne i grzybicze, a także mogą odstraszać szkodniki i pasożyty<sup>84,85</sup>. Związki te cenione są za swoje właściwości, przez co często wykorzystywane są w różnych dziedzinach. Wiele z nich wykazuje silne działanie przeciwutleniające, co jest szczególnie użyteczne w produktach kosmetycznych oraz spożywczych. Ponadto, niektóre związki (np. polifenole) mogą opóźniać rozwój chorób neurodegeneracyjnych (np. choroby Alzheimera czy Parkinsona), kardiologicznych oraz nowotworowych<sup>83</sup>. W Tabeli 3 przedstawiono wybrane związki bioaktywne występujące w roślinach, wraz z ich właściwościami. Skupiono się głównie na przedstawieniu tych związków, które były izolowane z roślin również w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

**Tabela 3.** Wybrane związki bioaktywne występujące w roślinach oraz ich właściwości i zastosowania (na podstawie publikacji [P1]<sup>83</sup>).

| Nazwa związku | Wzór strukturalny                                                                   | Właściwości i zastosowania                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rutyna        |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Ogranicza proliferację komórek nowotworowych i wywołuje ich apoptozę<sup>86</sup></li> <li>· Ogranicza neurotoksyczność wybranych leków (np. polimyksyn)<sup>87</sup></li> <li>· Redukuje zaczerwienienie skóry i reakcje alergiczne<sup>88</sup></li> </ul>               |
| Kwercetyna    |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Ogranicza działanie proteaz wirusowych i wspomaga działanie leków przeciwwirusowych (np. acyklowiru)<sup>89,90</sup></li> <li>· Ogranicza proliferację i migrację komórek nowotworowych<sup>91</sup></li> <li>· Silnie absorbuje promieniowanie UV<sup>92</sup></li> </ul> |
| Luteolina     |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Wykazuje działanie przeciwzapalne (w formie glikozydu)<sup>93</sup></li> <li>· Ogranicza biosyntezę toksycznych bakteryjnych amin w produktach mięsnych<sup>94</sup></li> </ul>                                                                                            |
| Hesperydyna   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Wykazuje silne działanie przeciwutleniające, wykorzystywane w produktach kosmetycznych<sup>95</sup></li> <li>· Wspomaga działanie układu sercowo-naczyniowego<sup>96</sup></li> </ul>                                                                                      |

|                         |                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kwas chlorogenowy       |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Ogranicza wzrost komórek nowotworowych<sup>97</sup></li> <li>· Spowalnia degradację kolagenu i chroni komórki skóry przez promieniowaniem UV<sup>98</sup></li> <li>· Wspomaga produkcję kolagenu<sup>99</sup></li> </ul>                                         |
| Kwas ferulowy           |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Ogranicza uboczne działania wybranych leków oraz toksyn<sup>100</sup></li> <li>· Wywołuje apoptozę komórek nowotworowych<sup>101</sup></li> </ul>                                                                                                                |
| Kwas rozmarynowy        |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Chroni DNA przed działaniem promieniowania UV<sup>102</sup></li> <li>· Ogranicza utlenianie kwasów omega-3<sup>103</sup></li> <li>· Wspomaga działanie układu nerwowego poprzez chelatację metali ciężkich<sup>104</sup></li> </ul>                              |
| Kwas kawowy             |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Wspomaga biosyntezę białek budujących synapsy – wspomaganie leczenia choroby Alzheimera<sup>105</sup></li> <li>· Wykazuje silne działanie przeciwutleniające<sup>106</sup></li> <li>· Wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową<sup>107</sup></li> </ul>         |
| Kwas <i>p</i> -kumarowy |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>· Wykazuje działanie przeciwbakteryjne<sup>108</sup></li> <li>· Ogranicza podziały komórek nowotworowych i wywołuje ich apoptozę<sup>109</sup></li> <li>· Wykazuje aktywność przeciwutleniającą – hamuje procesy degradacji lipidów i DNA<sup>110</sup></li> </ul> |

### 3.2 Zastosowanie rozpuszczalników głęboko eutektycznych w ekstrakcji związków bioaktywnych z biomasy roślinnej

Najczęściej stosowane techniki pozyskiwania ekstraktów roślinnych polegają na maceracji lub ekstrakcji w aparacie Soxhleta, z wykorzystaniem rozpuszczalników organicznych (etanolu, metanolu, acetonu) lub wody<sup>111</sup>. Metody te często wspomagane są ultradźwiękami lub promieniowaniem mikrofalowym<sup>112,113</sup>. Jednakże, w przypadku wielu rozpuszczalników organicznych należy brać pod uwagę ich wysoką palność oraz prężność par<sup>114</sup>. Z tych powodów, DESs stanowią bardziej ekologiczną alternatywę konwencjonalnych rozpuszczalników organicznych. Dodatkowo, często wykazują one wyższą efektywność ekstrakcji związków bioaktywnych<sup>115,116</sup>. Zestawienie przykładowych wydajności substancji pochodzenia roślinnego, wydzielonych z roślin z użyciem DESs, zostało przedstawione w Tabeli 4. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika oraz metody ekstrakcji na efektywność procesu zostaną opisane w kolejnych podrozdziałach.

**Tabela 4.** Wydajność związków bioaktywnych, ekstrahowanych z użyciem DESs z materiałów roślinnych (na podstawie publikacji [P1]<sup>83</sup>).

| Materiał roślinny          | DES                                                            | Technika ekstrakcji | Temperatura [°C] | Zawartość wody [%] | Czas [min] | Ekstrahowana substancja, wydajność ekstrakcji [mg/g suchej biomasy]                                                                 | Lit. |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------|------------------|--------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Gryka zwyczajna (kiełki)   | ChCl:Mocznik<br>ChCl:Glikol trietylenowy                       | U (700 W, 40 kHz)   | 40               | 20                 | 40         | Rutyna, 1,8 mg/g<br>Rutyna, 2,2 mg/g                                                                                                | 117  |
| Mięta pieprzowa (liście)   | ChCl:Gliceryna                                                 | O                   | 70               | 20                 | 180        | Hesperydyna, 3,2 mg/g                                                                                                               | 118  |
| Oliwka europejska (liście) | ChCl:Kwas octowy<br>ChCl:Kwas cytrynowy                        | O                   | 50               | 20                 | 180        | Całkowita zawartość fenoli, 0,5 mg/g<br>Całkowita zawartość fenoli, 0,2 mg/g                                                        | 119  |
| Krwawnik pospolity (ziele) | ChCl:Kwas mlekowy<br>ChCl:Mocznik                              | U (480 W, 40 kHz)   | 50               | 25                 | 30         | Kwas chlorogenowy, 3,0 mg/g<br>Kwas chlorogenowy, 2,9 mg/g                                                                          | 120  |
| Kokoryczka wonna (kłącza)  | ChCl:Kwas jabłkowy<br>ChCl:Kwas cytrynowy<br>ChCl:Kwas mlekowy | U (180 W)           | 50               | 0                  | 20         | Całkowita zawartość flawonoidów, 4,8 mg/g<br>Całkowita zawartość flawonoidów, 6,8 mg/g<br>Całkowita zawartość flawonoidów, 7,3 mg/g | 121  |
| Toina wenecka (liście)     | ChCl:Kwas lewulinowy                                           | O<br>M (400 W)      | 50<br>-          | 45                 | 30<br>0,5  | Rutyna, 0,02 mg/g<br>Rutyna, 0,03 mg/g                                                                                              | 115  |

ChCl – chlorek choliny; U – ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami; M – ekstrakcja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym; O – ekstrakcja bez technik wspomagających (ogrzewanie)

### 3.2.1 Wpływ rodzaju rozpuszczalnika głęboko eutektycznego na efektywność ekstrakcji

Szczególny wpływ na wydajność izolowanych substancji ma rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika. Jest to związane m.in. z polarnością DESs oraz polarnością ekstrahowanych związków. Zgodnie z zasadą, że substancje o podobnej polarności mieszają się ze sobą, związki bioaktywne o wysokiej polarności (np. kwasy fenolowe – kwas galusowy, kwas ferulowy, kwas kawowy) powinny być efektywniej ekstrahowane przez rozpuszczalniki o równie wysokiej polarności<sup>122</sup>. Z tego powodu, DESs zawierające kwasy karboksylowe jako HBD wykazują większą zdolność do ekstrakcji polarnych związków bioaktywnych, niż ich odpowiedniki zbudowane z polialkoholi lub monosacharydów (ze względu na wyższą polarność DESs zbudowanych z kwasów)<sup>123-125</sup>.

### 3.2.2 Wpływ warunków ekstrakcji z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych na wydajność wyizolowanych związków bioaktywnych

Podobnie, jak w przypadku delignifikacji biomasy z użyciem DESs, efektywność ekstrakcji związków bioaktywnych zależy od zastosowanych warunków, m.in. temperatury, czasu oraz dodatku wody do rozpuszczalnika. Ekstrakcje z użyciem DESs bardzo często prowadzi się w podwyższonej temperaturze (m.in. ze względu na lepkość DESs). Zazwyczaj nie przekracza ona jednak 90°C, ze względu na wrażliwość wybranych związków fenolowych na wyższe temperatury oraz możliwość wystąpienia procesów ubocznych, np. polimeryzacji polifenoli<sup>126,127</sup>. Procesy ekstrakcji są często wspomagane ultradźwiękami lub promieniowaniem mikrofalowym, w celu lepszej dezintegracji ściany komórkowej roślin, co skutkuje łatwiejszym uwalnianiem substancji bioaktywnych<sup>128</sup>.

W celu obniżenia lepkości DESs często stosowany jest dodatek wody<sup>129</sup>. Dzięki temu nie tylko zmniejsza się lepkość DES i poprawia wymiana masy, ale także może zwiększyć się polarność układu ekstrakcyjnego, co korzystnie wpływa na wydajność polarnych związków izolowanych z biomasy<sup>130,131</sup>. Przykładowo, zwiększając procentową zawartość wody w DES zbudowanym z chlorku choline i kwasu mlekowego z 0 do 30%, możliwe było uzyskanie znacznie wyższej wydajności ekstrahowanego z korzeni lukrecji kwasu glicyryzynowego (50 mg/g biomasy dla 30% wody oraz 28 mg/g biomasy dla samego DES)<sup>124</sup>. Należy jednak pamiętać, że po przekroczeniu pewnej zawartości wody (zazwyczaj powyżej 50%), aktywność DES jako rozpuszczalnika ekstrakcyjnego może się znacząco obniżyć. Struktura DESs jest

w głównej mierze oparta na wiązaniach wodorowych, które mogą zostać osłabione lub nawet zerwane w środowisku wodnym<sup>132,133</sup>.

### 3.2.3 Recykl rozpuszczalników głęboko eutektycznych po ekstrakcji związków bioaktywnych

Pomimo, że DESs stanowią efektywną i ekologiczną alternatywę dla konwencjonalnych rozpuszczalników stosowanych do ekstrakcji bioaktywnych związków z materiału roślinnego, problemem jest ich oddzielenie od ekstraktu. Ze względu na niską prężność par, utrudnione jest odparowanie rozpuszczalnika. Z tego powodu, konieczne jest stosowanie innych technik rozdziatu. Jedną z nich jest adsorpcja na złożach makroporowatych o różnej polarności (np. złoża o nazwach handlowych D-101, HP-20, AB-8), dostosowanej do charakteru izolowanych związków chemicznych<sup>134</sup>. Zaletą ich wykorzystania jest wysoka efektywność rozdziatu oraz możliwość wielokrotnego stosowania, jednakże złoża te są trudno dostępne na rynku europejskim. W literaturze często opisywane jest zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej SPE (j. ang. *solid phase extraction*) jako metody oddzielenia ekstraktów od rozpuszczalnika. Najczęściej stosowanym wypełnieniem kolumn SPE jest złożo C18 (złożo krzemionkowe modyfikowane grupami oktadecylowymi), umożliwiające elucję w odwróconym układzie faz. Metoda ta pozwala na osiągnięcie wysokiego stopnia odzysku związków bioaktywnych, jednakże jak dotąd stosowana jest tylko na skalę laboratoryjną<sup>117</sup>. Możliwy jest również odzysk izolowanych substancji z DES przez re-ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi (np. octanem etylu, butan-1-olem), jednakże technika ta nie zapewnia wysokiej efektywności rozdziatu<sup>135</sup>.

### 3.2.4 Przełączalne, hydrofobowe rozpuszczalniki głęboko eutektyczne

W ostatnich latach w literaturze pojawiło się pojęcie przełączalnych HDESs (j. ang. *switchable HDESs*), których właściwości można regulować poprzez zmianę warunków prowadzenia procesu. W zależności od zastosowanych składników HDESs, zmianę właściwości rozpuszczalnika można uzyskać poprzez zmianę temperatury, pH lub wprowadzenie do układu dwutlenku węgla<sup>136</sup>. Zjawisko to może zostać wykorzystane w procesach ekstrakcji z użyciem HDESs. Jak wspomniano wcześniej, w standardowych warunkach trudno jest za pomocą prostych metod oddzielić wyekstrahowane związki od HDES, ze względu na niską prężność par rozpuszczalnika. Uniemożliwia to łatwą regenerację tych cieczy i ponowne ich zastosowanie. W przypadku rozpuszczalników przełączalnych, zwiększenie hydrofilowości HDESs może

spowodować wytrącenie wcześniej ekstrahowanych związków hydrofobowych i umożliwić ich oddzielenie od rozpuszczalnika<sup>137</sup>. Zjawisko to zostało zastosowane w przypadku ekstrakcji związków biologicznie aktywnych (np.  $\beta$ -karotenu, polisacharydów) z materiału roślinnego (np. dyni, skórek pomarańczy, pestek winogron)<sup>138–140</sup>. Przełączalne HDESs są także wykorzystywane w innych dziedzinach, np. w oczyszczaniu wód gruntowych z zanieczyszczeń, np. herbicydów i fungicydów<sup>141,142</sup>.

Spośród opisywanych w literaturze przełączalnych HDESs, najczęściej badane są te, których właściwości mogą być regulowane poprzez zmianę pH. Są to rozpuszczalniki zbudowane zazwyczaj z mentolu, tymolu oraz kwasów i alkoholi tłuszczowych (np. oktan-1-olu, dekan-1-olu, kwasu dekanowego, kwasu laurynowego). Mają one charakter hydrofobowy i są niemieszalne z wodą. Jednakże, po dodaniu do nich roztworu zasady, np. roztworu wodorotlenku sodu, HDESs tworzą z roztworem wodnym jedną fazę<sup>143</sup>. Tak jak wcześniej wspomniano, po wytrąceniu substancji ekstrahowanej, przełączalny rozpuszczalnik można regenerować poprzez ponowne obniżenie pH za pomocą dodatku kwasów mineralnych i organicznych (np. HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, kwas octowy) lub buforów (np. buforu octanowego), co powoduje utworzenie dwóch faz i odtworzenie hydrofobowego rozpuszczalnika<sup>144,145</sup>. Możliwość zmiany właściwości omawianych HDESs z hydrofobowych na hydrofilowe wynika z faktu, że kwasy będące składnikami HDESs występują w środowisku zasadowym w formie anionów, co skutkuje zwiększoną mieszalnością rozpuszczalnika z wodą. Po obniżeniu pH, jony ulegają sprotonowaniu, co z kolei ogranicza ich mieszalność z wodą, a tym samym powoduje wydzielenie do osobnej fazy<sup>141</sup>.

## Omówienie wyników

DESs mogą być stosowane w wielu procesach transformacji biomasy lignocelulozowej. W zależności od rozpuszczalnika oraz parametrów procesowych, możliwe jest przeprowadzenie, m. in., delignifikacji materiałów roślinnych lub ekstrakcji związków bioaktywnych. Celem części badawczej pracy było opracowanie metod waloryzacji wybranych rodzajów biomasy roślinnej z zastosowaniem DESs. Szczególnie skupiono się na procesie delignifikacji odpadowej biomasy lignocelulozowej, jak również na wydzielaniu substancji bioaktywnych z roślin na drodze ekstrakcji. Dodatkowo przeprowadzono reakcje hydrolizy enzymatycznej biomasy po obróbce wstępnej z zastosowaniem DESs i określono zależność pomiędzy wydajnością otrzymywanych cukrów prostych, a stopniem delignifikacji surowca. Sprawdzono również wpływ wybranych DESs i ILs na aktywność stosowanych enzymów.

### 4. Delignifikacja biomasy roślinnej z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych

W pierwszej części badań uwagę skupiono na procesie delignifikacji wybranych materiałów roślinnych, z użyciem DESs. Celem przeprowadzonych eksperymentów było opracowanie efektywnej metody obróbki wstępnej biomasy oraz określenie zależności pomiędzy stopniem delignifikacji materiału, a wydajnością cukrów prostych, otrzymywanych w następczej hydrolizie enzymatycznej biomasy.

Na podstawie przeglądu literatury oraz przeprowadzonych badań wstępnych (częściowo opublikowanych w rozdziale monografii<sup>146</sup>) wytypowano rozpuszczalnik zbudowany z chlorku choline (ChCl) oraz kwasu mlekowego (LacA), zmieszanych w stosunku molowym 1:2 mol/mol (ChCl:LacA), jako najbardziej efektywny w delignifikacji wybranych typów biomasy (trawy, słomy żytniej oraz łupin orzecha włoskiego). Efektywność procesu oceniano na podstawie masy wydzielonej ligniny, która była porównywana do całkowitej zawartości tego polimeru w biomacie. Badania wstępne pozwoliły również na określenie wpływu temperatury delignifikacji, prędkości obrotowej mieszadła (rpm), stosunku masy lignocelulozy do objętości DES oraz czasu trwania procesu na jego efektywność (wyniki nieopublikowane). Parametry, które umożliwiły uzyskanie najwyższej wydajności ligniny, zostały zastosowane w dalszych badaniach.

Badania nad oceną możliwości zastosowania DESs w procesie obróbki wstępnej lignocelulozy przeprowadzono dla trzech rodzajów biomasy: trawy, słomy żytniej oraz łupin orzecha włoskiego. Trawę oraz słomę żytnią wybrano ze względu na powszechność ich

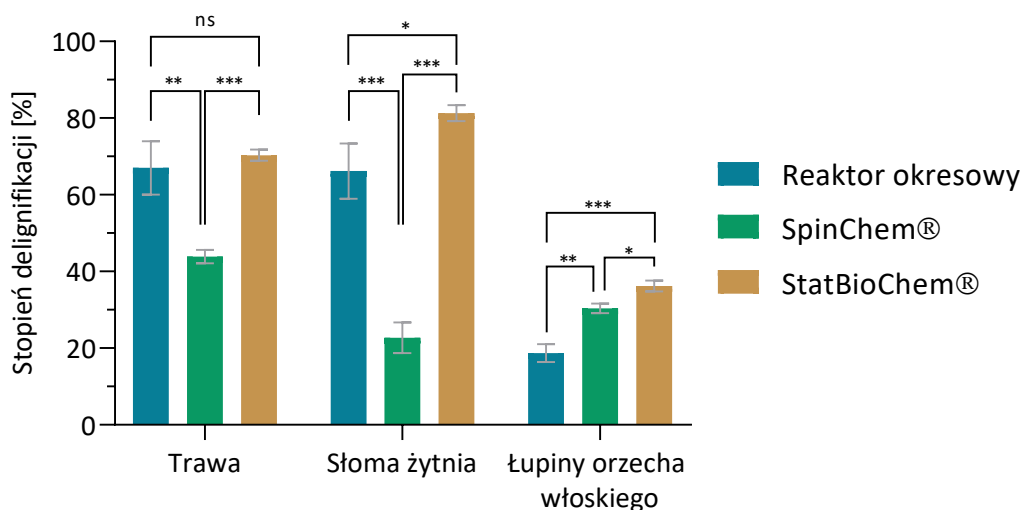
występowania (roczna produkcja żyta w Polsce w 2023 r. wynosiła ponad 2,5 miliona ton - dane Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa<sup>147</sup>). Z kolei łupiny orzecha włoskiego stanowią odpad trudny do utylizacji, ze względu na obecność juglonu i jego pochodnych w materiale. Ponadto, w tego typu biomase występują również produkty degradacji juglonu. Związki te mogą negatywnie wpływać na wzrost roślin uprawnych, np. pomidora zwyczajnego, przez co odpady z uprawy orzecha włoskiego nie powinny być kompostowane<sup>148,149</sup>. Na terenie UE roczna produkcja orzecha włoskiego wynosi ok. 193 tys. ton, z czego prawie 10 tys. ton produkowanych jest w Polsce<sup>147</sup>.

W wielu doniesieniach literaturowych proces delignifikacji biomasy jest wspomagany ultradźwiękami lub promieniowaniem mikrofalowym<sup>40,64,150</sup>. Metody te wymagają jednak stosowania odpowiedniej aparatury oraz dodatkowych nakładów energii, co jest niekorzystne z ekonomicznego punktu widzenia<sup>46,151</sup>. Ważnym aspektem jest również zastosowanie odpowiedniego reaktora z mieszaniem, zapewniającego dobry transport masy. W procesach obróbki biomasy zazwyczaj stosuje się klasyczne reaktory typu zbiornika z mieszadłem, a tylko w nielicznych doniesieniach literaturowych stosowano inne rozwiązania, na przykład handlowo dostępny reaktor koszykowy SpinChem®, w którym materiał roślinny umieszczany jest w obrotowym koszu, stanowiącym równocześnie mieszadło<sup>152</sup>. Takie rozwiązanie zostało przedstawione w pracach Ety i in., w których zrębki tartaczne poddane były obróbce z ILs<sup>153,154</sup>. Reaktor koszykowy nie został jak dotąd zastosowany w procesie delignifikacji biomasy z użyciem DESs.

W ramach niniejszej pracy podjęto próbę delignifikacji biomasy w trzech reaktorach okresowych, o różnej konstrukcji: w reaktorze okresowym wyposażonym w mieszadło mechaniczne, komercyjnie dostępnym reaktorze koszykowym SpinChem® oraz reaktorze koszykowym StatBioChem® ([P2])<sup>155</sup>. Reaktor StatBioChem® został zaprojektowany i opatentowany przez zespół dr hab. inż. Katarzyny Szymańskiej, prof. PŚ (patenty PL243990, PL245936). Zasadniczą różnicą pomiędzy reaktorem StatBioChem®, a SpinChem® jest unieruchomienie kosza z materiałem, co zapobiega mieszaniu w sposób wirowy rozpuszczalnika i cząsteczek biomasy. Pod kosz wprowadzone jest mieszadło mechaniczne, co powoduje bardziej turbulentny przepływ cieczy przez złożę, w porównaniu z reaktorem SpinChem®<sup>155,156</sup>.

Delignifikację biomasy (trawy, słomy żytniej oraz łupin orzecha włoskiego) przeprowadzono z użyciem DES ChCl:LacA (1:2 mol/mol), w temperaturze 100°C, w czasie 3 h

i stosunku biomasy do DES 1:20 m/V, przy obrotach mieszadła 500 rpm (warunki ustalone w badaniach wstępnych). Uzyskane stopnie delignifikacji biomasy przedstawiono na Rysunku 3.



**Rysunek 3.** Stopień delignifikacji biomasy w procesie z użyciem DES, w zależności od konstrukcji reaktora (na podstawie publikacji [P2]<sup>155</sup>).

*Stosowane warunki: ChCl:LacA (1:2 mol/mol) 100 mL, biomasa 5 g, 100°C, 3 h, 500 rpm.*

*Analiza statystyczna: ns – różnica statystycznie nieistotna; \* -  $p \leq 0,05$ ; \*\* -  $p \leq 0,01$ ;*

*\*\*\* -  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* -  $p \leq 0,0001$ .*

Stopień delignifikacji biomasy zależy nie tylko od rodzaju zastosowanego reaktora, ale również od typu lignocelulozy. Reaktor koszykowy SpinChem® okazał się nieodpowiedni w obróbce wstępnej biomasy miękkiej (trawy i słomy), ze względu na agregację cząstek, wynikającą z ruchu obrotowego kosza zawierającego materiał. Odwrotny efekt zapewniło użycie reaktora StatBioChem®, w którym przepływ mieszany zapobiegał zjawisku agregacji, co pozwoliło na lepszy kontakt surowca z rozpuszczalnikiem. W porównaniu do konwencjonalnego reaktora typu zbiornik z mieszadłem, w reaktorze StatBioChem® uzyskano nieznacznie wyższe stopnie delignifikacji. Istotną zaletą nowego typu reaktora koszykowego jest uproszczony rozdział rozpuszczalnika od pozostałości biomasy. Po procesie delignifikacji kosz z materiałem jest wyciągany z roztworu DES i ligniny, co umożliwia pominięcie etapu filtracji biomasy i uproszczenie procesu oczyszczania materiału z pozostałości rozpuszczalnika poprzez przemywanie. Dodatkowo, skala procesu może zostać powiększona, dzięki relatywnie prostej konstrukcji reaktora koszykowego.

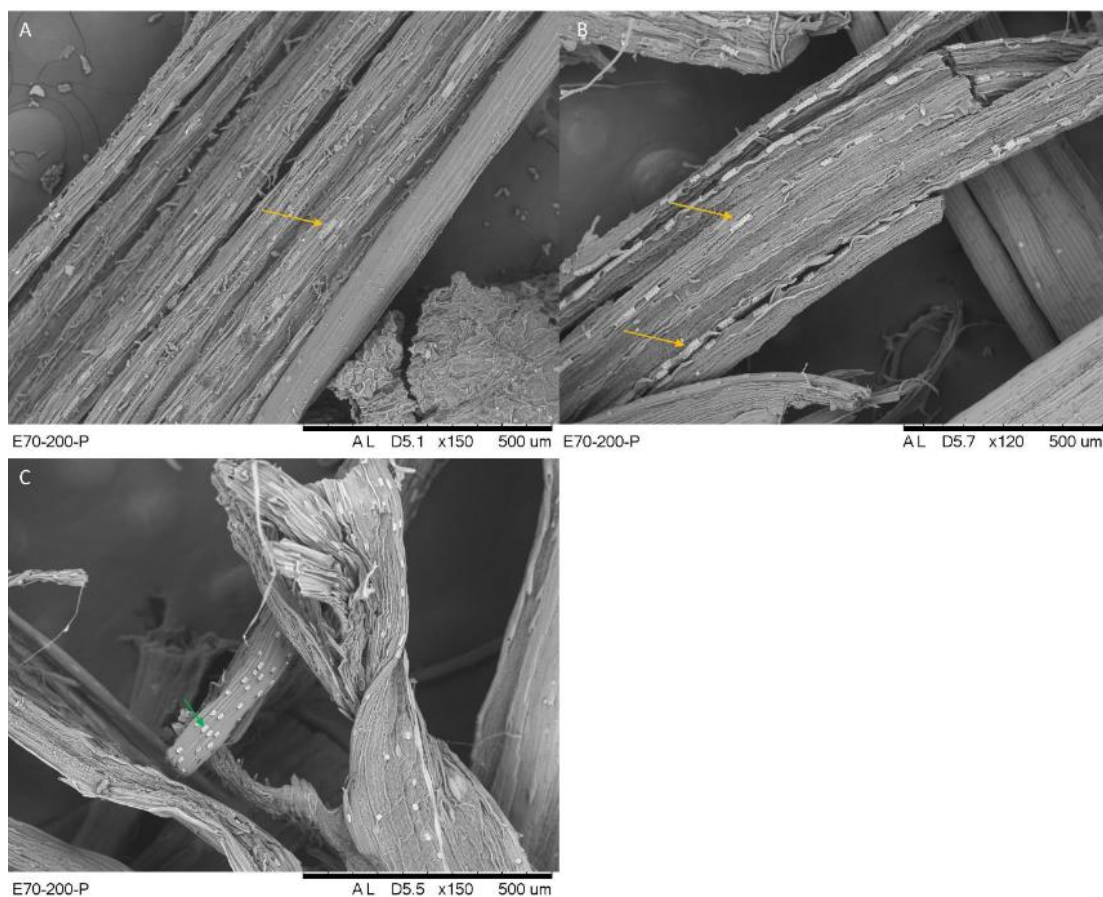
W przypadku biomasy twardej (łupin orzecha włoskiego), która jest mniej podatna na agregację, w reaktorze koszykowym SpinChem® uzyskano wyższy stopień delignifikacji,

w porównaniu z reaktorem okresowym. Jednakże również dla tej biomasy najlepsze rezultaty otrzymano w reaktorze StatBioChem®. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że reaktor StatBioChem®, dzięki turbulentnemu przepływowi DES przez lignocelulozę, jest najlepszym układem do wydajnej delignifikacji, niezależnie od rodzaju przetwarzanej biomasy.

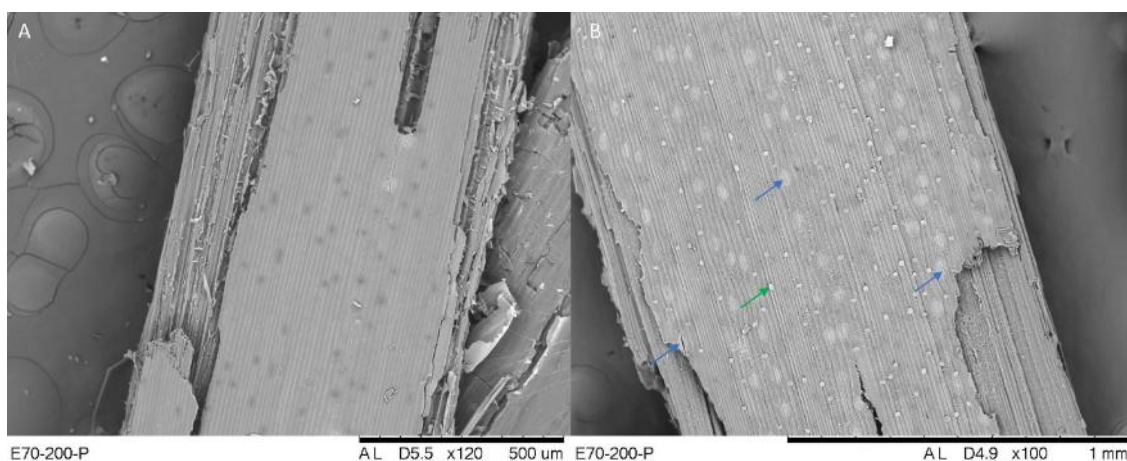
Delignifikacja biomasy z użyciem DES jest procesem zgodnym ze strategią zrównoważonego rozwoju i zasadami zielonej chemii, nie tylko ze względu na ekologiczny charakter stosowanych rozpuszczalników, ale także możliwość ich wielokrotnego użycia. W celu odzysku DES po procesie delignifikacji zastosowano dodatek przeciwrozpuszczalnika (wody), który powodował zerwanie wiązań wodorowych pomiędzy HBA i HBD w DES, skutkując utratą właściwości rozpuszczalnika i obniżeniem rozpuszczalności ligniny<sup>75</sup>. Powodowało to wytrącenie ligniny w postaci ciemnobrązowego osadu, co umożliwiło jej oddzielenie poprzez filtrację. Po oddzieleniu ligniny i odparowaniu wody, DES zawracano do kolejnego cyklu delignifikacji biomasy.

Na podstawie badań prowadzonych w reaktorze StatBioChem® wykazano możliwość co najmniej trzykrotnego recyklu DES  $\text{CHCl}_3$ :LacA w procesie delignifikacji biomasy ze słomy żytniej (stopień delignifikacji wynosił odpowiednio: 81,3%; 79,2% oraz 76,9%). Niewielki spadek stopnia delignifikacji w kolejnych cyklach wynikał prawdopodobnie z obecności związków o niższych masach cząsteczkowych, będących produktami częściowej degradacji ligniny, hemiceluloz oraz substancji woskowych w zawracanym DES<sup>79</sup>. Jak wspomniano we wstępie literaturowym, metoda wydzielania substancji z użyciem przeciwrozpuszczalnika jest skuteczna tylko dla związków wielkocząsteczkowych, np. ligniny. Istnieje możliwość oczyszczenia DES z pozostałych zanieczyszczeń poprzez re-ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi lub poprzez adsorpcję na złożach, jednakże metody te są obecnie stosowane tylko w skali laboratoryjnej.

Zmiany w strukturze biomasy po obróbce wstępnej z zastosowaniem DES analizowano z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Najbardziej istotne zmiany zaobserwowano w strukturze lignocelulozy miękkiej – trawy i słomy żytniej. Przykładowe zdjęcia przedstawione są na Rysunkach 4 (trawa) oraz 5 (słoma żytnia).



**Rysunek 4.** Zdjęcia SEM trawy przed delignifikacją (A) oraz po delignifikacji (B i C) w DES, w reaktorze StatBioChem®. Strzałką żółtą oznaczono struktury krzemionkowe, strzałką zieloną wytrącone skupiska ligniny (na podstawie publikacji [P2]<sup>155</sup>).



**Rysunek 5.** Zdjęcia SEM słomy żytniej przed delignifikacją (A) oraz po delignifikacji (B) w DES, w reaktorze StatBioChem®. Strzałką niebieską oznaczono ubytki powstające po usunięciu krzemionki, strzałką zieloną wytrącone skupiska ligniny (na podstawie publikacji [P2]<sup>155</sup>).

Na powierzchni materiałów po obróbce pojawiła się lignina wydzielona z wnętrza struktury biomasy, w postaci białych punktów<sup>157</sup>. Lignina w takiej postaci akumuluje się po zakończeniu procesu delignifikacji i obniżeniu temperatury mieszaniny<sup>158</sup>. Dodatkowo, dzięki odsłonięciu głębszych warstw materiału roślinnego, możliwe było zaobserwowanie struktur krzemionkowych<sup>155</sup>.

Przeprowadzono również analizę FT-IR biomasy przed i po obróbce. Zaobserwowano zmniejszenie intensywności pasm grup funkcyjnych charakterystycznych dla struktury chemicznej ligniny (sygnały w przedziale 1650-1610  $\text{cm}^{-1}$ , 1465  $\text{cm}^{-1}$  oraz 1245-1243  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>159-161</sup>, co związane jest z obniżeniem zawartości ligniny w biomacie. Dodatkowo, sygnały przypisywane strukturom krzemionkowym Si-O (sygnał 897  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>162</sup> oraz Si-OH (pasmo w zakresie 3330-3280  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>163</sup> miały większą intensywność na widmach trawy i słomy po obróbce z użyciem DES, co świadczy o odsłonięciu wewnętrznych warstw materiału (efekt widoczny również na zdjęciach SEM).

W celu oszacowania porowatości materiałów po obróbce, wyznaczono ich gęstość usypową oraz współczynnik retencji wody (ilość wody pozostająca w materiale po odwirowaniu). Każdy z rodzajów biomasy po procesie delignifikacji w reaktorze StatBioChem® wykazywał obniżoną gęstość usypową, co zostało przedstawione w Tabeli 5.

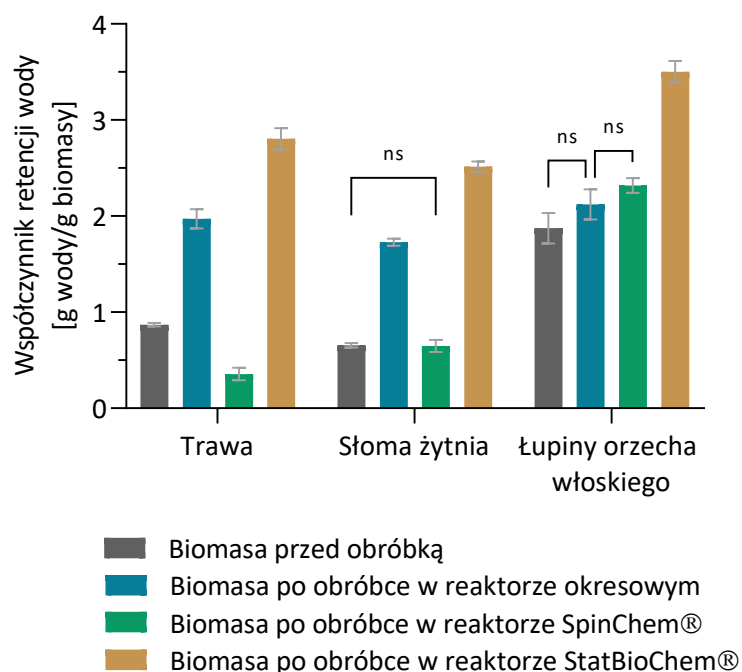
**Tabela 5.** Gęstość usypowa biomasy przed i po procesie delignifikacji z DES w reaktorze StatBioChem®.

| Rodzaj biomasy           | Gęstość usypowa przed delignifikacją [ $\text{kg/m}^3$ ] | Gęstość usypowa po delignifikacji [ $\text{kg/m}^3$ ] |
|--------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Trawa                    | 130,80 $\pm$ 5,52                                        | 79,25 $\pm$ 6,86                                      |
| Słoma żytnia             | 85,75 $\pm$ 2,90                                         | 79,10 $\pm$ 8,77                                      |
| Łupiny orzecha włoskiego | 296,30 $\pm$ 17,68                                       | 198,65 $\pm$ 17,89                                    |

Redukcja gęstości usypowej materiałów wiąże się z ich zwiększoną porowatością, która wpływa korzystnie na podatność biomasy na jej dalsze przetwarzanie. Należy jednak dodać, że obniżona gęstość usypowa wiąże się również z trudnościami w magazynowaniu i transporcie biomasy po obróbce<sup>164</sup>.

Współczynnik retencji wody dla badanych materiałów został wyznaczony zgodnie z procedurą TAPPI UM256, z modyfikacjami<sup>165</sup>. Jego wartość określono jako ilość wody pozostającej po wirowaniu w badanym materiale (Rysunek 6). Metoda ta pozwala

na określenie wielkości porów – im większe pory w materiale, tym współczynnik retencji wody jest niższy, ponieważ łatwiej usunąć wodę poprzez wirowanie<sup>166</sup>.



**Rysunek 6.** Współczynnik retencji wody dla biomasy przed i po delignifikacji z ChCl:LacA (na podstawie publikacji [P2]<sup>155</sup>).

*Analiza statystyczna: ns – różnica statystycznie nieistotna*

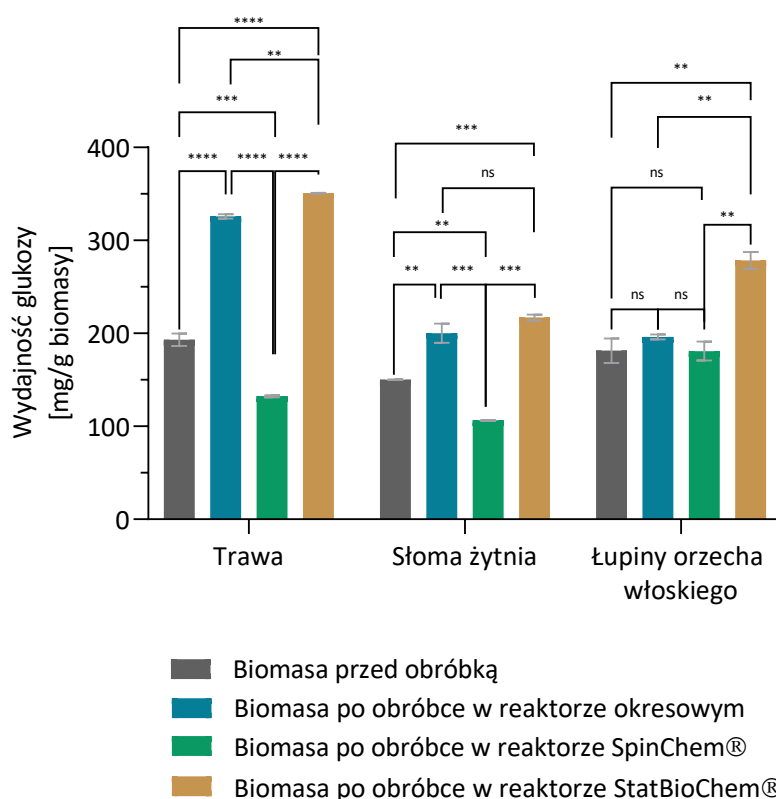
Wykazano, że współczynnik retencji wody dla wszystkich rodzajów biomasy jest bezpośrednio związany ze stopniem delignifikacji. W biomasie po procesach prowadzonych w reaktorze StatBioChem®, gdzie uzyskano najwyższe stopnie delignifikacji, współczynnik retencji wody znacząco wzrósł, co związane jest ze zwiększeniem ilości porów o małych rozmiarach. Świadczą o tym zarówno wyniki przedstawionej analizy, jak i obniżenie gęstości usypowej materiałów po obróbce.

##### 5. Hydroliza enzymatyczna biomasy roślinnej po delignifikacji z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych

Celem obróbki wstępnej biomasy jest zwiększenie jej podatności na dalsze przetwarzanie do docelowych produktów. Delignifikacja lignocelulozy ma szczególne znaczenie, jeżeli w następnych procesach wykorzystuje się biokatalizatory. Jak już wspomniano w części literaturowej, obecność ligniny ogranicza dostęp biokatalizatorów do pozostałych składników

biomasy (głównie celulozy i hemiceluloz), co powoduje obniżenie wydajności produktów ich przemian (np. cukrów).

W celu określenia czy obróbka wstępna lignocelulozy z użyciem DES spowoduje poprawę wydajności produktów w następnych procesach transformacji, przeprowadzono hydrolizę enzymatyczną biomasy przed i po delignifikacji, stosując celulazę z *A. niger*, w warunkach optymalnych dla pracy katalizatora (50°C, pH=5,0, bufor cytrynianowy, 24 h – parametry wyznaczone eksperymentalnie w badaniach wstępnych). Efektywność procesu określono na podstawie wydajności glukozy, powstającej w wyniku hydrolizy głównie celulozy, chociaż jak wykazano we wcześniejszych badaniach, niewielkie ilości glukozy mogą powstawać również w procesie degradacji hemiceluloz. Określono również wpływ układu reakcyjnego stosowanego w obróbce wstępnej oraz stopnia delignifikacji na ilość otrzymywanej glukozy (Rysunek 7).



**Rysunek 7.** Wpływ delignifikacji biomasy z użyciem ChCl:LacA w różnych typach reaktorów, na wydajność glukozy otrzymanej w następnej hydrolizie enzymatycznej (na podstawie publikacji [P2]<sup>155</sup>)

Warunki hydrolizy enzymatycznej: 100 mg biomasy, 19 U celulazy z *A. niger*, 50°C, bufor cytrynianowy pH=5,0, 24 h, 150 rpm (inkubator z mieszaniem).

Analiza statystyczna: ns – różnica statystycznie nieistotna; \* -  $p \leq 0,05$ ; \*\* -  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* -  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* -  $p \leq 0,0001$ .

Na podstawie wyników przedstawionych na Rysunkach 3 oraz 7 można wnioskować, że delignifikacja biomasy ma pozytywny wpływ na wydajność glukozy, otrzymywanej w następnej hydrolizie enzymatycznej materiału. Dla każdego rodzaju biomasy, po obróbce wstępnej w prostym reaktorze okresowym z mieszadłem oraz w reaktorze StatBioChem® uzyskano wyższe ilości glukozy, niż w przypadku biomasy niepoddanej delignifikacji. Delignifikacja lignocelulozy prowadzona w reaktorze SpinChem® miała natomiast negatywny wpływ na hydrolizę enzymatyczną, szczególnie w przypadku miękkiej biomasy (trawa i słoma). Jest to związane z opisaną wcześniej agregacją cząstek podczas obróbki wstępnej.

W przypadku twardej biomasy (łupiny orzecha włoskiego), jedynie po obróbce wstępnej w reaktorze StatBioChem®, która pozwoliła na usunięcie największych ilości ligniny (Rysunek 3) oraz zwiększenie porowatości materiału (Rysunek 6), zaobserwowano poprawę wydajności glukozy, w porównaniu z próbką kontrolną. W pozostałych układach wydajności glukozy były porównywalne. Podsumowując, zaproponowane rozwiązanie – delignifikacja biomasy z użyciem  $\text{CHCl}_3$ :LacA (1:2 mol/mol), w reaktorze koszykowym StatBioChem®, stanowi efektywną metodę obróbki wstępnej lignocelulozy, szczególnie w przypadku przetwarzania biomasy twardej. Sprawdzone również, czy reaktor StatBioChem® może być zastosowany do przeprowadzenia następnej reakcji hydrolizy enzymatycznej biomasy. W tym celu przeprowadzono proces przetwarzania lignocelulozy z użyciem celulazy z *A. niger* w warunkach analogicznych do procesów prowadzonych w inkubatorze z mieszaniem. Niestety, uzyskano niższą wydajność glukozy, co prawdopodobnie było skutkiem uszkodzenia struktury enzymu w wyniku zbyt intensywnego, turbulentnego mieszania.

#### 6. Wpływ cieczy jonowych i rozpuszczalników głęboko eutektycznych na aktywność enzymatyczną celulaz

W nowoczesnych procesach przetwarzania biomasy roślinnej, oprócz wspomnianych DESs, szeroko opisywane jest również zastosowanie ILs. Najczęściej wykorzystywane są jako rozpuszczalniki i katalizatory bezpośredniej transformacji biomasy do związków o dużej wartości dodanej (np. furfuralu, 5-HMF, kwasu lewulinowego, estrów kwasu lewulinowego). Wybrane rodzaje ILs mają zdolność do rozpuszczania celulozy i hemiceluloz, nie powodując ich degradacji i dalszych przemian<sup>167</sup>. Sprawia to, że mogą być stosowane w procesach obróbki wstępnej biomasy, która następnie przetwarzana jest na drodze hydrolizy enzymatycznej. To z kolei wiąże się z koniecznością usunięcia pozostałości rozpuszczalników,

przed następczym procesem wykorzystującym biokatalizatory, ze względu na możliwość dezaktywacji enzymu. Dlatego też ważne jest określenie, jakie typy ILs i DESs oraz w jakich ilościach mogą negatywnie wpływać na procesy enzymatyczne. W literaturze istnieją sprzeczne doniesienia na ten temat. Udowodniono, że [emim][OAc] obecny w mieszaninie reakcyjnej zawierającej celulazę z *Trichoderma reesei* w ilości 10% wpływa na obniżenie aktywności enzymu o 40%<sup>168</sup>. W przypadku DES zbudowanego z ChCl i LacA (w stosunku molowym 1:5 mol/mol), dodatek 2,5% do mieszaniny reakcyjnej spowodował całkowitą dezaktywację celulazy z *A. terreus*<sup>169</sup>. Niektóre doniesienia literaturowe przedstawiają natomiast korzystny wpływ tych rozpuszczalników na aktywność celulaz<sup>170,171</sup>. Przykładowo, w wyniku dodatku 15% objętościowych DES zbudowanego z ChCl oraz gliceryny (Glyc) w stosunku molowym 2:1 mol/mol, do celulazy z *A. terreus* w buforze cytrynianowym (pH = 4,8), uzyskano 40% wzrost aktywności enzymu<sup>172</sup>.

Celem badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy było określenie wpływu wybranych DESs, szczególnie tych stosowanych do obróbki wstępnej lignocelulozy, na aktywność enzymów celulolitycznych, a tym samym odpowiedź na pytanie, czy dokładne odmycie pozostałości wybranych rozpuszczalników po obróbce wstępnej biomasy jest konieczne przed zastosowaniem biokatalizatorów. Wyniki badań zostały przedstawione w publikacji **[P3]**<sup>173</sup>. Wpływ szeregu ILs na aktywność enzymatyczną celulazy z *A. niger* był badany przez dr inż. Martę Przypis, należącą do zespołu dr hab. inż. Danuty Gillner, prof. PŚ (wkład procentowy i merytoryczny współautorów został podany w dalszej części pracy). Zastosowano trzy popularne biokatalizatory: celulazę z *A. niger*, celulazę z *T. reesei* oraz kompleks enzymatyczny Viscozyme® L (zawierający celulazy,  $\beta$ -glukanazy, hemicelulazy i ksylanazy – zgodnie z informacją podaną przez producenta). Badano wpływ 10% dodatku wybranych DESs (Tabela 6). W zastosowanej ilości DES, wiązania wodorowe, występujące pomiędzy HBA i HBD, prawdopodobnie ulegają zerwaniu, dlatego też rozpuszczalnik może występować w przedstawionym układzie reakcyjnym w postaci oddzielnych składników. Jednakże, celem badań było określenie, czy pozostałości DESs mogą wpływać na aktywność enzymatyczną wybranych biokatalizatorów, dlatego też wybrano daną ilość rozpuszczalników (10%), jako możliwą pozostałość po procesie obróbki wstępnej.

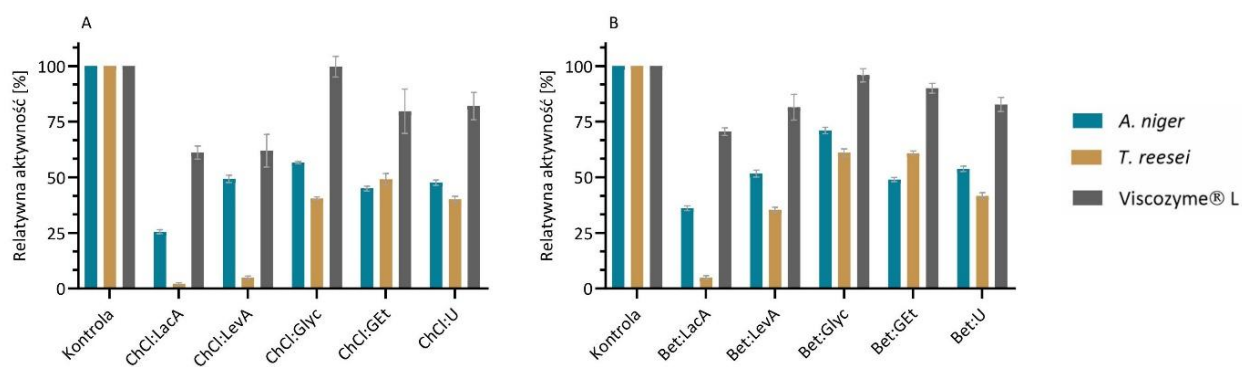
**Tabela 6.** DESs użyte do badań ich wpływu na aktywność enzymatyczną celulaz.

| HBA                    | HBD                    | Stosunek<br>molowy<br>HBA:HBD | Skrót DES |
|------------------------|------------------------|-------------------------------|-----------|
| Chlorek choliny (ChCl) | Kwas mlekowy (LacA)    | 1:2                           | ChCl:LacA |
|                        | Kwas lewulinowy (LevA) |                               | ChCl:LevA |
|                        | Gliceryna (Glyc)       |                               | ChCl:Glyc |
|                        | Glikol etylenowy (GEt) |                               | ChCl:GEt  |
|                        | Mocznik (U)            |                               | ChCl:U    |
| Betaina (Bet)          | Kwas mlekowy (LacA)    | 1:2                           | Bet:LacA  |
|                        | Kwas lewulinowy (LevA) |                               | Bet:LevA  |
|                        | Gliceryna (Glyc)       |                               | Bet:Glyc  |
|                        | Glikol etylenowy (GEt) | 1:3*                          | Bet:GEt   |
|                        | Mocznik (U)            | 1:1*                          | Bet:U     |

\* Niemożliwe było utworzenie DES w stosunku molowym 1:2 mol/mol

Zgodnie z charakterystyką dostarczoną przez producentów, stosowane preparaty cechują się różną aktywnością enzymatyczną. W badaniach wstępnych określono taką ich ilość, która zapewniała taką samą aktywność katalityczną (19 U) w modelowej reakcji hydrolizy enzymatycznej celulozy (odpowiednio 24 mg celulazy z *A. niger*, 27 mg celulazy z *A. reesei* lub 190 mg preparatu Viscozyme® L na 100 mg celulozy).

Ze względu na to, że w niniejszej pracy uwagę skupiono głównie na DESs, na Rysunku 8 przedstawiono, jak dodatek 10% objętościowych DESs do mieszaniny reakcyjnej wpływa na proces enzymatycznej hydrolizy celulozy.



**Rysunek 8.** Wpływ DESs zawierających chlorek choliny (A) lub betainę (B) jako HBA na aktywność wybranych enzymów w procesie hydrolizy celulozy (na podstawie publikacji [P3]<sup>173</sup>).

Warunki hydrolizy enzymatycznej: 100 mg celulozy, 19 U enzymu, 50°C, bufor cytrynianowy pH=5,0, 8 h, 70 rpm (inkubator z mieszaniem). Kontrola – hydroliza enzymatyczna prowadzona w buforze, bez dodatku DESs.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że stosowane DESs wpływają negatywnie na enzymy celulolityczne. Zaobserwowano zarówno wpływ HBA, jak i HBD. Białka zachowały wyższą względną aktywność w środowisku rozpuszczalników zbudowanych z Bet jako HBA. Efekt ten jest najbardziej widoczny w reakcji hydrolizy celulozy w obecności celulazy z *T. reesei*, z dodatkiem ChCl:LevA (względna aktywność 4,9%) i Bet:LevA (35,3%). Niektóre doniesienia literaturowe przedstawiają DESs zawierające Bet jako dodatki zwiększające stabilność termiczną białek (np. lakaz, peroksydaz)<sup>169,174,175</sup>.

Jednym z czynników wpływających na dezaktywację celulaz w środowisku DESs może być zbyt niskie pH mieszaniny reakcyjnej. W celu weryfikacji tego założenia, zmierzono pH mieszanin z dodatkiem 10% badanych DESs. Rozpuszczalniki zbudowane z Glyc, GEt oraz U nie wpływały na zmianę pH roztworu. Natomiast DESs zawierające kwasy karboksylowe spowodowały obniżenie pH mieszanin (ChCl:LacA pH=3,10; Bet:LacA pH=3,71; ChCl:LevA pH=3,95; Bet:LevA pH=4,38). Jednocześnie należy podkreślić, że wpływ DESs zawierających Bet jako HBA był mniejszy, niż w przypadku ChCl, co potwierdza korzystny wpływ Bet na stabilizację białka.

Jak można zauważyć, preparat Viscozyme® L był najbardziej odporny na dezaktywujący wpływ DESs, niezależnie od rodzaju rozpuszczalnika. DESs zawierające w swojej strukturze Glyc nie miały wpływu na aktywność enzymatyczną tego biokatalizatora. W procesach enzymatycznych, Glyc stosowany jest jako stabilizator białek<sup>176</sup>. Dodatkowo, Viscozyme® L składa się z szeregu biokatalizatorów, których odporność na obecność dodatkowych substancji może być różna.

Uwzględniając otrzymane wyniki badań, przeprowadzono próbę hydrolizy enzymatycznej trawy z użyciem preparatu Viscozyme® L, w medium zawierającym 10% dodatek ChCl:Glyc (proces I-etapowy; 100 mg trawy, 19 U biokatalizatora, bufor cytrynianowy pH=5,0, 50°C, 8 h). Dodatkowo, przeprowadzono obróbkę wstępną biomasy z ChCl:Glyc (90°C, 3 h) oraz następczą hydrolizę enzymatyczną materiału (po oczyszczeniu biomasy z pozostałości DES; proces II-etapowy; 100 mg trawy, 19 U biokatalizatora, bufor cytrynianowy pH=5,0, 50°C, 8 h). Wydajność glukozy otrzymanej w obu procesach została porównana z wydajnością cukru powstającego w reakcji kontrolnej – hydrolizie enzymatycznej trawy bez dodatku DES i bez obróbki wstępnej. Wyniki zostały przedstawione w Tabeli 7.

**Tabela 7.** Wydajność glukozy [mg/g biomasy], otrzymanej w wyniku hydrolizy enzymatycznej trawy wobec Viscozyme® L.

| Proces           | Wydajność glukozy [mg/g biomasy] |
|------------------|----------------------------------|
| Kontrolny        | 204,1 ± 1,6                      |
| I-etapowy        | 196,6 ± 1,7                      |
| II-etapowy (DES) | 252,9 ± 1,3                      |

Dodatek DES w jednoetapowym procesie nie spowodował znaczących zmian w wydajności glukozy, w porównaniu z próbą kontrolną. Rozdzielenie procesu obróbki wstępnej (delignifikacji) i następczej hydrolizy enzymatycznej pozwoliło na zwiększenie wydajności glukozy. Związane jest to z efektywniejszym procesem delignifikacji wobec DES, prowadzonym w wyższej temperaturze (90°C). Należy zauważyć, że do badań opisanych powyżej, w celach porównawczych zastosowano DES, który wykazywał najmniejszy negatywny wpływ na enzymy, ale też małą aktywność w procesie delignifikacji (stopień delignifikacji trawy ~54%). Jeżeli natomiast zastosujemy proces dwuetapowy i użyjemy do delignifikacji znacznie bardziej aktywnego DES ChCl:LacA, ilość uzyskanej glukozy jest znacznie wyższa (Rysunek 7).

Podsumowując, najlepszym rozwiązaniem jest rozdzielenie procesu delignifikacji i następczej hydrolizy enzymatycznej. Korzystne jest również usunięcie pozostałości DESs z biomasy, po obróbce wstępnej.

#### 7. Ekstrakcja związków bioaktywnych z materiału roślinnego z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych

Druga część badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej dotyczyła zastosowania DESs w ekstrakcji substancji bioaktywnych z materiałów roślinnych. Substancje o cennych właściwościach (przeciwutleniających, antyseptycznych, wspomagających leczenie wybranych dolegliwości) najczęściej pozyskiwane są z roślin uprawianych specjalnie w tym celu. Jednakże biomasa odpadowa może również stanowić źródło związków bioaktywnych. W literaturze istnieje kilka przykładów wykorzystania takiego surowca, np. wyłoków owocowych (np. winogronowych<sup>113</sup>, pomidorowych<sup>177</sup>, jabłkowych<sup>178</sup>) lub liści warzyw i owoców (np. liści brokuł<sup>179</sup>, liści figi<sup>180</sup>). W niniejszej pracy podjęto próbę ekstrakcji związków biologicznie aktywnych zarówno z rośliny uprawnej (nagietek lekarski – *Calendula officinalis* L.), jak również z biomasy odpadowej (liście pomidora - *Solanum Lycopersicum* L.).

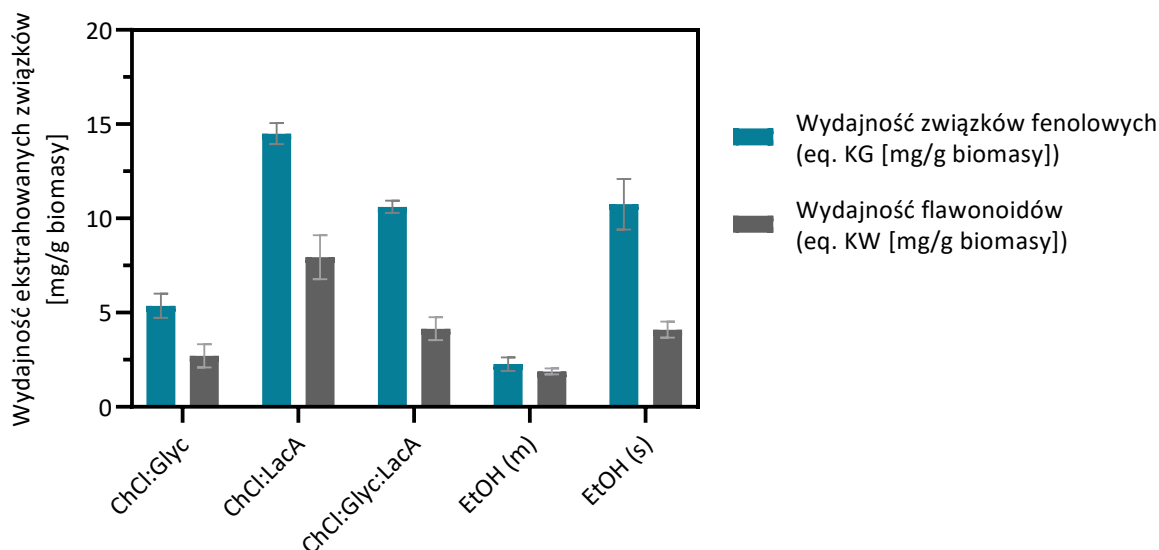
### 7.1 Ekstrakcja związków bioaktywnych z liści pomidora z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych

Liście pomidora zawierają cenne substancje bioaktywne, takie jak rutyna, kwas chlorogenowy,  $\beta$ -karoten, witamina K1, tomatyna (związek z grupy alkaloidów) oraz inne związki z grup flawonoidów, karotenoidów i fenoli. Zawartość wskazanych substancji może się różnić w zależności od wieku rośliny, a także warunków jej uprawy<sup>181–183</sup>. Biorąc pod uwagę, że na terenie UE roczna produkcja pomidorów wynosi ok. 16 mln ton (2023 r.), z czego w Polsce ponad 880 tys. ton, odpadowa biomasa w postaci liści tej rośliny jest łatwo dostępna<sup>147</sup>. Istnieją nieliczne doniesienia literaturowe dotyczące ekstrakcji polifenoli z liści pomidora, natomiast jak dotąd nie zostały w tym celu wykorzystane DESs.

W niniejszej pracy (publikacja **[P4]**<sup>184</sup>), zastosowano liście pomidora zebrane z lokalnych upraw (Rybnik), które poddano mieleniu (wielkość cząstek biomasy od 0,2 mm do 0,6 mm) oraz suszeniu do stałej masy poprzez liofilizację. Zastosowano DESs zbudowane z ChCl jako HBA oraz LacA lub Glyc jako HBD, w stosunku molowym 1:2 (mol/mol). Zastosowano również trójskładnikowy DES, w którym jako HBD zastosowano równocześnie LacA oraz Glyc (ChCl:LacA:Glyc w stosunku molowym 1:1:1). Każdy ze związków tworzących stosowane DESs jest dopuszczony do użytku w produktach spożywczych i paszach zwierzęcych, co umożliwia zastosowanie otrzymanych ekstraktów w tych dziedzinach, np. w opakowaniach do żywności<sup>185–188</sup>.

W badaniach wstępnych (nieopublikowane) określono najbardziej korzystne warunki prowadzenia procesu (70°C, 2 h, 400 rpm, stosunek masy materiału roślinnego do DES 1:15 m/v). Dla porównania przeprowadzono również ekstrakcje w klasycznych układach z użyciem etanolu (w aparacie Soxhleta lub poprzez macerację). Wydajność związków fenolowych została obliczona na podstawie krzywej wzorcowej, przygotowanej dla kwasu galusowego (KG) jako substancji wzorcowej, natomiast w przypadku flawonoidów substancją wzorcową była kwercetyna (KW).

Wpływ stosowanych rozpuszczalników na wydajność ekstrahowanych związków fenolowych i flawonoidów przedstawiono na Rysunku 9.



**Rysunek 9.** Wydajność związków bioaktywnych (związków fenolowych oraz flawonoidów), ekstrahowanych z liści pomidora, w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika (na podstawie publikacji [P4]<sup>184</sup>).

Warunki ekstrakcji z DESs: 70°C, 2 h, 400 rpm, stosunek masy materiału roślinnego do rozpuszczalnika 1:15 (m/v).

Warunki ekstrakcji z EtOH (m): maceracja, temperatura pokojowa, 7 dni (wymiana rozpuszczalnika co 24 h), stosunek masy materiału roślinnego do rozpuszczalnika 1:15 (m/v).

Warunki ekstrakcji z EtOH (s): ekstrakcja w aparacie Soxhleta, 8 h, 2 g biomasy, 200 mL rozpuszczalnika.

Najwyższe wydajności związków fenolowych (14,5 mg/g) i flawonoidów (7,9 mg/g) uzyskano w procesie z użyciem DES ChCl:LacA. Ze względu na relatywnie wysoką polarność związków fenolowych oraz flawonoidów, ich wydajność powinna być wyższa, jeżeli użyty rozpuszczalnik również wykazuje wysoką polarność. DESs zawierające kwasy karboksylowe są bardziej polarne, niż ich odpowiedniki zawierające polialkohole, czego efektem jest zwiększona wydajność izolowanych polarnych substancji<sup>123,189</sup>. Potrójny DES zbudowany z LacA i Glyc jako HBD okazał się lepszy, niż ten zawierający tylko Glyc jako HBD, co potwierdza pozytywny wpływ LacA na wydajność fenoli i flawonoidów. Dla ekstrakcji etanolem w aparacie Soxhleta uzyskano rezultaty podobne do tych z użyciem potrójnego DES.

Ekstrakcja związków bioaktywnych poprzez macerację okazała się najmniej efektywna. Należy podkreślić, że zastosowanie DESs umożliwiło znaczne skrócenie czasu trwania procesu, co jest kolejną przewagą alternatywnych rozpuszczalników nad konwencjonalnymi.

Ekstrakty z liści pomidora poddano analizie HPLC-MS/MS (analizę wykonała mgr inż. Joanna Wilk z zespołu dr hab. inż. Sylwii Bajkacz, prof. PŚ, Katedra Chemii Nieorganicznej, Analitycznej i Elektrochemii). W Tabeli 8 podano ilości wybranych substancji bioaktywnych, obecnych w ekstraktach uzyskanych z użyciem DESs.

**Tabela 8.** Wydajność substancji bioaktywnych ekstrahowanych z liści pomidora z użyciem DESs. Kolorem szarym zaznaczono najwyższe wydajności, w zależności od zastosowanego DES (na podstawie [P4]<sup>184</sup>).

| Nazwa związku           | pKa* | logP* | Wydajność ekstrakcji [µg/g biomasy] |                |                |
|-------------------------|------|-------|-------------------------------------|----------------|----------------|
|                         |      |       | ChCl:LacA                           | ChCl:Glyc      | ChCl:Glyc:LacA |
| Rutyna                  | 6,37 | -0,87 | 6236,0 ± 42,02                      | 2708,0 ± 40,54 | 3188,0 ± 22,0  |
| Hesperydyna             | 8,61 | -0,31 | 597,54 ± 12,09                      | 409,57 ± 31,9  | 405,79 ± 6,16  |
| Kwas chlorogenowy       | 3,33 | -0,27 | 320,35 ± 6,35                       | 270,62 ± 5,04  | 220,48 ± 3,10  |
| Kwercetyna              | 6,38 | 2,16  | 33,42 ± 0,09                        | 7,05 ± 0,38    | 8,48 ± 0,01    |
| Kwas kawowy             | 4,62 | 1,15  | 7,25 ± 0,42                         | 6,00 ± 0,58    | 7,37 ± 0,05    |
| Kwas rozmarynowy        | 3,13 | 3,00  | 5,42 ± 0,03                         | 5,33 ± 0,41    | 6,44 ± 0,06    |
| Kwas ferulowy           | 3,58 | 1,67  | 1,62 ± 0,18                         | 2,59 ± 0,39    | 1,83 ± 0,03    |
| Luteolina               | 6,57 | 2,40  | 1,18 ± 0,05                         | 1,39 ± 0,02    | 1,29 ± 0,03    |
| Kwas <i>p</i> -kumarowy | 3,81 | 1,83  | <LOQ                                | 1,29 ± 0,36    | <LOQ           |

\*wartości pKa oraz logP zostały pobrane z bazy danych Drugbank (dostęp z dnia 20.05.2024 r.)

Związkami bioaktywnymi występującymi w liściach pomidora w największej ilości są rutyna i kwas chlorogenowy, co jest zgodne z danymi literaturowymi<sup>181,190,191</sup>. Bezpośrednie porównanie wydajności związków uzyskanych w niniejszych badaniach i podanych w literaturze jest jednak trudne, ze względu na różnice w warunkach hodowli roślin, które mają kluczowy wpływ na zawartość substancji bioaktywnych.

Jak wspomniano wcześniej, polarność ekstrahowanej substancji oraz DES istotnie wpływają na efektywność wydzielania. Zastosowanie DES o wyższej polarności (ChCl:LacA) pozwoliło na otrzymanie najwyższych wydajności substancji o podobnym charakterze – rutyny, hesperydyny, kwasu chlorogenowego (na podstawie parametru logP). Zaskakująca jest natomiast wysoka zawartość kwercetyny, w ekstrakcie z użyciem ChCl:LacA. Wartość logP dla kwercetyny znacznie różni się od pozostałych (np. rutyna -0,87; kwercetyna 2,16). Prawdopodobnie, w kwasowym środowisku, kwercetyna występuje w formie zjonizowanej, dzięki czemu jej rozpuszczalność w polarnym rozpuszczalniku jest większa<sup>192</sup>. Oprócz

polarności rozpuszczalnika, na efektywność ekstrakcji mają wpływ oddziaływania występujące pomiędzy składnikami DESs, a cząsteczkami izolowanych substancji, np. poprzez wiązania wodorowe. Związki, które w swojej strukturze zawierają więcej grup donorowych, np. grup hydroksylowych, mogą utworzyć więcej wiązań wodorowych z jonem chlorkowym w cząsteczce  $\text{ChCl}$ , przez co efektywność ich ekstrakcji jest większa<sup>193</sup>. Dowodem może być niższa wydajność kwasu *p*-kumarowego, posiadającego jedną grupę hydroksylową ( $1,29 \mu\text{g/g}$  z  $\text{ChCl:Glyc}$ ), w porównaniu z wydajnością kwasu kawowego ( $6,00 \mu\text{g/g}$ ), w którego strukturze znajdują się dwie grupy hydroksylowe.

Kolejnym czynnikiem, który może wpływać na wydajność ekstrahowanych związków jest dodatek wody. Obecność wody w rozpuszczalniku obniża jego lepkość i pozwala polepszyć wymianę masy w procesie ekstrakcji<sup>15</sup>. W ramach przeprowadzonych badań sprawdzono wpływ dodatku wody w zakresie od 0 do 50% objętościowych (w stosunku do objętości całej mieszaniny) na wydajność związków fenolowych i flawonoidów wydzielanych z liści pomidora, z użyciem  $\text{ChCl:LacA}$ , w temperaturze  $70^\circ\text{C}$ . Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że w badanym procesie dodatek wody (w zakresie od 10 do 40%) ma nieznaczny wpływ na efektywność ekstrakcji związków bioaktywnych z użyciem DES. Dopiero przy 50% dodatku wody zaobserwowano spadek wydajności substancji bioaktywnych, co jest spowodowane zaburzeniem struktury DES.

Przeprowadzono również próbę recyklu DES  $\text{ChCl:LacA}$ . Po ekstrakcji liści pomidora i odfiltrowaniu stałych pozostałości biomasy, przeprowadzono rozdział mieszaniny techniką SPE na kolumnach wypełnionych złożem C18. Odzyskany DES zastosowano w kolejnych cyklach. Po trzech cyklach nie obserwowano spadku wydajności ekstrahowanych związków.

Właściwości przeciwutleniające uzyskanych ekstraktów zbadano z użyciem DPPH (1,1-difenylo-2-(2,4,6-trinitrofenylo)hydrazyl). Metoda ta polega na pomiarze absorbancji roztworu DPPH, do którego dodany został badany ekstrakt. W wyniku zachodzącej reakcji neutralizacji rodnika, zachodzi odbarwienie fioletowego roztworu DPPH. W celu określenia aktywności przeciwutleniającej ekstraktów, analizy wykonano również dla trzech stosowanych DESs (Tabela 9).

**Tabela 9.** Właściwości przeciwutleniające DESs oraz ekstraktów z liści pomidora w DESs.

| DES lub ekstrakt z liści pomidora | Stopień neutralizacji wolnych rodników DPPH [%] |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------|
| ChCl:LacA                         | -                                               |
| ChCl:Glyc                         | 0,92                                            |
| ChCl:Glyc:LacA                    | 1,08                                            |
| ChCl:LacA ekstrakt                | 22,31                                           |
| ChCl:Glyc ekstrakt                | 17,57                                           |
| ChCl:Glyc:LacA ekstrakt           | 35,00                                           |

Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów nie jest wprost proporcjonalna do zawartości substancji aktywnych. Ekstrakt roślinny w DES ChCl:Glyc:LacA posiadał najwyższą aktywność przeciwutleniającą, pomimo że stężenie substancji bioaktywnych było wyższe w ekstrakcie ChCl:LacA (Rysunek 9, Tabela 8). Prawdopodobnie spowodowane jest to antagonistycznym działaniem niektórych związków. Przykładowo, niekowalencyjne oddziaływania (wodorowe oraz hydrofobowe) mogą zachodzić pomiędzy rutyną a kwasami fenolowymi, co negatywnie wpływa na aktywność przeciwutleniającą całego ekstraktu<sup>194</sup>.

Dla otrzymanych ekstraktów określono również aktywność przeciwdrobnoustrojową, w stosunku do bakterii *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* oraz grzyba *Candida albicans*. Właściwości ekstraktów porównano z aktywnością czystych DESs. Badania zostały przeprowadzone przez zespół dr hab. inż. Katarzyny Krukiewicz, prof. PŚ. Zarówno DESs zawierające LacA w HBD, jak i ekstrakty otrzymane w tych rozpuszczalnikach, wykazywały aktywność wobec wszystkich testowanych patogenów. Stwierdzono, że jest to głównie wynikiem działania LacA, który jest szkodliwy dla wielu mikroorganizmów<sup>195</sup>. W przypadku ekstraktu w ChCl:Glyc oraz czystego DES nie odnotowano aktywności wobec bakterii, jednakże zaobserwowano inhibicję wzrostu *C. albicans*. Dodatkowo, zaobserwowano zahamowanie namnażania się komórek *C. albicans* przy niższych stężeniach ekstraktu w ChCl:Glyc, w porównaniu do czystego DES. Świadczy to o działaniu przeciwgrzybiczym substancji zawartych w ekstrakcie z liści pomidora.

### 7.1.1 Zastosowanie ekstraktów z liści pomidora w biodegradowalnych opakowaniach do żywności

Jak wspomniano we wstępie literaturowym, najtrudniejszym etapem związanym z użyciem DESs w ekstrakcji związków bioaktywnych jest ich rozdzielenie od rozpuszczalnika. W tym celu najczęściej stosuje się absorpcję na złożach lub ekstrakcję SPE, jednakże metody te stosowane są na skalę laboratoryjną. Co więcej, wymagają one użycia rozpuszczalników organicznych (np. metanolu, octanu etylu), co zaprzecza idei wykorzystania tylko naturalnych rozpuszczalników w procesie ekstrakcji. Z tych powodów, najbardziej korzystnym rozwiązaniem byłoby zastosowanie mieszaniny wyekstrahowanych związków razem z rozpuszczalnikiem, co eliminowałoby etap oddzielania rozpuszczalnika (np. za pomocą techniki SPE), a tym samym znacznie ograniczało ilość zużywanych chemikaliów, redukowało koszty i nakład pracy. W niniejszej pracy podjęto badania nad możliwością zastosowania ekstraktów z liści pomidora razem z DESs użytym do ekstrakcji, w foliach chitozanowych do pakowania żywności.

Ekologiczne opakowania mogą być otrzymywane m.in. z polisacharydów (np. alginianu sodu, chitozanu, celulozy), które dodatkowo modyfikuje się poprzez dodatek plastyfikatorów, najczęściej gliceryny<sup>196–198</sup>. Okazuje się, że hydrofilowe DESs mogą pełnić rolę plastyfikatorów folii polisacharydowych, dodatkowo polepszając ich wytrzymałość mechaniczną<sup>199</sup>. Zastosowanie ekstraktu roślinnego z kolei powoduje, że otrzymane opakowania posiadają właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i konserwujące.

Ekstrakty z liści pomidora w DESs zastosowano w foliach chitozanowych, które następnie zostały wykorzystane jako opakowanie przykładowego produktu spożywczego (winogron). Określone zostały parametry fizykochemiczne otrzymanych folii, ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe, a także ich użyteczność w ograniczaniu psucia się produktów spożywczych (badania przeprowadzone przez zespoły dr hab. inż. Gabrieli Dudek, prof. PŚ oraz dr hab. inż. Katarzyny Krukiewicz, prof. PŚ). Wyniki badań zostały przedstawione w publikacji [P5]<sup>200</sup>. Dodatkowo, rozwiązanie to zostało zgłoszone w Urzędzie Patentowym RP (numer zgłoszenia P451188).

Dodatek ekstraktów z liści pomidora w DESs (ChCl:LacA, ChCl:Glyc, ChCl:Glyc:LacA) do folii chitozanowych powodował zwiększenie ich wytrzymałości mechanicznej na zrywanie. Ponadto, ograniczona została przepuszczalność tlenu, dwutlenku węgla oraz pary wodnej

przez folię, co jest istotnym parametrem dla opakowań do żywności. Dzięki wprowadzonym ekstraktom, wykazującym właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz antyoksydacyjne, winogrona zapakowane w badaną folię utrzymywały świeżość przez dłuższy czas, w porównaniu do folii zawierających glicerynę lub czyste DESs jako plastyfikatory.

Podsumowując, zastosowanie badanych DESs (ChCl:LacA, ChCl:Glyc, ChCl:Glyc:LacA) do ekstrakcji związków bioaktywnych z liści pomidora (np. rutyny, kwasu chlorogenowego, hesperydyny), pozwoliło na uzyskanie ekstraktów zawierających wyższe stężenie związków fenolowych i flawonoidów, w porównaniu z klasycznymi rozpuszczalnikami. Dodatkowo, zastosowanie naturalnych DESs pozwala na użycie takich ekstraktów bezpośrednio w docelowych produktach, np. biodegradowalnych foliach do żywności, bez konieczności oddzielania rozpuszczalnika. Ekstrakty roślinne w DESs pełnią w opakowaniach podwójną rolę: plastyfikatorów i naturalnych konserwantów, przedłużając świeżość produktów spożywczych.

## 7.2 Ekstrakcja związków bioaktywnych z kwiatu nagietka lekarskiego z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych

Nagietek lekarski (*Calendula officinalis* L.) jest rośliną cenioną za swoje właściwości, wykorzystywane szczególnie w produktach kosmetycznych, wspomagających gojenie się ran i blizn<sup>201</sup>. Ekstrakt z płatków kwiatu nagietka bogaty jest w związki fenolowe i flawonoidy, a także karotenoidy, odpowiedzialne za pomarańczowy kolor kwiatu<sup>202</sup>. W ramach niniejszej pracy doktorskiej przetestowano efektywność nie tylko standardowych DESs, ale przede wszystkim stosunkowo nowych rozpuszczalników jakimi są przełączalne HDESs, w ekstrakcji substancji bioaktywnych z tej rośliny. Badania obejmowały również próby utworzenia układu rozpuszczalników, składającego się z DESs i HDESs, do selektywnej ekstrakcji z kwiatu nagietka substancji bioaktywnych o różnych właściwościach. Wyniki badań przedstawiono w publikacji [P6]<sup>203</sup>.

W najnowszych doniesieniach literaturowych opisywane jest zastosowanie „switchable” HDESs, jako efektywnych rozpuszczalników ekstrakcyjnych<sup>139,140,204</sup>. Ich zaletą jest możliwość oddzielenia wyizolowanych związków od rozpuszczalnika, poprzez zmianę np. pH roztworu, jak zostało opisane w rozdziale 3.2.4. Ze względu na hydrofobowy charakter HDESs, mogą one być wykorzystane do ekstrakcji związków o podobnych właściwościach, np. karotenoidów.

W oparciu o doniesienia literaturowe, wybrano szereg HDESs złożonych z kwasu dekanowego (DecA), kwasu oktanowego (OctA), kwasu laurynowego (LauA) dekan-1-olu

(Dec), oktan-1-olu (Oct) oraz mentolu (Ment). Zastosowane rozpuszczalniki przedstawiono w Tabeli 10.

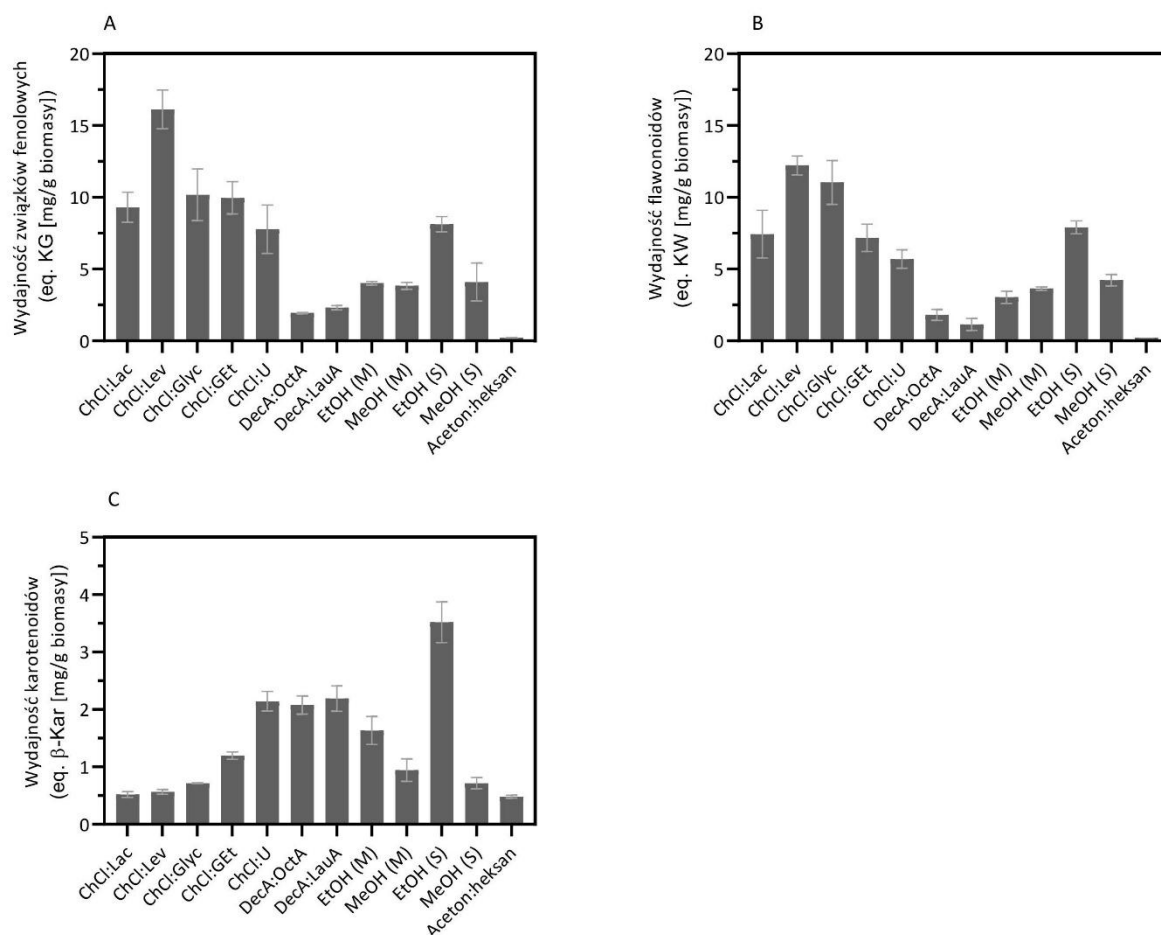
**Tabela 10.** HDESs zastosowane do badań nad ekstrakcją substancji bioaktywnych z kwiatu nagietka.

| Związek I | Związek II | Stosunek molowy<br>związku I do związku II | Skrót HDES |
|-----------|------------|--------------------------------------------|------------|
| DecA      | OctA       | 1:1                                        | DecA:OctA  |
|           | Oct        |                                            | DecA:Oct   |
|           | Dec        |                                            | DecA:Dec   |
|           | LauA       | 2:1*                                       | DecA:LauA  |
| Ment      | DecA       | 1:1                                        | Ment:DecA  |
|           | OctA       |                                            | Ment:OctA  |
|           | Dec        |                                            | Ment:Dec   |
|           | Oct        |                                            | Ment:Oct   |

\* Niemożliwe było otrzymanie HDES w stosunku molowym 1:1 mol/mol

W badaniach wstępnych ustalono, czy poszczególne HDESs są przełączalne, tzn. czy możliwa jest zmiana ich charakteru na hydrofilowy poprzez zmianę pH (dodatek roztworu wodorotlenku sodu). Spośród wszystkich testowanych HDESs, tylko DecA:OctA oraz DecA:LauA okazały się przełączalne. W pozostałych przypadkach dodatek zasady nie prowadził do zmiany właściwości cieczy na hydrofilowe lub powodował wytrącanie się składników HDES.

Rysunek 10 przedstawia wydajność ekstrahowanych związków bioaktywnych – związków fenolowych (A), flawonoidów (B) oraz karotenoidów (C), w zależności od użytego rozpuszczalnika. Oprócz wybranych HDESs, zastosowano szereg DESs zbudowanych z ChCl jako HBA oraz LacA, LevA, Glyc, GEt i U jako HBD (stosunek molowy HBA oraz HBD został przedstawiony w Tabeli 6). Wydajności poszczególnych grup związków uzyskane z zastosowaniem DESs i HDESs zostały porównane z wartościami otrzymanymi dla etanolu i metanolu (ekstrakcja w aparacie Soxhleta lub maceracja) oraz dla mieszaniny aceton:heksan, która konwencjonalnie wykorzystywana jest do izolowania karotenoidów poprzez macerację<sup>205</sup>. Całkowita zawartość związków fenolowych oraz flawonoidów została określona w podobny sposób, jak opisano w Rozdziale 7, natomiast zawartość karotenoidów wyznaczono korzystając z krzywej wzorcowej przygotowanej dla  $\beta$ -karotenu ( $\beta$ -Kar), jako substancji wzorcowej.



**Rysunek 10.** Wydajność związków bioaktywnych: A - związków fenolowych, B – flawonoidów oraz C - karotenoidów, ekstrahowanych z kwiatu nagietka, w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika (na podstawie publikacji [P6]<sup>203</sup>).

Warunki ekstrakcji z DESs: 80°C, 2 h, 400 rpm, stosunek masy materiału roślinnego do rozpuszczalnika 1:15 (m/v)

Warunki ekstrakcji z EtOH/MeOH (m): maceracja, temperatura pokojowa, 7 dni (wymiana rozpuszczalnika co 24 h), stosunek masy materiału roślinnego do rozpuszczalnika 1:15 (m/v).

Warunki ekstrakcji z EtOH/MeOH (s): ekstrakcja w aparacie Soxhletha, 8 h, 2 g biomasy, 200 mL rozpuszczalnika

Warunki ekstrakcji z mieszaniną aceton:heksan: temperatura pokojowa, 2 h, 400 rpm, stosunek masy materiału roślinnego do rozpuszczalnika 1:15 (m/v).

Przeprowadzone badania pokazały, że użyte HDESs pozwalały na uzyskanie dobrych wydajności hydrofobowych karotenoidów (2,1 mg/g w ekstrakcji z użyciem DecA:OctA, 2,2 mg/g z użyciem DecA:LauA). Zaskakujące było jednak, że wysoką wydajność tych związków uzyskano również stosując hydrofilowy ChCl:U, a także w ekstrakcji etanolem przeprowadzonej w aparacie Soxhletha. Zgodnie z danymi literaturowymi<sup>202,206</sup> oraz na podstawie przeprowadzonej analizy <sup>1</sup>H-NMR karotenoidów wydzielonych z DecA:OctA (proces wydzielania został opisany w dalszej części pracy), w płatkach nagietka obecne są

głównie ksantofile (np. luteina), które mają mniej hydrofobowy charakter, niż  $\beta$ -karoten. Z tego powodu możliwe jest ich wydzielanie z użyciem bardziej hydrofilowych rozpuszczalników. Mieszanina rozpuszczalników aceton:heksan okazała się mniej skuteczna w ekstrakcji karotenoidów (0,5 mg/g).

Zgodnie z oczekiwaniami, najwyższe wydajności związków fenolowych i flawonoidów uzyskano w ekstrakcji hydrofilowymi DESs. Wysoka wydajność izolowanych związków wynika z polarności zarówno ekstrahowanych substancji, jak i DESs, co zostało również zaobserwowane w przypadku liści pomidora. Najlepszym rozpuszczalnikiem okazał się ChCl:LevA. Należy również podkreślić, że zastosowanie DESs pozwala na skrócenie czasu trwania procesu, co jest dodatkową zaletą tych rozpuszczalników.

W ramach przeprowadzonych badań sprawdzono wpływ obecności wody w DES (ChCl:LevA) na efektywność ekstrakcji związków fenolowych oraz flawonoidów. Eksperyment przeprowadzono w podobny sposób, jak w przypadku liści pomidora. Uzyskane wyniki również były zbliżone – dodatek wody nie miał istotnego wpływu na wydajność izolowanych związków. Dopiero po przekroczeniu 40% wody (objętościowo względem całej mieszaniny), efektywność ekstrakcji malała, z powodu utraty właściwości DES, wskutek zerwania wiązań wodorowych pomiędzy HBA i HBD.

Badania obejmowały również określenie wpływu temperatury i czasu prowadzenia ekstrakcji na ilość izolowanych substancji aktywnych, z użyciem ChCl:LevA oraz DecA:OctA. Na podstawie uzyskanych wyników ustalono, że najbardziej korzystnie jest prowadzić proces przez 2 h. Taki czas zapewnia wydzielenie wszystkich analizowanych substancji z najwyższą wydajnością. Dalsze prowadzenie procesu nie powodowało zwiększenia wydajności badanych związków bioaktywnych.

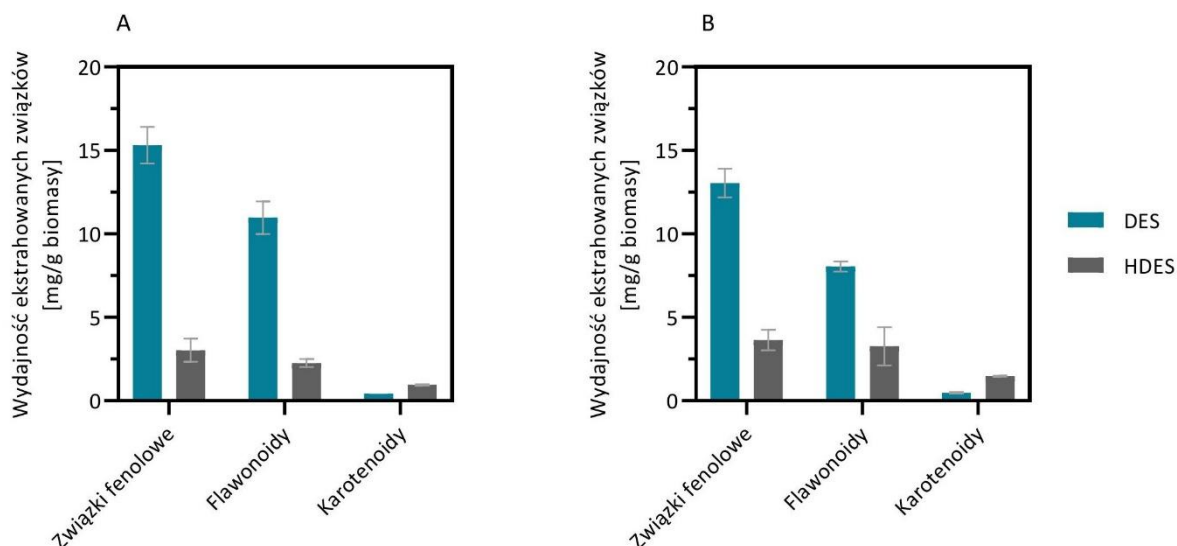
Uzasadnieniem badań wpływu temperatury był fakt, że w podwyższonej temperaturze następuje obniżenie lepkości DES, co korzystnie wpływa na proces wymiany masy. Dodatkowo, pod wpływem podwyższonej temperatury może dochodzić do zaburzenia oddziaływań pomiędzy izolowanymi substancjami, a ścianą komórkową roślin<sup>207</sup>. Zaobserwowano wzrost wydajności związków fenolowych oraz flawonoidów wraz ze wzrostem temperatury ekstrakcji w ChCl:LevA. Najwyższe wydajności uzyskano w temperaturze 80°C – wydajność związków fenolowych wynosiła 16,1 mg/g, natomiast flawonoidów 12,2 mg/g. W najniższej z testowanych temperatur (40°C), wydajności ekstrahowanych substancji wynosiły kolejno 5,9 mg/g oraz 2,9 mg/g. Wzrost temperatury

powyżej 80°C nie powodował znacznego zwiększenia ilości wydzielanych substancji. Podobny efekt uzyskano w ekstrakcji karotenoidów z HDES, stąd dalsze badania prowadzono w tej temperaturze.

#### 7.2.1 Selektywna ekstrakcja związków bioaktywnych z nagietka lekarskiego w podwójnym układzie DES-HDES

Selektywna ekstrakcja substancji o różnej hydrofobowości, w układach z zastosowaniem kilku rozpuszczalników, została przedstawiona w nielicznych doniesieniach literaturowych. Przykładowo, Cai i in. izolowali polifenole z owoców żółtodrzewu (*Zanthoxylum bungeanum*) z użyciem DES ChCl:LevA, przy równoczesnej ekstrakcji hydroksy- $\alpha$ -sanzolu (nr CAS: 83883-10-7) za pomocą kwasów tłuszczowych<sup>208</sup>. W innej pracy zastosowano DES zbudowany z ChCl, Bet oraz GEt, w celu wydzielenia flawonoidów z owoców ligustra (*Ligustri lucidum*) oraz HDES zawierający mentol i alkohol izopropylowy jako medium ekstrakcyjne terpenoidów<sup>209</sup>. W niniejszej pracy zaprojektowano układ DES-HDES, w którym zastosowano równocześnie ChCl:LevA oraz DecA:OctA w celu ekstrakcji zarówno związków fenolowych, flawonoidów, jak i karotenoidów w jednym procesie, w temperaturze zapewniającej wysokie wydajności wszystkich izolowanych substancji (80°C).

Ze względu na różnice w hydrofilowości wybranych rozpuszczalników oraz ich efektywności w ekstrakcji poszczególnych substancji (na podstawie wyników przedstawionych na Rysunku 10 oraz analizy LC-MS/MS<sup>203</sup>), związki fenolowe oraz flawonoidy powinny być wydzielane selektywnie przez ChCl:LevA, natomiast karotenoidy – przez DecA:OctA. Oba rozpuszczalniki zastosowano w jednym procesie, w tej samej ilości (po 30 mL; stosunek ilości biomasy do rozpuszczalnika 1:15 m/v). Dodatkowo, sprawdzono wpływ typu reaktora (reaktor okresowy z mieszadłem mechanicznym oraz reaktor koszykowy SpinChem®) na efektywność ekstrakcji w systemie podwójnym. Uzyskane wydajności związków fenolowych, flawonoidów oraz karotenoidów zostały przedstawione na Rysunku 11.

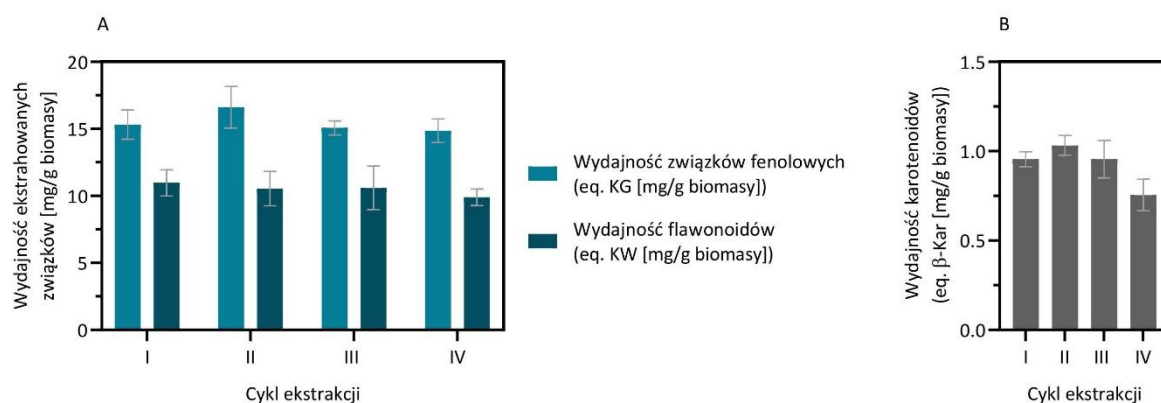


**Rysunek 11.** Wydajność związków bioaktywnych (związków fenolowych, flawonoidów oraz karotenoidów) ekstrahowanych z kwiatu nagietka w układzie podwójnym DES-HDES, w zależności od zastosowanego reaktora (A – reaktor okresowy; B – reaktor koszykowy SpinChem®) (na podstawie publikacji [P6]<sup>203</sup>).

*Warunki ekstrakcji: 80°C, 2 h, 400 rpm, stosunek masy materiału roślinnego do rozpuszczalnika 1:15 (m/v), DES: ChCl:LevA (1:2 mol/mol), HDES: DecA:OctA (1:1 mol/mol).*

Układ podwójny DES-HDES może zostać zastosowany w celu zwiększenia selektywności ekstrakcji związków bioaktywnych o różnej hydrofilowości. Zarówno w reaktorze okresowym z mieszadłem, jak i w reaktorze SpinChem®, wydajność związków fenolowych i flawonoidów jest znacząco wyższa w DES, natomiast karotenoidy były efektywniej izolowane przez HDES. W procesie prowadzonym w tradycyjnym reaktorze okresowym z mieszaniem w układzie podwójnym zaobserwowano niewielki spadek wydajności związków bioaktywnych, w porównaniu z wydajnościami uzyskanymi w ekstrakcji z użyciem pojedynczego rozpuszczalnika (Rysunek 10). Pomimo obserwowanej zwiększonej selektywności ekstrakcji, nieunikniona była izolacja wszystkich rodzajów substancji bioaktywnych przez oba zastosowane rozpuszczalniki w układzie podwójnym. Skutkuje to obniżoną skutecznością ekstrakcji (np. wydajność związków fenolowych izolowanych przez jeden rozpuszczalnik wyniosła 16,1 mg/g, natomiast w układzie podwójnym, w reaktorze tradycyjnym, wydajność w fazie DES wynosiła 15,3 mg/g). Jak można było się spodziewać, proces prowadzony w reaktorze koszykowym był mniej efektywny od tego w reaktorze zbiornikowym z mieszadłem. Prawdopodobnie doszło do agregacji cząstek biomasy, co zostało również zaobserwowane w przypadku delignifikacji biomasy miękkiej (rozdział 4).

Zastosowane DES i HDES tworzą dwie niemieszające się fazy, które mogą zostać w łatwy sposób rozdzielone po ekstrakcji. Po ich rozdzieleniu, przeprowadzono próbę recyklu obu rodzajów rozpuszczalników. Jak przedstawiono w rozdziale 7.1, hydrofilowe DESs mogą być oddzielone od wydzielonych substancji poprzez ekstrakcję SPE. Metoda ta została również użyta w celu odzysku  $\text{CHCl}_3:\text{LevA}$ , który został zastosowany w czterech następujących po sobie ekstrakcjach kwiatu nagietka w układzie DES-HDES. W przypadku fazy HDES, wykorzystano zdolność zastosowanego rozpuszczalnika ( $\text{DecA}:\text{OctA}$ ) do zmiany jego właściwości pod wpływem zwiększenia pH mieszaniny. W wyniku dodatku roztworu  $\text{NaOH}$  do HDES wydzielone karotenoidy wytrąciły się z roztworu w postaci pomarańczowego osadu. Po ich odsączeniu możliwe było przywrócenie hydrofobowego charakteru HDES poprzez dodatek kwasu chlorowodorowego. HDES zregenerowany w taki sposób został zastosowany w kolejnych cyklach ekstrakcji karotenoidów z kwiatu nagietka. Wydajności ekstrahowanych substancji, zarówno z użyciem DES, jak i HDES, w następujących po sobie procesach zostały przedstawione na Rysunku 12.



**Rysunek 12.** Wydajność związków bioaktywnych (A - związki fenolowe i flawonoidy; B – karotenoidy) ekstrahowanych z kwiatu nagietka w układzie podwójnym DES-HDES, w następujących po sobie cyklach (na podstawie publikacji [P6]<sup>203</sup>).

*Warunki ekstrakcji: 80°C, 2 h, 400 rpm, stosunek masy materiału roślinnego do rozpuszczalnika 1:15 (m/v).*

DES, oddzielany od ekstraktu za pomocą metody SPE, utrzymał wysoką efektywność ekstrakcji przez wszystkie przeprowadzone cykle. W przypadku HDES, w czwartym cyklu zaobserwowano spadek wydajności karotenoidów. W celu określenia przyczyny tego zjawiska, wykonano analizę  $^1\text{H-NMR}$  czystego HDES oraz rozpuszczalnika po trzecim cyklu ekstrakcyjnym (przed zastosowaniem w cyklu IV). Zaobserwowano zmianę przesunięcia chemicznego sygnału protonów pochodzących od grup karboksylowych kwasu dekanowego

oraz oktanowego (z 11,59 ppm w czystym HDES na 10,54 ppm po ekstrakcji). Można przypuszczać, że wielokrotnie regenerowany HDES jest zanieczyszczony jonami chlorkowymi (pochodzącymi z kwasu chlorowodorowego użytego do regulacji pH), co z kolei może sprzyjać tworzeniu oddziaływań niekowalencyjnych pomiędzy kwasami karboksylowymi tworzącymi HDES a  $\text{Cl}^-$ <sup>210</sup>. Dodatkowo, wykonano analizę  $^1\text{H}$ -NMR mieszaniny czystego HDES z NaCl, w celu weryfikacji tego stwierdzenia. Zaobserwowano, że sygnał protonu grup karboksylowych również uległ przesunięciu do 10,66 ppm, co świadczy o osłabieniu wiązań wodorowych występujących pomiędzy kwasem dekanowym i oktanowym w HDES. W efekcie, jego zdolność jako medium ekstrakcyjnego karotenoidów w IV cyklu procesowym jest ograniczona.

Podsumowując, istnieje możliwość zwiększenia selektywności ekstrakcji związków bioaktywnych poprzez zastosowanie rozpuszczalnika o odpowiedniej hydrofilowości. Dodatkowo, dzięki bardzo małej mieszalności wybranych DESs i HDESs, możliwe jest ich równoczesne zastosowanie w podwójnym układzie ekstrakcyjnym, który zapewnia wysoką efektywność wydzielania poszczególnych grup związków.

## Podsumowanie i wnioski

Celem pracy była waloryzacja lignocelulozowej biomasy roślinnej (słomy żytniej, trawy, łupin orzecha włoskiego, liści pomidora oraz płatków kwiatu nagietka lekarskiego) z użyciem cieczy głęboko eutektycznych. Transformacje obejmowały zarówno obróbkę wstępną biomasy, jak również hydrolizę enzymatyczną. Badane rozpuszczalniki zastosowano również w procesach ekstrakcji związków bioaktywnych z wybranych roślin.

Uzyskane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Zastosowanie DESs zbudowanych z chlorku choliny oraz wybranych kwasów karboksylowych (np. kwasu mlekowego) pozwala na uzyskanie wysokiego stopnia delignifikacji biomasy roślinnej. Najwyższe stopnie delignifikacji dla wszystkich rodzajów badanej biomasy lignocelulozowej uzyskano stosując DES ChCl:LacA (1:2 mol/mol). Dodatkowo, wyizolowana lignina może zostać łatwo oddzielona od DESs, co umożliwia zastosowanie rozpuszczalnika w kolejnym cyklu delignifikacji.
2. Zastosowany po raz pierwszy do delignifikacji z użyciem DESs reaktor koszykowy StatBioChem® pozwala na zwiększenie ilości usuniętej ligniny, szczególnie w procesie obróbki wstępnej biomasy twardej. Wprowadzenie modyfikacji w postaci unieruchomionego złoża biomasy (łupin orzecha włoskiego) pozwoliło na zwiększenie stopnia wydzielenia ligniny prawie dwukrotnie. Dodatkowo, użycie reaktora koszykowego ułatwiło rozdział materiału roślinnego od rozpuszczalnika, co jest szczególnie użyteczne w przypadku medium o wysokiej lepkości. Konstrukcja reaktora koszykowego pozwala łatwo zwiększyć skalę procesu, co jest istotne z technologicznego punktu widzenia.
3. W komercyjnym reaktorze koszykowym SpinChem® następuje agregacja cząstek biomasy, co skutkuje obniżeniem efektywności procesów zarówno delignifikacji, jak i ekstrakcji substancji bioaktywnych z użyciem DESs.
4. Delignifikacja biomasy z użyciem DESs prowadzi do zwiększenia porowatości oraz gęstości usypowej materiału, czego efektem jest polepszona efektywność następczego przetwarzania materiału roślinnego, np. poprzez hydrolizę enzymatyczną.
5. Większość DESs zbudowanych z ChCl, Bet i szeregu HBD (LacA, LevA, Glyc, GEt, U) ma dezaktywujący wpływ na celulazy z *A. Niger*, *T. reesei* oraz preparat wieloenzymatyczny Viscozyme® L. Sprawia to, że materiał roślinny po obróbce wstępnej z DESs musi zostać

oczyszczony z pozostałości rozpuszczalników, przed zastosowaniem enzymów celulolitycznych. Preparat Viscozyme® L wykazuje najwyższą odporność na negatywne działanie rozpuszczalników, szczególnie w przypadku ChCl:Glyc oraz Bet:Glyc. Jednakże, wskazane DESs są rzadko stosowane w celu delignifikacji biomasy, ze względu na niski stopień wydzielenia ligniny z materiału, w porównaniu z DESs kwasowymi.

6. DESs mogą zostać zastosowane jako alternatywa dla konwencjonalnych rozpuszczalników organicznych w ekstrakcji substancji bioaktywnych z roślin. Zarówno w przypadku przetwarzania liści pomidora, jak i kwiatu nagietka, większość użytych DESs pozwala na uzyskanie wyższych wydajności związków fenolowych i flawonoidów, w porównaniu z etanolem i metanolem. Najlepszymi rozpuszczalnikami okazały się ChCl:LacA i ChCl:LevA.
7. Ekstrakty z liści pomidora wykazują działanie przeciwutleniające, które może zostać przypisane związkom fenolowym oraz flawonoidom (głównie rutynie, hesperydynie oraz kwasowi chlorogenowemu). Dodatkowo, otrzymane ekstrakty mają działanie przeciwdrobnoustrojowe. Ekstrakt z liści pomidora w ChCl:Glyc wykazuje działanie grzybobójcze, podczas gdy czysty DES jest prawie nieaktywny. Należy jednak wziąć pod uwagę, że w przypadku niektórych DES działanie to może być związane ze składnikami samego DES. Przykładowo, w przypadku ekstraktu w DES ChCl:LacA, aktywność przeciwdrobnoustrojowa wynikała głównie z obecności kwasu mlekowego.
8. Ekstrakty z liści pomidora w DES mogą zostać zastosowane jako dodatki do biodegradowalnych folii polisacharydowych, gdzie pełnią podwójną rolę – plastyfikatora oraz konserwantu żywności. Ich dodatek polepsza właściwości fizykochemiczne folii chitozanowych (zwiększona odporność na zrywanie i plastyczność, a także ograniczenie przepuszczalności gazów). Prosta procedura przygotowania folii, wykorzystanie biomasy odpadowej oraz DESs zbudowanych z tanich i łatwo dostępnych składników sprawiają, że zaproponowane rozwiązanie może znaleźć zastosowanie do otrzymywania biodegradowalnych opakowań do żywności, zapewniających przedłużenie jej świeżości.
10. Możliwa jest selektywna ekstrakcja związków o różnych właściwościach, z zastosowaniem dwufazowego układu rozpuszczalników DES-HDES. W zaproponowanym układzie otrzymano wyższą wydajność bardziej polarnych związków fenolowych i flawonoidów w fazie DES (ChCl:LevA), natomiast karotenoidów w fazie HDES (DecA:OctA). Dodatkowo, zastosowanie przełączalnego HDESs umożliwia oddzielenie wydzielonych karotenoidów

w postaci osadu, co równocześnie pozwala na recykl rozpuszczalnika i jego ponowne zastosowanie.

11. DESs o charakterze hydrofilowym można oddzielać od izolowanych substancji poprzez ekstrakcję SPE i zawracać do kolejnych cykli procesu. Jednakże, jest to metoda kosztowna i stosowana na skalę laboratoryjną, dlatego korzystniej jest tak dobierać DES, żeby ekstrakty roślinne mogły być wykorzystywane razem z rozpuszczalnikiem, jak to zostało zaproponowane w przypadku biodegradowalnych folii zawierających ekstrakt z liści pomidora.

Podsumowując, przeprowadzone badania pozwoliły na opracowanie metod waloryzacji biomasy roślinnej z użyciem ekologicznych rozpuszczalników i katalizatorów, co wpisuje się w strategię zrównoważonego rozwoju, założenia zielonej chemii i gospodarki obiegu zamkniętego. W przeprowadzonych badaniach uwzględniono aspekty istotne z technologicznego punktu widzenia, takie jak czas trwania procesów, konieczność oczyszczania lignocelulozy przed obróbką enzymatyczną oraz możliwość powiększenia skali procesu. Dodatkowo, zaproponowano zastosowanie otrzymanych ekstraktów roślinnych w przykładowych produktach, czego efektem, oprócz publikacji naukowej, jest zgłoszenie patentowe (P.451188).

## Całkowity dorobek naukowy

### 1. Publikacje naukowe

- 1) A. Wawoczny, J. Wilk, D. Y. Shyntum, S. Shakibania, K. Krukiewicz, J. Gibas, M. Machulik, J. Płonka, S. Bajkacz, G. Dudek, D. Gillner. Valorization of waste tomato leaves with natural deep eutectic solvents. *Food Chem.* **2025**, 472, 142884.
- 2) A. Wawoczny, J. Wilk, S. Bajkacz, D. Gillner. Natural bioactive chemicals extracted from *Calendula officinalis* using efficient binary deep eutectic solvent system. *J. Mol. Liq.* **2025**, 433, 127929.
- 3) J. Jakubska, A. Wawoczny, D. Kluska, P. Grzybek, A. Hudecki, M. Kołodziej, K. Jasiak-Jaroń, A. Abdullah, D. Y. Shyntum, K. Gołombek, W. Pakieła, K. Krukiewicz, D. Gillner, G. Dudek. Dual functionality of deep eutectic solvents in chitosan-based biodegradable films for food packaging applications. *Ind. Crops Prod.* **2025**, 232, 121268.
- 4) M. Przypis, A. Wawoczny, K. Matuszek, A. Chrobok, M. Swadźba-Kwaśny, D. Gillner. Direct Transformation of Biomass into Levulinic Acid Using Acidic Ionic Liquids: An Example of Sustainable and Efficient Waste Valorization. *ChemSusChem* **2025**, e202500951.
- 5) A. Wawoczny, K. Szymańska, D. Gillner. Novel stationary basket reactor for effective biomass delignification with deep eutectic solvent. *Bioresour. Technol.* **2024**, 413, 131455.
- 6) S. Kowalczyk, M. Grymel, J. Bilik, W. Kula, A. Wawoczny, P. Grymel, D. Gillner. Selected plants as sources of natural and active ingredients for cosmetics of the future. *Appl. Sci.* **2024**, 14(8), 3487.
- 7) A. Wawoczny, D. Gillner. The most potent natural pharmaceuticals, cosmetics, and food ingredients isolated from plants with deep eutectic solvents. *J. Agri. Food Chem.* **2023**, 71, 29, 10877–10900.
- 8) A. Wawoczny, M. Przypis, D. Gillner. Enzymatic valorization of lignocellulosic biomass - the influence of deep eutectic solvents and ionic liquids on the activity of cellulolytic enzymes. *Sustainability* **2023**, 15(24), 16726.
- 9) M. Przypis, A. Wawoczny, D. Gillner. Biomass and cellulose dissolution - the important issue in renewable materials treatment. *Appl. Sci.* **2023**, 13(2), 1055.

## 2. Współautorstwo rozdziałów monografii

- 1) A. Wawoczny, R. Undas, K. Krawczyk, D. Gillner. Biomass valorization using green solvents and biocatalysts. *Contemporary problems of power engineering and environmental protection 2024*. Edyt. K. Pikoń, M. Lewandowski. Wyd. Politechniki Śląskiej, 2025.
- 2) A. Wawoczny, M. Kuc, D. Gillner. Effective biomass delignification with deep eutectic solvents. Global challenges for a sustainable society. *EURECA-PRO. The European university for responsible consumption and production*. Edyt. J. A. Benítez-Andrades, P. García-Llamas, Á. Taboada, L. Estévez-Mauriz, R. Baelo. Wyd. Springer, 2023.
- 3) M. Przypis, A. Gruszka, D. Gillner. Gospodarka wodno-ściekowa oraz biotechnologia środowiskowa: Chemoenzymatyczne przetwarzanie biomasy lignocelulozowej do użytecznych produktów. *Ochrona Klimatu i Środowiska, Nowoczesna Energetyka*. Edyt. S. Werle, J. Ferdyn-Grygierek, M. Szczygiał. Wyd. Politechniki Śląskiej, 2021.

**Łączny IF = 50,8**

**Łączna punktacja MNiSW = 1265**

## 3. Udzielone patenty:

- 1) I. Wandzik, D. Gillner, A. Wawoczny, R. Michalik, J. Janik, G. Różański. Kompozycja na bazie chitozanu do wytwarzania biodegradowalnych otoczek na granulowanych nawozach azotowych oraz sposób wytwarzania granulowanych nawozów azotowych z biodegradowalnymi otoczkami na bazie chitozanu. Numer zgłoszenia: P.445793. 01.07.2025 r.

## 4. Zgłoszenia patentowe:

- 1) J. Jakubska, A. Wawoczny, D. Gillner, G. Dudek. Sposób wytwarzania biodegradowalnego materiału. Numer zgłoszenia: P.451188. 12.02.2025 r.
- 2) I. Wandzik, D. Gillner, A. Wawoczny, R. Michalik, J. Janik, G. Różański. Sposób otrzymywania biodegradowalnych otoczek na bazie chitozanu do nawozów azotowych oraz kompozycja na bazie chitozanu. Numer zgłoszenia: P.445791. 07.08.2023 r.

#### 5. Udział w konferencjach naukowych międzynarodowych:

- 1) XII International Environmental Protection & Energy Conference. 06.12.2024 r., Gliwice. Prezentacja w formie posteru: A. Wawoczny, R. Undas, K. Krawczyk, D. Gillner. *Plant waste valorization with green solvents and biological catalysts*.
- 2) Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry. 17-19.06.2024 r., Kraków. Prezentacja w formie posteru: A. Wawoczny, M. Przypis, D. Gillner. *Enzymatic valorization of lignocellulosic biomass – The influence of deep eutectic solvents and ionic liquids on the activity of cellulolytic enzymes*.
- 3) Natural Science Baltic Conference. 20-21.04.2024 r., on-line. Prezentacja w formie posteru: A. Wawoczny, W. Kula, P. Grymel, S. Kowalczyk, M. Grymel, D. Gillner. *Plants as a natural source of bioactive valuable ingredients useful in cosmetic industry*.
- 4) 8<sup>th</sup> Green and Sustainable Chemistry Conference. 13-15.05.2024 r., Drezno, Niemcy. Prezentacja w formie posteru: A. Wawoczny, J. Wilk, S. Bajkacz, D. Gillner. *Ecological method of valorization of waste from tomato cultivation using deep eutectic solvents*.
- 5) Baltic Chemistry Conference. 27-28.05.2023 r., on-line. Prezentacja w formie posteru: A. Wawoczny, D. Olesińska, D. Gillner. *Extraction of Valuable Bioactive Compounds from Plants with Deep Eutectic Solvents*. **Prezentacja nagrodzona wyróżnieniem.**
- 6) The Second EURECA-PRO Conference on Responsible Consumption and Production. 19-21.10.2022 r., León, Hiszpania. Prezentacja w formie posteru: A. Wawoczny, M. Kuc, D. Gillner. *Effective biomass delignification with deep eutectic solvents*.
- 7) Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry. 13-15.06.2022 r., Jura Krakowsko-Częstochowska, Prezentacja: A. Wawoczny, M. Kuc, K. Szymańska, D. Gillner. *Stationary basket reactor for efficient pretreatment of biomass before chemoenzymatic transformation*.

#### 6. Udział w konferencjach naukowych krajowych:

- 1) Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców nt. Zagadnienia i Problemy Badawcze. Wyzwania dla Młodych Naukowców. 06.02.2024 r., on-line. Prezentacja: A. Wawoczny, J. Wilk, S. Bajkacz, D. Gillner. *Ekstrakcja cennych związków bioaktywnych za pomocą rozpuszczalników głęboko eutektycznych*. **Prezentacja nagrodzona wyróżnieniem.**
- 2) I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Kosmotrend – Naturalne Surowce Kosmetyczne. 06.09.2024 r., Gliwice. Prezentacja w formie posteru: A. Wawoczny, J. Wilk, S. Bajkacz,

D. Gillner. *Otrzymywanie ekstraktów roślinnych z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych*. **Prezentacja nagrodzona wyróżnieniem.**

3) XXII Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Techniczna Ochrona Środowiska. Nauka i Przemysł dla Ochrony Ziemi. 24-26.04.2024 r., Ustroń-Jaszowiec. Prezentacja: A. Wawoczny, P. Sidło, D. Gillner. *Odpady z ogrodu jako ekologiczne źródło cennych substancji biologicznie aktywnych*. Prezentacja w formie posteru: A. Wawoczny, P. Sidło, D. Gillner. *Waloryzacja odpadów z orzecha włoskiego z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych*. **II miejsce w konkursie na najlepszy poster.**

4) 65. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego. 18-22.09.2023 r., Toruń. Prezentacja w formie posteru: A. Wawoczny, D. Gillner. *Otrzymywanie ekstraktów roślinnych z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych*.

5) Zjazd Zimowy Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego 2022, 10.12.2022 r., Opole. Prezentacja w formie posteru: A. Wawoczny, D. Gillner. *Ekstrakcja flawonoidów z nagietka lekarskiego za pomocą rozpuszczalników głęboko eutektycznych*.

6) Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców nt. Biologia, Chemia i Środowisko. Spojrzenie Młodych Naukowców, III Edycja. 20-22.05.2022 r., on-line. Prezentacja: A. Wawoczny, D. Gillner. *Ekstrakcja ligniny z biomasy za pomocą rozpuszczalników głęboko eutektycznych*. Prezentacja w formie posteru: A. Wawoczny, K. Stanula, R. Michalik, I. Wandzik, D. Gillner. *Rozpuszczalniki głęboko eutektyczne stosowane w celu rozpuszczania i modyfikacji polimerów naturalnych*. **Prezentacja nagrodzona wyróżnieniem.**

7) Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców nt. Analiza Zagadnienia, Analiza Wyników – Wystąpienie Młodego Naukowca. Edycja IV. 05-06.03.2022 r., on-line. Prezentacja w formie posteru: A. Gruszka, D. Gillner. *Ciecze głęboko eutektyczne użyteczne w przetwarzaniu biomasy lignocelulozowej*.

#### 7. Naukowe staże zagraniczne:

1) Staż naukowy na Politechnice Kreteńskiej, Grecja, w ramach programu EURECA-PRO (05-18.05.2025 r.).

2) Uczestnictwo w programie BIP ERASMUS+ EURECA-PRO Young Researchers Forum w University of León, Hiszpania (17-21.10.2022 r.).

## 8. Inne aktywności i osiągnięcia

- 1) Stypendium dla najlepszych doktorantów Politechniki Śląskiej (w latach 2023/2024 oraz 2024/2025).
- 2) Grant mobilnościowy na udział w konferencji zagranicznej (*8<sup>th</sup> Green and Sustainable Chemistry Conference*, 13-15.05.2024 r., Drezno, Niemcy), w ramach otrzymanego stypendium dla najlepszych doktorantów.
- 3) Nagroda Rektora II Stopnia dla najlepszych absolwentów, za bardzo dobre wyniki w nauce, wzorowe wypełnianie obowiązków studenta i wyróżniającą się aktywność naukową (2021 r.).
- 4) Nagroda I Stopnia w konkursie na najlepszą pracę dyplomową z obszaru chemii, organizowanym przez Stowarzyszenie Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego (2022 r.).
- 5) Cztery granty projakościowe za publikacje wydane w czasopismach TOP5 i TOP10 w ramach programu Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza (publikacje w czasopismach *Journal of Molecular Liquids*, *Bioresource Technology*, *Food Chemistry*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*).
- 6) Grant projakościowy za publikację wydaną we współpracy z autorem reprezentującym inną dyscyplinę naukową (A. Wawoczny i in. *Bioresour. Technol.* **2024**, 413, 131455) w ramach programu Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza.
- 7) Grant projakościowy za publikację wydaną we współpracy z autorem reprezentującym partnera nieakademickiego (S. Kowalczyk i in. *Appl. Sci.* **2024**, 14(8), 3487) w ramach programu Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza.
- 8) Pełnienie funkcji opiekuna pomocniczego w dwóch projektach realizowanych we współpracy z uczniami szkół ponadpodstawowych (*Projekt Politechnika*) w latach 2023/2024 oraz 2024/2025.
- 9) Pełnienie funkcji opiekuna pomocniczego w projekcie PBL (kształcenie zorientowane projektowo) *Opracowanie efektywnych i ekologicznych metod utleniania ligniny pozyskiwanej z odpadów roślinnych*, w roku akademickim 2024/2025.
- 10) Pełnienie funkcji opiekuna pomocniczego w dwóch programach mentorskich „Rozwiń Skrzydła” realizowanych z uczniami ALO w latach 2021/2022 oraz 2022/2023.

11) Udział w komitetach organizacyjnych dwóch konferencji naukowych:

- międzynarodowej konferencji *Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry*. 13-15.06.2022 r., Jura Krakowsko-Częstochowska

- I Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej *Kosmotrend – Naturalne Surowce Kosmetyczne*. 06.09.2024 r., Gliwice.

12) Udział w wydarzeniach promujących Politechnikę Śląską: a. Noc Naukowców Politechniki Śląskiej, 12.10.2024 r.; b. Chemikalia 21.06.2024 r.; c. wywiad popularno-naukowy w RadioeM, audycja „Ciekawi świata” (data publikacji on-line: 10.05.2023 r.).

## Literatura

- (1) Avitabile, V., Baldoni, E., Baruth, B., Bausano, G. i in. *Biomass Production, Supply, Uses and Flows in the European Union Integrated Assessment*. Edyt. Migliavacca M., Mubareka S., Sánchez López J. Wyd. Publications Office of the European Union, 2023 <https://doi.org/10.2760/811744>.
- (2) Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., Tambyrajah, V. Novel Solvent Properties of Choline Chloride/Urea Mixtures. *Chem. Commun.* **2003**, 1, 70–71. <https://doi.org/10.1039/b210714g>.
- (3) Kalhor, P., Ghandi, K. Deep Eutectic Solvents for Pretreatment, Extraction, and Catalysis of Biomass and Food Waste. *Molecules* **2019**, 24, 4012. <https://doi.org/10.3390/molecules24224012>.
- (4) Smith, E. L., Abbott, A. P., Ryder, K. S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>.
- (5) Qin, H., Hu, X., Wang, J., Cheng, H., Chen, L., Qi, Z. Overview of Acidic Deep Eutectic Solvents on Synthesis, Properties and Applications. *Green Energy Environ.* **2020**, 5, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2019.03.002>.
- (6) Kaur, S., Kumari, M., Kashyap, H. K. Microstructure of Deep Eutectic Solvents: Current Understanding and Challenges. *J. Phys. Chem. B* **2020**, 124 (47), 10601–10616. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c07934>.
- (7) Yu, D., Mu, T. Strategy to Form Eutectic Molecular Liquids Based on Noncovalent Interactions. *J. Phys. Chem. B* **2019**, 123 (23), 4958–4966. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b02891>.
- (8) Vaz, I. C. M., Lobo Ferreira, A. I. M. C., Silva, G. M. C., Morgado, P., Abranches, D. O., Bastos, M., Santos, L. M. N. B. F., Filipe, E. J. M., Coutinho, J. A. P. The Path towards Type V Deep Eutectic Solvents: Inductive Effects and Steric Hindrance in the System Tert-Butanol + Perfluoro Tert-Butanol. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2023**, 25 (16), 11227–11236. <https://doi.org/10.1039/d3cp00701d>.
- (9) Devi, M., Moral, R., Thakuria, S., Mitra, A., Paul, S. Hydrophobic Deep Eutectic Solvents as Greener Substitutes for Conventional Extraction Media: Examples and Techniques. *ACS Omega*. **2023**, 8, 9702–9728. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07684>.
- (10) Tang, W., An, Y., Row, K. H. Emerging Applications of (Micro) Extraction Phase from Hydrophilic to Hydrophobic Deep Eutectic Solvents: Opportunities and Trends. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2021**, 136, 116187. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116187>.
- (11) Chen, Y., Mu, T. Revisiting Greenness of Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents. *Green Chem. Eng.* **2021**, 2, 174–186. <https://doi.org/10.1016/j.gce.2021.01.004>.
- (12) Koh, Q. Q., Kua, Y. L., Gan, S., Tan, K. W., Lee, T. Z. E., Cheng, W. K., Lau, H. L. N. Sugar-Based Natural Deep Eutectic Solvent (NADES): Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, Toxicity, Biodegradability and Potential Use as Green Extraction Media for Phytonutrients. *Sustain. Chem. Pharm.* **2023**, 35, 101218. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101218>.
- (13) Florindo, C., Oliveira, F. S., Rebelo, L. P. N., Fernandes, A. M., Marrucho, I. M. Insights into the Synthesis and Properties of Deep Eutectic Solvents Based on Cholinium Chloride and

- Carboxylic Acids. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2014**, 2(10), 2416–2425. <https://doi.org/10.1021/sc500439w>.
- (14) Gajardo-Parra, N. F., Cotroneo-Figueroa, V. P., Aravena, P., Vesovic, V., Canales, R. I. Viscosity of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents: Experiments and Modeling. *J. Chem. Eng. Data* **2020**, 65(11), 5581–5592. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.0c00715>.
- (15) Vilková, M., Płotka-Wasyłka, J., Andruch, V. The Role of Water in Deep Eutectic Solvent-Base Extraction. *J. Mol. Liq.* **2020**, 304, 112747. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112747>.
- (16) Ali, M. C., Chen, J., Zhang, H., Li, Z., Zhao, L., Qiu, H. Effective Extraction of Flavonoids from *Lycium Barbarum* L. Fruits by Deep Eutectic Solvents-Based Ultrasound-Assisted Extraction. *Talanta* **2019**, 203, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.012>.
- (17) Haz, A., Stržincová, P., Majová, V., Butor Skulcova, A., Jablonsky, M. Thermal stability of selected deep eutectic solvents. *Int. J. Rec. Sci. Res.* **2016**, 7(11), 4441–14444.
- (18) Marchel, M., Cieśliński, H., Boczkaj, G. Thermal Instability of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents and Its Influence on Their Toxicity—Important Limitations of DESs as Sustainable Materials. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2022**, 61 (30), 11288–11300. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.2c01898>.
- (19) Pan, Z., Bo, Y., Liang, Y., Lu, B., Zhan, J., Zhang, J., Zhang, J. Intermolecular Interactions in Natural Deep Eutectic Solvents and Their Effects on the Ultrasound-Assisted Extraction of Artemisinin from *Artemisia Annua*. *J. Mol. Liq.* **2021**, 326, 115283. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115283>.
- (20) Makoś, P., Słupek, E., Gębicki, J. Hydrophobic Deep Eutectic Solvents in Microextraction Techniques—A Review. *Microchem. J.* **2020**, 152, 104384. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104384>.
- (21) Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S. N., Pauli, G. F. Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J. Nat. Prod.* **2018**, 81(3), 679–690. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945>.
- (22) Omar, K. A., Sadeghi, R. Physicochemical Properties of Deep Eutectic Solvents: A Review. *J. Mol. Liq.* **2022**, 360, 119524. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119524>.
- (23) Azzouz, A., Hayyan, M. Are Deep Eutectic Solvents Biodegradable? *Process Safety Environ. Protect.* **2023**, 176, 1021–1025. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.06.079>.
- (24) Ferreira, I. J., Meneses, L., Paiva, A., Diniz, M., Duarte, A. R. C. Assessment of Deep Eutectic Solvents Toxicity in Zebrafish (*Danio Rerio*). *Chemosphere* **2022**, 299, 134415. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134415>.
- (25) Lapeña, D., Errazquin, D., Lomba, L., Lafuente, C., Giner, B. Ecotoxicity and Biodegradability of Pure and Aqueous Mixtures of Deep Eutectic Solvents: Glyceline, Ethaline, and Reline. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, 28 (7), 8812–8821. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11144-w>.
- (26) Kudłak, B., Owczarek, K., Namieśnik, J. Selected Issues Related to the Toxicity of Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents—a Review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, 22 (16), 11975–11992. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4794-y>.

- (27) Juneidi, I., Hayyan, M., Hashim, M. A. Evaluation of Toxicity and Biodegradability for Cholinium-Based Deep Eutectic Solvents. *RSC Adv.* **2015**, 5 (102), 83636–83647. <https://doi.org/10.1039/c5ra12425e>.
- (28) Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., AlNashef, I. M., Mirghani, M. E. S., Saheed, O. K. Are Deep Eutectic Solvents Benign or Toxic? *Chemosphere* **2013**, 90 (7), 2193–2195. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.004>.
- (29) Marchel, M., Cieśliński, H., Boczkaj, G. Deep Eutectic Solvents Microbial Toxicity: Current State of Art and Critical Evaluation of Testing Methods. *J. Hazard. Mat.* **2022**, 425, 127963. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127963>.
- (30) Martínez, G. M., Townley, G. G., Martínez-Espinosa, R. M. Controversy on the Toxic Nature of Deep Eutectic Solvents and Their Potential Contribution to Environmental Pollution. *Heliyon*. **2022**, 8(12), e12567. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12567>.
- (31) Wang, Z., Li, S., Li, T., Hu, T., Ge, X. Deep Eutectic Solvents (DESs) for Green Recycling of Wasted Lithium-Ion Batteries (LIBs): Progress on Pushing the Overall Efficiency. *Min. Metall. Explor.* **2022**, 39, 2149–2165. <https://doi.org/10.1007/s42461-022-00660-7>.
- (32) Płotka-Wasyłka, J., Rutkowska, M., de la Guardia, M. Are Deep Eutectic Solvents Useful in Chromatography? A Short Review. *J. Chromatogr. A* **2021**, 1639, 461918. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461918>.
- (33) Abo-Hamad, A., Hayyan, M., AlSaadi, M. A. H., Hashim, M. A. Potential Applications of Deep Eutectic Solvents in Nanotechnology. *Chem. Eng. J.* **2015**, 273, 551–567. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.03.091>.
- (34) Rolińska, K., Jakubowska, E., Żmieńko, M., Łęczycka-Wilk, K. Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents as Plasticizer and Active Agent in Chitosan Films. *Food Chem.* **2024**, 444, 138375. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138375>.
- (35) Taklimi, S. M., Divsalar, A., Ghalandari, B., Ding, X., Di Gioia, M. L., Omar, K. A., Saboury, A. A. Effects of Deep Eutectic Solvents on the Activity and Stability of Enzymes. *J. Mol. Liq.* **2023**, 377, 121562. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121562>.
- (36) Chen, H. *Biotechnology of Lignocellulose. Theory and Practice.* **2016**, Wyd. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6898-7>
- (37) Yu, B., Fan, G., Zhao, S., Lu, Y., He, Q., Cheng, Q., Yan, J., Chai, B., Song, G. Simultaneous Isolation of Cellulose and Lignin from Wheat Straw and Catalytic Conversion to Valuable Chemical Products. *Appl. Biol. Chem.* **2021**, 64 (15). <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00579-x>.
- (38) Ma, H., Fu, P., Zhao, J., Lin, X., Wu, W., Yu, Z., Xia, C., Wang, Q., Gao, M., Zhou, J. Pretreatment of Wheat Straw Lignocelluloses by Deep Eutectic Solvent for Lignin Extraction. *Molecules* **2022**, 27 (22), 7955. <https://doi.org/10.3390/molecules27227955>.
- (39) Asada, C., Yoshida, Y., Nakamura, Y. Efficient Conversion of Moso Bamboo Components into Glucose, Lignocellulose Nanofiber, and Low-Molecular-Weight Lignin through Deep Eutectic Solvent Treatment. *Biomass Convers. Biorefin.* **2023**, 13 (9), 7713–7724. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01629-0>.

- (40) Kohli, K., Katuwal, S., Biswas, A., Sharma, B. K. Effective Delignification of Lignocellulosic Biomass by Microwave Assisted Deep Eutectic Solvents. *Bioresour. Technol.* **2020**, *303*, 122897. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122897>.
- (41) Nishide, R. N., Truong, J. H., Abu-Omar, M. M. Organosolv Fractionation of Walnut Shell Biomass to Isolate Lignocellulosic Components for Chemical Upgrading of Lignin to Aromatics. *ACS Omega* **2021**, *6* (12), 8142–8150. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05936>.
- (42) Imman, S., Khongchamnan, P., Wanmolee, W., Laosiripojana, N., Kreetachat, T., Sakulthaew, C., Choekjaroenrat, C., Suriyachai, N. Fractionation and Characterization of Lignin from Sugarcane Bagasse Using a Sulfuric Acid Catalyzed Solvothermal Process. *RSC Adv.* **2021**, *11* (43), 26773–26784. <https://doi.org/10.1039/d1ra03237b>.
- (43) Do, N. H., Pham, H. H., Le, T. M., Lauwaert, J., Diels, L., Verberckmoes, A., Do, N. H. N., Tran, V. T., Le, P. K. The Novel Method to Reduce the Silica Content in Lignin Recovered from Black Liquor Originating from Rice Straw. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 21263. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77867-5>.
- (44) Ramos, A., Monteiro, E., Rouboa, A. Biomass Pre-Treatment Techniques for the Production of Biofuels Using Thermal Conversion Methods – A Review. *Energy Conver. Manag.* **2022**, *270*, 116271. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2022.116271>.
- (45) Mishra, K., Singh Siwal, S., Kumar Saini, A., Thakur, V. K. Recent Update on Gasification and Pyrolysis Processes of Lignocellulosic and Algal Biomass for Hydrogen Production. *Fuel* **2023**, *332*, 126169. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.126169>.
- (46) Gallego-García, M., Moreno, A. D., Manzanares, P., Negro, M. J., Duque, A. Recent Advances on Physical Technologies for the Pretreatment of Food Waste and Lignocellulosic Residues. *Bioresour. Technol.* **2023**, *369*, 128397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128397>.
- (47) Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D. B. Biomass Pretreatment: Fundamentals toward Application. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29* (6), 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>.
- (48) Mankar, A. R., Pandey, A., Modak, A., Pant, K. K. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review on Recent Advances. *Bioresour. Technol.* **2021**, *334*, 125235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125235>.
- (49) Woiciechowski, A. L., Dalmas Neto, C. J., Porto de Souza Vandenberghe, L., de Carvalho Neto, D. P., Novak Sydney, A. C., Letti, L. A. J., Karp, S. G., Zevallos Torres, L. A., Soccol, C. R. Lignocellulosic Biomass: Acid and Alkaline Pretreatments and Their Effects on Biomass Recalcitrance – Conventional Processing and Recent Advances. *Bioresour. Technol.* **2020**, *304*, 122848. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122848>.
- (50) Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., Srivastava, M. A Review on Delignification of Lignocellulosic Biomass for Enhancement of Ethanol Production Potential. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, *32*, 713–728. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.051>.
- (51) Płotka-Wasyłka, J., de la Guardia, M., Andruch, V., Vilková, M. Deep Eutectic Solvents vs Ionic Liquids: Similarities and Differences. *Microchem. J.* **2020**, *159*, 105539. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105539>.

- (52) Zhou, L., Pan, F., Liu, Y., Kang, Z., Zeng, S., Nie, Y. Study on the Regularity of Cellulose Degradation in Ionic Liquids. *J. Mol. Liq.* **2020**, *308*, 113153. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113153>.
- (53) Remsing, R. C., Swatloski, R. P., Rogers, R. D., Moyna, G. Mechanism of Cellulose Dissolution in the Ionic Liquid 1-n-Butyl-3- Methylimidazolium Chloride: A  $^{13}\text{C}$  and  $^{35/37}\text{Cl}$  NMR Relaxation Study on Model Systems. *Chem. Commun.* **2006**, 1271–1273. <https://doi.org/10.1039/b600586c>.
- (54) Hak, C., Panchai, P., Nutongkaew, T., Grisdanurak, N., Tulaphol, S. One-Pot Levulinic Acid Production from Rice Straw by Acid Hydrolysis in Deep Eutectic Solvent. *Chem. Eng. Commun.* **2024**, *211* (3), 366–378. <https://doi.org/10.1080/00986445.2022.2056454>.
- (55) Sert, M., Arslanoğlu, A., Ballice, L. Conversion of Sunflower Stalk Based Cellulose to the Valuable Products Using Choline Chloride Based Deep Eutectic Solvents. *Renew. Energy* **2018**, *118*, 993–1000. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.10.083>.
- (56) Körner, S., Albert, J., Held, C. Catalytic Low-Temperature Dehydration of Fructose to 5-Hydroxymethylfurfural Using Acidic Deep Eutectic Solvents and Polyoxometalate Catalysts. *Front. Chem.* **2019**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00661>.
- (57) Zhao, X., Meng, X., Ragauskas, A. J., Lai, C., Ling, Z., Huang, C., Yong, Q. Unlocking the Secret of Lignin-Enzyme Interactions: Recent Advances in Developing State-of-the-Art Analytical Techniques. *Biotechnol. Adv.* **2022**, *54*, 107830. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107830>.
- (58) Yuan, Y., Jiang, B., Chen, H., Wu, W., Wu, S., Jin, Y., Xiao, H. Recent Advances in Understanding the Effects of Lignin Structural Characteristics on Enzymatic Hydrolysis. *Biotechnol. Biofuels.* **2021**, *14*, 205. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02054-1>.
- (59) Pola, L., Collado, S., Oulego, P., Díaz, M. Kraft Black Liquor as a Renewable Source of Value-Added Chemicals. *Chem. Eng. J.* **2022**, *448*, 137728. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.137728>.
- (60) Li, W. X., Xiao, W. Z., Yang, Y. Q., Wang, Q., Chen, X., Xiao, L. P., Sun, R. C. Insights into Bamboo Delignification with Acidic Deep Eutectic Solvents Pretreatment for Enhanced Lignin Fractionation and Valorization. *Ind. Crops. Prod.* **2021**, *170*, 113692. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113692>.
- (61) Li, L., Yu, L., Wu, Z., Hu, Y. Delignification of Poplar Wood with Lactic Acid-Based Deep Eutectic Solvents. *Wood Res.* **2019**, *64*(3), 499-514.
- (62) Okur, M., Eslek Koyuncu, D. D. Investigation of Pretreatment Parameters in the Delignification of Paddy Husks with Deep Eutectic Solvents. *Biomass Bioenergy* **2020**, *142*, 105811. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105811>.
- (63) Sun, X., Zhou, Z., Tian, D., Zhao, J., Zhang, J., Deng, P., Zou, H., Lu, C. Acidic Deep Eutectic Solvent Assisted Mechanochemical Delignification of Lignocellulosic Biomass at Room Temperature. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *234*, 123593. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123593>.
- (64) Ahorsu, R., Constanti, M., de María, P. D., Medina, F. Synergy of Ball Milling, Microwave Irradiation, and Deep Eutectic Solvents for a Rapid and Selective Delignification: Walnut Shells

- as Model for Lignin-Enriched Recalcitrant Biomass. *Biomass Conv. Biorefin.* **2022**, *14*, 11849–11861. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03566-y>.
- (65) Wang, W., Lee, D. J. Lignocellulosic Biomass Pretreatment by Deep Eutectic Solvents on Lignin Extraction and Saccharification Enhancement: A Review. *Bioresour. Technol.* **2021**, *339*, 125587. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125587>.
- (66) Xu, H., Kong, Y., Peng, J., Wang, W., Li, B. Mechanism of Deep Eutectic Solvent Delignification: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2021**, *9* (20), 7101–7111. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c01260>.
- (67) Zhu, B., Xu, Y., Ge, H., Wang, S., Wang, W., Li, B., Xu, H. Theoretical Study of Lactic Acid-Based Deep Eutectic Solvents Dissociation of Hemicellulose with Different Hydrogen Bonding Acceptors. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *244*, 125342. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125342>.
- (68) Li, Q., Dong, Y., Hammond, K. D., Wan, C. Revealing the Role of Hydrogen Bonding Interactions and Supramolecular Complexes in Lignin Dissolution by Deep Eutectic Solvents. *J. Mol. Liq.* **2021**, *344*, 117779. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117779>.
- (69) Tan, Y. T., Ngoh, G. C., Chua, A. S. M. Effect of Functional Groups in Acid Constituent of Deep Eutectic Solvent for Extraction of Reactive Lignin. *Bioresour. Technol.* **2019**, *281*, 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.010>.
- (70) Song, K., Yu, L., Yang, S., Cao, Y., Li, L., Wu, Z., Shi, H., Ma, Q. Insights into the Chemical Structure and Antioxidant Activity of Lignin Extracted from Bamboo by Acidic Deep Eutectic Solvents. *ACS Omega* **2024**, *9*, 40956–40969. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c06259>.
- (71) Smink, D., Juan, A., Schuur, B., Kersten, S. R. A. Understanding the Role of Choline Chloride in Deep Eutectic Solvents Used for Biomass Delignification. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2019**, *58* (36), 16348–16357. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03588>.
- (72) Huo, D., Sun, Y., Yang, Q., Zhang, F., Fang, G., Zhu, H., Liu, Y. Selective Degradation of Hemicellulose and Lignin for Improving Enzymolysis Efficiency via Pretreatment Using Deep Eutectic Solvents. *Bioresour. Technol.* **2023**, *376*, 128937. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128937>.
- (73) Guo, Z., Ling, Z., Wang, C., Zhang, X., Xu, F. Integration of Facile Deep Eutectic Solvents Pretreatment for Enhanced Enzymatic Hydrolysis and Lignin Valorization from Industrial Xylose Residue. *Bioresour. Technol.* **2018**, *265*, 334–339. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.027>.
- (74) Kumar, N., Gautam, R., Stallings, J. D., Coty, G. G., Lynam, J. G. Secondary Agriculture Residues Pretreatment Using Deep Eutectic Solvents. *Waste Biomass Valoriz.* **2021**, *12* (5), 2259–2269. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01176-1>.
- (75) del Mar Contreras-Gómez, M., Galán-Martín, Á., Seixas, N., da Costa Lopes, A. M., Silvestre, A., Castro, E. Deep Eutectic Solvents for Improved Biomass Pretreatment: Current Status and Future Prospective towards Sustainable Processes. *Bioresour. Technol.* **2023**, *369*, 128396. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128396>.
- (76) Da Costa Lopes, A. M., Gomes, J. R. B., Coutinho, J. A. P., Silvestre, A. J. D. Novel Insights into Biomass Delignification with Acidic Deep Eutectic Solvents: A Mechanistic Study of  $\beta$ -O-4 Ether

- Bond Cleavage and the Role of the Halide Counterion in the Catalytic Performance. *Green Chem.* **2020**, *22*, 2474–2487. <https://doi.org/10.1039/c9gc02569c>.
- (77) Pramana, A., Zalfiatri, Y., Sari, E. O. Effect of Temperature on Lignin Isolation by Using Organosolv Method from Oil Palm Empty Fruit Bunch. *J. Phys. Conf. Ser.* **2021**, *2049*, 012037. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2049/1/012037>.
- (78) Velasco Calderón, J. C., Arora, J. S., Mushrif, S. H. Mechanistic Investigation into the Formation of Humins in Acid-Catalyzed Biomass Reactions. *ACS Omega* **2022**, *7* (49), 44786–44795. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04783>.
- (79) Isci, A., Kaltschmitt, M. Recovery and Recycling of Deep Eutectic Solvents in Biomass Conversions: A Review. *Biomass Conv. Bioref.* **2022**, *12*, 197–226. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01860-9>.
- (80) Ippolitov, V., Anugwom, I., Mänttari, M., Kallioinen-Mänttari, M. Comparison between Membrane Filtration and Antisolvent Addition Methods for the Recovery and Recycling of a Deep Eutectic Solvent after Biomass Pretreatment. *Ind. Crops. Prod.* **2025**, *226*, 120755. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.120755>.
- (81) Ippolitov, V., Anugwom, I., Mänttari, M., Kallioinen-Mänttari, M. Long-Term Stability of Cellulose Membranes in Spent Deep Eutectic Solvent Used in the Recovery of Lignin from Lignocellulosic Biomass. *Cellulose* **2024**, *31* (4), 2379–2395. <https://doi.org/10.1007/s10570-024-05746-7>.
- (82) Sharma, H. K., Xu, C., Qin, W. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. *Waste Biomass Valor.* **2019**, *10*, 235–251. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0059-y>.
- (83) Wawoczny, A., Gillner, D. The Most Potent Natural Pharmaceuticals, Cosmetics, and Food Ingredients Isolated from Plants with Deep Eutectic Solvents. *J. Agri. Food Chem.* **2023**, *71*, 10877–10900. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c01656>.
- (84) Singh, S., Kaur, I., Kariyat, R. The Multifunctional Roles of Polyphenols in Plant-Herbivore Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (3), 1442. <https://doi.org/10.3390/ijms22031442>.
- (85) Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., Salopek-Sondi, B. The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure. *Plants* **2021**, *10* (1), 118. <https://doi.org/10.3390/plants10010118>.
- (86) Farha, A. K., Gan, R. Y., Li, H. Bin, Wu, D. T., Atanasov, A. G., Gul, K., Zhang, J. R., Yang, Q. Q., Corke, H. The Anticancer Potential of the Dietary Polyphenol Rutin: Current Status, Challenges, and Perspectives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* **2022**, *62*, 832–859. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1829541>.
- (87) Çelik, H., Kandemir, F. M., Caglayan, C., Özdemir, S., Çomaklı, S., Kucukler, S., Yardım, A. Neuroprotective Effect of Rutin against Colistin-Induced Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis in Rat Brain Associated with the CREB/BDNF Expressions. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47* (3), 2023–2034. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05302-z>.
- (88) De Tollenaere, M., Durduret, A., Chapuis, E., Lambert, C., Lemagnen, P., Tiguemounine, J., Auriol, D., Scandolera, A., Reynaud, R. A Highly Soluble Form of Rutin for Instant Resolution of

- Mask-Wearing Related Disorders. *J. Cosmet. Dermatol.* **2024**, *23* (5), 1734–1744. <https://doi.org/10.1111/jocd.16196>.
- (89) Di Petrillo, A., Orrù, G., Fais, A., Fantini, M. C. Quercetin and Its Derivates as Antiviral Potentials: A Comprehensive Review. *Phytother. Res.* **2022**, *36* (1), 266–278. <https://doi.org/10.1002/ptr.7309>.
- (90) Nguyen, T. L. A., Bhattacharya, D. Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle. *Molecules* **2022**, *27* (8), 2494. <https://doi.org/10.3390/molecules27082494>.
- (91) Maleki Dana, P., Sadoughi, F., Asemi, Z., Yousefi, B. Anti-Cancer Properties of Quercetin in Osteosarcoma. *Cancer Cell Int.* **2021**, *21*, 349. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02067-8>.
- (92) Luzi, F., Pannucci, E., Santi, L., Kenny, J. M., Torre, L., Bernini, R., Puglia, D. Gallic Acid and Quercetin as Intelligent and Active Ingredients in Poly(Vinyl Alcohol) Films for Food Packaging. *Polymers* **2019**, *11* (12), 1999. <https://doi.org/10.3390/polym11121999>.
- (93) De Stefano, A., Caporali, S., Di Daniele, N., Rovella, V., Cardillo, C., Schinzari, F., Minieri, M., Pieri, M., Candi, E., Bernardini, S., Tesauro, M., Terrinoni, A. Anti-Inflammatory and Proliferative Properties of Luteolin-7-O-Glucoside. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (3), 1321. <https://doi.org/10.3390/ijms22031321>.
- (94) Özkütük, A. S. Antimicrobial Effects of Carnosic Acid, Kaempferol and Luteolin on Biogenic Amine Production by Spoilage and Food-Borne Pathogenic Bacteria. *Food Biosci.* **2022**, *46*, 101588. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101588>.
- (95) Stanisic, D., Liu, L. H. B., Dos Santos, R. V., Costa, A. F., Durán, N., Tasic, L. New Sustainable Process for Hesperidin Isolation and Anti-Ageing Effects of Hesperidin Nanocrystals. *Molecules* **2020**, *25* (19), 4534. <https://doi.org/10.3390/molecules25194534>.
- (96) Khalilabad, S. N., Mirzaei, A., Askari, V. R., Mirzaei, A., Khademi, R., Baradaran Rahimi, V. How Hesperidin and Hesperetin, as Promising Food Supplements, Combat Cardiovascular Diseases: A Systematic Review from Bench to Bed. *J. Function. Food.* **2024**, *120*, 106358. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106358>.
- (97) Nwafor, E. O., Lu, P., Zhang, Y., Liu, R., Peng, H., Xing, B., Liu, Y., Li, Z., Zhang, K., Zhang, Y., Liu, Z. Chlorogenic Acid: Potential Source of Natural Drugs for the Therapeutics of Fibrosis and Cancer. *Translation. Onco.* **2022**, *15* (1), 101294. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101294>.
- (98) Xue, N., Liu, Y., Jin, J., Ji, M., Chen, X. Chlorogenic Acid Prevents UVA-Induced Skin Photoaging through Regulating Collagen Metabolism and Apoptosis in Human Dermal Fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (13), 6941. <https://doi.org/10.3390/ijms23136941>.
- (99) Lee, K. H., Do, H. K., Kim, D. Y., Kim, W. Impact of Chlorogenic Acid on Modulation of Significant Genes in Dermal Fibroblasts and Epidermal Keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, *583*, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.10.057>.
- (100) Stompor-Gorący, M., Machaczka, M. Recent Advances in Biological Activity, New Formulations and Prodrugs of Ferulic Acid. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*(23), 12889. <https://doi.org/10.3390/ijms222312889>.

- (101) Zheng, M., Liu, Y., Zhang, G., Yang, Z., Xu, W., Chen, Q. The Antioxidant Properties, Metabolism, Application and Mechanism of Ferulic Acid in Medicine, Food, Cosmetics, Livestock and Poultry. *Antioxidants* **2024**, 13(7), 853. <https://doi.org/10.3390/antiox13070853>.
- (102) Cândido, T. M., Ariede, M. B., Pinto, C. A. S. de O., Lima, F. V., Magalhães, W. V., Pedro, N. M. E., Padovani, G., Sufi, B. da S., Rijo, P., Velasco, M. V. R., Rosado, C., Baby, A. R. Rosmarinic Acid Multifunctional Sunscreen: Comet Assay and In Vivo Establishment of Cutaneous Attributes. *Cosmetics* **2022**, 9 (6), 141. <https://doi.org/10.3390/cosmetics9060141>.
- (103) Marchev, A. S., Vasileva, L. V., Amirova, K. M., Savova, M. S., Koycheva, I. K., Balcheva-Sivenova, Z. P., Vasileva, S. M., Georgiev, M. I. Rosmarinic Acid - From Bench to Valuable Applications in Food Industry. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, 117, 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.015>.
- (104) Topal, M., Gulcin, İ. Evaluation of the in Vitro Antioxidant, Antidiabetic and Anticholinergic Properties of Rosmarinic Acid from Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2022**, 43, 102417. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102417>.
- (105) Zhao, X., Liu, Z., Liu, H., Guo, J., Long, S. Hybrid Molecules Based on Caffeic Acid as Potential Therapeutics: A Focused Review. *Europ. J. Med. Chem.* **2022**, 243, 114745. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114745>.
- (106) Thongchai, K., Chuysinuan, P., Thanyacharoen, T., Techasakul, S., Ummartyotin, S. Characterization, Release, and Antioxidant Activity of Caffeic Acid-Loaded Collagen and Chitosan Hydrogel Composites. *J. Mat. Res. Technol.* **2020**, 9 (3), 6512–6520. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.04.036>.
- (107) Khan, F., Bamunuarachchi, N. I., Tabassum, N., Kim, Y. M. Caffeic Acid and Its Derivatives: Antimicrobial Drugs toward Microbial Pathogens. *J. Agri. Food Chem.* **2021**, 69, 2979–3004. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07579>.
- (108) Li, J., Zhao, N., Xu, R., Li, G., Dong, H., Wang, B., Li, Z., Fan, M., Wei, X. Deciphering the Antibacterial Activity and Mechanism of p-Coumaric Acid against *Alicyclobacillus Acidoterrestris* and Its Application in Apple Juice. *Int. J. Food Microbiol.* **2022**, 378, 109822. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109822>.
- (109) Tehami, W., Nani, A., Khan, N. A., Hichami, A. New Insights Into the Anticancer Effects of p-Coumaric Acid: Focus on Colorectal Cancer. *Dose-Response* **2023**, 21 (1). <https://doi.org/10.1177/15593258221150704>.
- (110) Chen, F., Zhang, X., Wang, J., Wang, F., Mao, J. P-Coumaric Acid: Advances in Pharmacological Research Based on Oxidative Stress. *Curr. Top. Med. Chem.* **2024**, 24 (5), 416–436. <https://doi.org/10.2174/0115680266276823231230183519>.
- (111) Zhang, Q. W., Lin, L. G., Ye, W. C. Techniques for Extraction and Isolation of Natural Products: A Comprehensive Review. *Chin. Med.* **2018**, 13, 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.
- (112) Rodsamran, P., Sothornvit, R. Extraction of Phenolic Compounds from Lime Peel Waste Using Ultrasonic-Assisted and Microwave-Assisted Extractions. *Food Biosci.* **2019**, 28, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.01.017>.

- (113) Caldas, T. W., Mazza, K. E. L., Teles, A. S. C., Mattos, G. N., Brígida, A. I. S., Conte-Junior, C. A., Borguini, R. G., Godoy, R. L. O., Cabral, L. M. C., Tonon, R. V. Phenolic Compounds Recovery from Grape Skin Using Conventional and Non-Conventional Extraction Methods. *Ind. Crops. Prod.* **2018**, *111*, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.012>.
- (114) Dong, J. N., Wu, G. D., Dong, Z. Q., Yang, D., Bo, Y. K., An, M., Zhao, L. S. Natural Deep Eutectic Solvents as Tailored and Sustainable Media for the Extraction of Five Compounds from Compound Liquorice Tablets and Their Comparison with Conventional Organic Solvents. *RSC Adv.* **2021**, *11* (59), 37649–37660. <https://doi.org/10.1039/d1ra06338c>.
- (115) Wang, R., Zhang, W., He, R., Li, W., Wang, L. Customized Deep Eutectic Solvents as Green Extractants for Ultrasonic-Assisted Enhanced Extraction of Phenolic Antioxidants from Dogbane Leaf-Tea. *Foods* **2021**, *10* (11), 2527. <https://doi.org/10.3390/foods10112527>.
- (116) Abouheif, S. A., Sallam, S. M., El Sohafy, S. M., Kassem, F. F., Shawky, E. Optimization of Terpene Lactones and Ginkgolic Acids Extraction from *Ginkgo Biloba* L. Leaves by Natural Deep Eutectic Solvents Using Experimental Design and HPTLC-MS Analysis. *Microchem. J.* **2022**, *176*, 107246. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107246>.
- (117) Mansur, A. R., Song, N. E., Jang, H. W., Lim, T. G., Yoo, M., Nam, T. G. Optimizing the Ultrasound-Assisted Deep Eutectic Solvent Extraction of Flavonoids in Common Buckwheat Sprouts. *Food Chem.* **2019**, *293*, 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.003>.
- (118) Athanasiadis, V., Palaiogiannis, D., Grigorakis, S., Bozinou, E., Lalas, S. I., Makris, D. P. Food-Grade Deep Eutectic Solvent Extraction of Antioxidant Polyphenols from Peppermint (*Mentha Piperita* L.): Screening, Optimization and Metabolite Profile. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2023**, *33*, 100456. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2022.100456>.
- (119) de Almeida Pontes, P. V., Ayumi Shiwaku, I., Maximo, G. J., Caldas Batista, E. A. Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents as Potential Solvent for Extraction of Phenolic Compounds from Olive Leaves: Extraction Optimization and Solvent Characterization. *Food Chem.* **2021**, *352*, 129346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129346>.
- (120) Ivanović, M., Grujić, D., Cerar, J., Razboršek, M. I., Topalić-Trivunović, L., Savić, A., Kočar, D., Kolar, M. Extraction of Bioactive Metabolites from *Achillea Millefolium* L. with Choline Chloride Based Natural Deep Eutectic Solvents: A Study of the Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Antioxidants* **2022**, *11* (4), 724. <https://doi.org/10.3390/antiox11040724>.
- (121) Xia, G. H., Li, X. H., Jiang, Y. hang. Deep Eutectic Solvents as Green Media for Flavonoids Extraction from the Rhizomes of Polygonatum Odoratum. *Alex. Eng. J.* **2021**, *60* (2), 1991–2000. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2020.12.008>.
- (122) Duan, L., Dou, L. L., Guo, L., Li, P., Liu, E. H. Comprehensive Evaluation of Deep Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4* (4), 2405–2411. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00091>.
- (123) Jurić, T., Uka, D., Holló, B. B., Jović, B., Kordić, B., Popović, B. M. Comprehensive Physicochemical Evaluation of Choline Chloride-Based Natural Deep Eutectic Solvents. *J. Mol. Liq.* **2021**, *343*, 116968. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116968>.

- (124) Lanjekar, K. J., Rathod, V. K. Green Extraction of Glycyrrhizic Acid from *Glycyrrhiza Glabra* Using Choline Chloride Based Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs). *Process Biochem.* **2021**, *102*, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.11.023>.
- (125) Alshammari, O. A. O., Almulgabsagher, G. A. A., Ryder, K. S., Abbott, A. P. Effect of Solute Polarity on Extraction Efficiency Using Deep Eutectic Solvents. *Green Chem.* **2021**, *23* (14), 5097–5105. <https://doi.org/10.1039/d1gc01747k>.
- (126) Shang, X., Dou, Y., Zhang, Y., Tan, J. N., Liu, X., Zhang, Z. Tailor-Made Natural Deep Eutectic Solvents for Green Extraction of Isoflavones from Chickpea (*Cicer Arietinum* L.) Sprouts. *Ind. Crops. Prod.* **2019**, *140*, 111724. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111724>.
- (127) Shang, X., Chu, D., Zhang, J. xu, Zheng, Y. fen, Li, Y. Microwave-Assisted Extraction, Partial Purification and Biological Activity in Vitro of Polysaccharides from Bladder-Wrack (*Fucus Vesiculosus*) by Using Deep Eutectic Solvents. *Sep. Purif. Technol.* **2021**, *259*, 118169. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118169>.
- (128) Phaisan, S., Makkliang, F., Putalun, W., Sakamoto, S., Yusakul, G. Development of a Colorless *Centella Asiatica*(L.) Urb. Extract Using a Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) and Microwave-Assisted Extraction (MAE) Optimized by Response Surface Methodology. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 8741–8750. <https://doi.org/10.1039/d0ra09934a>.
- (129) Gabriele, F., Chiarini, M., Germani, R., Tiecco, M., Spreti, N. Effect of Water Addition on Choline Chloride/Glycol Deep Eutectic Solvents: Characterization of Their Structural and Physicochemical Properties. *J. Mol. Liq.* **2019**, *291*, 111301. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111301>.
- (130) Oomen, W. W., Begines, P., Mustafa, N. R., Wilson, E. G., Verpoorte, R., Choi, Y. H. Natural Deep Eutectic Solvent Extraction of Flavonoids of *Scutellaria Baicalensis* as a Replacement for Conventional Organic Solvents. *Molecules* **2020**, *25* (3), 617. <https://doi.org/10.3390/molecules25030617>.
- (131) Guo, N., Ping-Kou, Jiang, Y. W., Wang, L. T., Niu, L. J., Liu, Z. M., Fu, Y. J. Natural Deep Eutectic Solvents Couple with Integrative Extraction Technique as an Effective Approach for Mulberry Anthocyanin Extraction. *Food Chem.* **2019**, *296*, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.196>.
- (132) Shikov, A. N., Kosman, V. M., Flissyuk, E. V., Smekhova, I. E., Elameen, A., Pozharitskaya, O. N. Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Phenyletanes and Phenylpropanoids of *Rhodiola Rosea* L. *Molecules* **2020**, *25* (8), 1826. <https://doi.org/10.3390/molecules25081826>.
- (133) Hsieh, Y. H., Li, Y., Pan, Z., Chen, Z., Lu, J., Yuan, J., Zhu, Z., Zhang, J. Ultrasonication-Assisted Synthesis of Alcohol-Based Deep Eutectic Solvents for Extraction of Active Compounds from Ginger. *Ultrason. Sonochem.* **2020**, *63*, 104915. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104915>.
- (134) Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus Tinctorius* L. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 6272–6278. <https://doi.org/10.1021/ac400432p>.

- (135) Xu, M., Ran, L., Chen, N., Fan, X., Ren, D., Yi, L. Polarity-Dependent Extraction of Flavonoids from Citrus Peel Waste Using a Tailor-Made Deep Eutectic Solvent. *Food Chem.* **2019**, 297, 124970. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124970>.
- (136) Zhang, M., Zhang, Z., Gul, Z., Tian, M., Wang, J., Zheng, K., Zhao, C., Li, C. Advances of Responsive Deep Eutectic Solvents and Application in Extraction and Separation of Bioactive Compounds. *J. Sep. Sci.* **2023**, 45 (15), 2300098. <https://doi.org/10.1002/jssc.202300098>.
- (137) Sed, G., Cicci, A., Jessop, P. G., Bravi, M. A Novel Switchable-Hydrophilicity, Natural Deep Eutectic Solvent (NaDES)-Based System for Bio-Safe Biorefinery. *RSC Adv.* **2018**, 8 (65), 37092–37097. <https://doi.org/10.1039/c8ra08536f>.
- (138) Viñas-Ospino, A., Panić, M., Radojčić- Redovniković, I., Blesa, J., Esteve, M. J. Using Novel Hydrophobic Deep Eutectic Solvents to Improve a Sustainable Carotenoid Extraction from Orange Peels. *Food Biosci.* **2023**, 53, 102570. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102570>.
- (139) Stupar, A., Šeregelj, V., Ribeiro, B. D., Pezo, L., Cvetanović, A., Mišan, A., Marrucho, I. Recovery of  $\beta$ -Carotene from Pumpkin Using Switchable Natural Deep Eutectic Solvents. *Ultrason. Sonochem.* **2021**, 76, 105638. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105638>.
- (140) Chen, X., Wang, R., Tan, Z. Extraction and Purification of Grape Seed Polysaccharides Using pH-Switchable Deep Eutectic Solvents-Based Three-Phase Partitioning. *Food Chem.* **2023**, 412, 135557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135557>.
- (141) Zhang, J., Zhang, Z., Yao, L., Qian, M., Li, Z., Han, Y., Bai, S., Lee, M. pH-Responsive Switchable Deep Eutectic Solvents to Mediate Pretreatment Method for Trace Analysis of Triazole Fungicides in Peel Wastes. *Food Chem.* **2023**, 411, 135486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135486>.
- (142) Fattahi, N., Zohrabi, P., Shiri, F., Hobi Bordón Sosa, F., Hashemi, B. Alcohol-Based Deep Eutectic Solvents with pH-Responsive Hydrophobicity for the Analysis of Herbicides in Water and Fruit Juice Samples. *Sep. Purif. Technol.* **2024**, 339, 126607. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2024.126607>.
- (143) Lei, T., Qin, Z., Liu, L., Tan, Z. A Salt/Salt Aqueous Two-Phase System Based on PH-Switchable Deep Eutectic Solvent for the Extraction and Separation of Mulberry Polysaccharides. *Food Chem.* **2025**, 462, 141024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141024>.
- (144) Hu, Y., Chen, X., Tan, Z. Three-Phase Partitioning Constructed by PH-Responsive Deep Eutectic Solvents and Sugars for Purification of Radish (*Raphanus Sativus* L.) Peroxidase. *Sep. Purif. Technol.* **2023**, 322, 124353. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.124353>.
- (145) Mogaddam, M. R. A., Farajzadeh, M. A., Tuzen, M., Jouyban, A., Khandaghi, J. Organic Solvent-Free Elevated Temperature Liquid–Liquid Extraction Combined with a New Switchable Deep Eutectic Solvent-Based Dispersive Liquid–Liquid Microextraction of Three Phenolic Antioxidants from Oil Samples. *Microchem. J.* **2021**, 168, 106433. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106433>.
- (146) Wawoczny, A.; Kuc, M.; Gillner, D. Effective Biomass Delignification with Deep Eutectic Solvents. *Global Challenges for a Sustainable Society*, Edyt. Benítez-Andrades, J. A., García-Llamas, P., Taboada, Á., Estévez-Mauriz, L., Baelo, R. Wyd. Springer Proceedings in Earth and Environmental Sciences, 2023. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-25840-4>.

- (147) Kaur, P., Arora, S., Singh, R. Isolation, Characterization and Biological Activities of Betulin from *Acacia Nilotica* Bark. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 9370 <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13338-3>.
- (148) Mominul Islam, A. K. M., Widhalm, J. R. Agricultural Uses of Juglone: Opportunities and Challenges. *Agronomy* **2020**, *10*(10), 1500. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101500>.
- (149) Milewska-Hendel, A., Polak, M., Sala, K., Zieleźnik-Rusinowska, P., Gawecki, R., Kurczyńska, E. Morpho-Histological Analysis of Tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) Plants after Treatment with Juglone. *Acta Agrobot.* **2017**, *70* (2). <https://doi.org/10.5586/aa.1701>.
- (150) Lee, K. M., Quek, J. D., Tey, W. Y., Lim, S., Kang, H. S., Quen, L. K., Mahmood, W. A. W., Jamaludin, S. I. S., Teng, K. H., Khoo, K. S. Biomass Valorization by Integrating Ultrasonication and Deep Eutectic Solvents: Delignification, Cellulose Digestibility and Solvent Reuse. *Biochem. Eng. J.* **2022**, *187*, 108587. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108587>.
- (151) Li, X., Shi, Y., Kong, W., Wei, J., Song, W., Wang, S. Improving Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass by Bio-Coordinated Physicochemical Pretreatment—A Review. *Energy Rep.* **2022**, *8*, 696–709. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2021.12.015>.
- (152) Pithani, S., Karlsson, S., Emtenäs, H., Öberg, C. T. Using Spinchem Rotating Bed Reactor Technology for Immobilized Enzymatic Reactions: A Case Study. *Org. Process Res. Dev.* **2019**, *23* (9), 1926–1931. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00240>.
- (153) Eta, V., Anugwom, I., Virtanen, P., Eränen, K., Mäki-Arvela, P., Mikkola, J. P. Loop vs. Batch Reactor Setups in the Fractionation of Birch Chips Using Switchable Ionic Liquids. *Chem. Eng. J.* **2014**, *238*, 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.103>.
- (154) Eta, V., Mikkola, J. P. Deconstruction of Nordic Hardwood in Switchable Ionic Liquids and Acylation of the Dissolved Cellulose. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *136*, 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.058>.
- (155) Wawoczny, A., Szymańska, K., Gillner, D. Novel Stationary Basket Reactor for Effective Biomass Delignification with Deep Eutectic Solvent. *Bioresour. Technol.* **2024**, *413*, 131455. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131455>.
- (156) Stradomska, D., Świętochowska, D., Kubica, R., Hanefeld, U., Szymańska, K. New Type of Basket Stationary Bed Reactor for Heterogeneous Biocatalysis. *Chem. Eng. Process. Process Inten.* **2023**, *194*, 109590. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2023.109590>.
- (157) Herbaut, M., Zoghalmi, A., Habrant, A., Falourd, X., Foucat, L., Chabbert, B., Paës, G. Multimodal Analysis of Pretreated Biomass Species Highlights Generic Markers of Lignocellulose Recalcitrance. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11*, 52. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1053-8>.
- (158) Selig, M. J., Viamajala, S., Decker, S. R., Tucker, M. P., Himmel, M. E., Vinzant, T. B. Deposition of Lignin Droplets Produced during Dilute Acid Pretreatment of Maize Stems Retards Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23* (6), 1333–1339. <https://doi.org/10.1021/bp0702018>.
- (159) Zhuang, J., Li, M., Pu, Y., Ragauskas, A. J., Yoo, C. G. Observation of Potential Contaminants in Processed Biomass Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Appl. Sci.* **2020**, *10* (12), 4345. <https://doi.org/10.3390/app10124345>.

- (160) Lourenço, A., Pereira, H. *Compositional Variability of Lignin in Biomass. W Lignin - Trends and Applications*, **2018**, Edyt. Poletto, M., Wyd. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71208>.
- (161) Nor, N. A. M., Mustapha, W. A. W., Hassan, O. Deep Eutectic Solvent (DES) as a Pretreatment for Oil Palm Empty Fruit Bunch (OPEFB) in Sugar Production. *Procedia Chem.* **2016**, *18*, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2016.01.023>.
- (162) Zemnukhova, L. A., Panasenkov, A. E., Artem'yanov, A. P., Tsoy, E. A. Dependence of Porosity of Amorphous Silicon Dioxide Prepared from Rice Straw on Plant Variety. *Bioresources* **2015**, *10* (2), 3713–3723. <https://doi.org/10.15376/biores.10.2.3713-3723>.
- (163) Mikhralieva, A., Zaitsev, V., Aucélio, R. Q., Da Motta, H. B., Nazarkovsky, M. Benefit of Porous Silica Nanoreactor in Preparation of Fluorescence Carbon Dots from Citric Acid. *Nano Express* **2020**, *1*, 010011. <https://doi.org/10.1088/2632-959X/ab7e0d>.
- (164) Salehi, H., Timmerfors, J. G., Hajmohammadi, H., Garg, V., Berry, R. J., Barletta, D., Poletto, M., Jönsson, L. J., Bradley, M. S. A., Larsson, S. H. The Role of Particle Size and Other Properties on Silo Discharge Behaviour of Chipped Wood Biomass. *Powder Technol.* **2024**, *432*, 119174. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2023.119174>.
- (165) Williams, D. L., Hodge, D. B. Impacts of Delignification and Hot Water Pretreatment on the Water Induced Cell Wall Swelling Behavior of Grasses and Its Relation to Cellulolytic Enzyme Hydrolysis and Binding. *Cellulose* **2014**, *21*, 221–235. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0149-3>.
- (166) Cheng, Q., Wang, J., McNeel, J. F., Jacobson, P. M. Water Retention Value Measurements of Cellulosic Materials Using a Centrifuge Technique. *Bioresources* **2010**, *5* (3), 1945–1954. <https://doi.org/10.15376/biores.5.3.1945-1954>.
- (167) Przypis, M., Wawoczny, A., Gillner, D. Biomass and Cellulose Dissolution—The Important Issue in Renewable Materials Treatment. *Appl. Sci.* **2023**, *13*(2), 1055. <https://doi.org/10.3390/app13021055>.
- (168) Qin, Z., Wang, D., Li, T., Luo, R., Zhou, D., Xiong, X. Construction of an Enzymatic Shuttling Compartment Based on Reverse Micellar for Bamboo Biomass Hydrolysis in Ionic Liquids. *Bioresour. Technol.* **2022**, *355*, 127257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127257>.
- (169) Kumar, A. K., Parikh, B. S., Pravakar, M. Natural Deep Eutectic Solvent Mediated Pretreatment of Rice Straw: Bioanalytical Characterization of Lignin Extract and Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Biomass Residue. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 9265–9275. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4780-4>.
- (170) Pedersen, J. N., Pérez, B., Guo, Z. Stability of Cellulase in Ionic Liquids: Correlations between Enzyme Activity and COSMO-RS Descriptors. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 17479. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53523-5>.
- (171) Hebal, H., Boucherba, N., Binay, B., Turunen, O. Activity and Stability of Hyperthermostable Cellulases and Xylanases in Ionic Liquids. *Biocatal. Biotransform.* **2021**, *39*(4), 242–259. <https://doi.org/10.1080/10242422.2021.1882430>.
- (172) Gunny, A. A. N., Arbain, D., Javed, M., Baghaei-Yazdi, N., Gopinath, S. C. B., Jamal, P. Deep Eutectic Solvents-Halophilic Cellulase System: An Efficient Route for in Situ Saccharification of

Lignocellulose. *Process Biochem.* **2019**, *81*, 99–103.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.03.003>.

- (173) Wawoczny, A., Przypis, M., Gillner, D. Enzymatic Valorization of Lignocellulosic Biomass—The Influence of Deep Eutectic Solvents and Ionic Liquids on the Activity of Cellulolytic Enzymes. *Sustainability* **2023**, *15* (24), 16726. <https://doi.org/10.3390/su152416726>.
- (174) Halder, D., Dey, P., Thomas, J., Singhanian, R. R., Patel, A. K. One Pot Bioprocessing in Lignocellulosic Biorefinery: A Review. *Bioresour. Technol.* **2022**, *365*, 128180. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128180>.
- (175) Sriariyanun, M., Kitiborwornkul, N., Tantayotai, P., Rattanaporn, K., Show, P. L. One-Pot Ionic Liquid-Mediated Bioprocess for Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw with Ionic Liquid-Tolerance Bacterial Cellulase. *Bioengineering* **2022**, *9* (1), 17. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9010017>.
- (176) Yao, J., Li, C., Xiao, L., Wu, Y., Wu, Q., Cui, Z., Wang, B. Influence of Natural Deep Eutectic Solvents on Stability and Structure of Cellulase. *J. Mol. Liq.* **2022**, *346*, 118238. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118238>.
- (177) Vasyliiev, G., Lyudmyla, K., Hladun, K., Skiba, M., Vorobyova, V. Valorization of Tomato Pomace: Extraction of Value-Added Components by Deep Eutectic Solvents and Their Application in the Formulation of Cosmetic Emulsions. *Biomass Convers. Biorefin.* **2022**, *12*, 95–111. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02337-z>.
- (178) Rashid, R., Mohd Wani, S., Manzoor, S., Masoodi, F. A., Masarat Dar, M. Green Extraction of Bioactive Compounds from Apple Pomace by Ultrasound Assisted Natural Deep Eutectic Solvent Extraction: Optimisation, Comparison and Bioactivity. *Food Chem.* **2023**, *398*, 133871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133871>.
- (179) Cao, Y., Song, Z., Dong, C., Ni, W., Xin, K., Yu, Q., Han, L. Green Ultrasound-Assisted Natural Deep Eutectic Solvent Extraction of Phenolic Compounds from Waste Broccoli Leaves: Optimization, Identification, Biological Activity, and Structural Characterization. *LWT* **2023**, *190*, 115407. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115407>.
- (180) Wang, T., Jiao, J., Gai, Q. Y., Wang, P., Guo, N., Niu, L. L., Fu, Y. J. Enhanced and Green Extraction Polyphenols and Furanocoumarins from Fig (*Ficus Carica* L.) Leaves Using Deep Eutectic Solvents. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *145*, 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.002>.
- (181) Junker-Frohn, L. V., Lück, M., Schmittgen, S., Wensing, J., Carraresi, L., Thiele, B., Groher, T., Reimer, J. J., Bröring, S., Noga, G., Jupke, A., Schurr, U., Usadel, B., Wiese-Klinkenberg, A., Wormit, A. Tomato's Green Gold: Bioeconomy Potential of Residual Tomato Leaf Biomass as a Novel Source for the Secondary Metabolite Rutin. *ACS Omega* **2019**, *4* (21), 19071–19080. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01462>.
- (182) Arab, M., Bahramian, B., Schindeler, A., Valtchev, P., Dehghani, F., McConchie, R. Extraction of Phytochemicals from Tomato Leaf Waste Using Subcritical Carbon Dioxide. *Innov. Food Sci. Emerging Technol.* **2019**, *57*, 102204. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102204>.
- (183) Tam, C. C., Nguyen, K., Nguyen, D., Hamada, S., Kwon, O., Kuang, I., Gong, S., Escobar, S., Liu, M., Kim, J., Hou, T., Tam, J., Cheng, L. W., Kim, J. H., Land, K. M., Friedman, M. Antimicrobial

Properties of Tomato Leaves, Stems, and Fruit and Their Relationship to Chemical Composition. *BMC Complement. Med. Ther.* **2021**, *21*, 229. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03391-2>.

- (184) Wawoczny, A., Wilk, J., Shyntum, D., Shakibania, S., Krukiewicz, K., Gibas, J., Machulik, M., Płonka, J., Bajkacz, S., Dudek, G., Gillner, D. Valorization of Waste Tomato Leaves with Natural Deep Eutectic Solvents. *Food Chem.* **2025**, *472*, 142884. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.142884>.
- (185) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants : Seventy-Third Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. World Health Organization, **2011**, Geneva.
- (186) Scientific Opinion on Safety and Efficacy of Choline Chloride as a Feed Additive for All Animal Species. *EFSA Journal* **2011**, *9* (9), 2353. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2353>.
- (187) Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Dusemund, B., Frutos, M. J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Leblanc, J. C., Lindtner, O., Moldeus, P., Mosesso, P., Parent-Massin, D., Oskarsson, A., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R. A., Wright, M., Younes, M., Boon, P., Chrysafidis, D., Gürtler, R., Tobback, P., Rincon, A. M., Tard, A., Lambrée, C. Re-Evaluation of Glycerol (E 422) as a Food Additive. *EFSA Journal* **2017**, *15* (3), e04720. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2017.4720>.
- (188) Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. de L., Christensen, H., Dusemund, B., Kouba, M., Kos Durjava, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Marcon, F., Mayo, B., Pechová, A., Petkova, M., Ramos, F., Sanz, Y., Villa, R. E., Woutersen, R., Aquilina, G., Bories, G., Gropp, J., Nebbia, C., Innocenti, M. L. Safety of Lactic Acid and Calcium Lactate When Used as Technological Additives for All Animal Species. *EFSA Journal* **2019**, *17* (12), e05914. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5914>.
- (189) Redha, A. A. Review on Extraction of Phenolic Compounds from Natural Sources Using Green Deep Eutectic Solvents. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (3), 878–912. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06641>.
- (190) Röhlen-Schmittgen, S., Ellenberger, J., Groher, T., Hunsche, M. Boosting Leaf Contents of Rutin and Solanesol in Bio-Waste of *Solanum Lycopersicum*. *Plant Physiol. Biochem.* **2020**, *155*, 888–897. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.035>.
- (191) Silva-Beltrán, N. P., Ruiz-Cruz, S., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Ornelas-Paz, J. D. J., López-Mata, M. A., Del-Toro-Sánchez, C. L., Ayala-Zavala, J. F., Márquez-Ríos, E. Total Phenolic, Flavonoid, Tomatine, and Tomatidine Contents and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Extracts of Tomato Plant. *Int. J. Anal. Chem.* **2015**, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/284071>.
- (192) Chebotarev, A. N., Snigur, D. V. Study of the Acid-Base Properties of Quercetin in Aqueous Solutions by Color Measurements. *J. Anal. Chem.* **2015**, *70*, 55–59. <https://doi.org/10.1134/S1061934815010062>.
- (193) Cao, D., Liu, Q., Jing, W., Tian, H., Yan, H., Bi, W., Jiang, Y., Chen, D. D. Y. Insight into the Deep Eutectic Solvent Extraction Mechanism of Flavonoids from Natural Plant. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8* (51), 19169–19177. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c08146>.

- (194) Mercado-Mercado, G., de la Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E. Effect of Pectin on the Interactions among Phenolic Compounds Determined by Antioxidant Capacity. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1199*, 126967. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.126967>.
- (195) Stanojević-Nikolić, S., Dimić, G., Mojović, L., Pejin, J., Djukić-Vuković, A., Kocić-Tanackov, S. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Against Pathogen and Spoilage Microorganisms. *J. Food Process. Preserv.* **2016**, *40* (5), 990–998. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12679>.
- (196) Sionkowska, A., Lewandowska, K., Kurzawa, M. Chitosan-Based Films Containing Rutin for Potential Cosmetic Applications. *Polymers* **2023**, *15* (15), 3224. <https://doi.org/10.3390/polym15153224>.
- (197) Grzybek, P., Dudek, G., van der Bruggen, B. Cellulose-Based Films and Membranes: A Comprehensive Review on Preparation and Applications. *Chem. Eng. J.* **2024**, *495*, 153500. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.153500>.
- (198) Marangoni Júnior, L., Jamróz, E., Gonçalves, S. de Á., da Silva, R. G., Alves, R. M. V., Vieira, R. P. Preparation and Characterization of Sodium Alginate Films with Propolis Extract and Nano-SiO<sub>2</sub>. *Food Hydrocoll. Health* **2022**, *2*, 100094. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100094>.
- (199) Yu, J., Xu, S., Goksen, G., Yi, C., Shao, P. Chitosan Films Plasticized with Choline-Based Deep Eutectic Solvents: UV Shielding, Antioxidant, and Antibacterial Properties. *Food Hydrocoll.* **2023**, *135*, 108196. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108196>.
- (200) Jakubská, J., Wawoczny, A., Kluska, D., Grzybek, P., Hudecki, A., Kołodziej, M., Jasiak-Jaroń, K., Abdullah, Shyntum, D. Y., Gołombek, K., Pakieła, W., Krukiewicz, K., Gillner, D., Dudek, G. Dual Functionality of Deep Eutectic Solvents in Chitosan-Based Biodegradable Films for Food Packaging Applications. *Ind. Crops. Prod.* **2025**, *232*, 121268. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.121268>.
- (201) Givol, O., Kornhaber, R., Visentin, D., Cleary, M., Haik, J., Harats, M. A Systematic Review of *Calendula Officinalis* Extract for Wound Healing. *Wound Repair Regen.* **2019**, *27*(5), 548–561. <https://doi.org/10.1111/wrr.12737>.
- (202) Jan, N., Andrabi, K. I., John, R. *Calendula Officinalis*-An Important Medicinal Plant with Potential Biological Properties. *Proceed. Ind. Nat. Sci. Acad.* **2017**, *83* (4), 769-787. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2017/49126>.
- (203) Wawoczny, A., Wilk, J., Bajkacz, S., Gillner, D. Natural Bioactive Chemicals Extracted from *Calendula Officinalis* Using Efficient Binary Deep Eutectic Solvent System. *J. Mol. Liq.* **2025**, *433*, 127929. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2025.127929>.
- (204) Zhang, H., Zhao, W., Bai, T., Fu, L., Chen, Z., Jing, X., Wang, X. Sustainable Extraction of Polyphenols from Millet Using Switchable Deep Eutectic Solvents. *LWT* **2022**, *170*, 114082. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114082>.
- (205) Aman, R., Carle, R., Conrad, J., Beifuss, U., Schieber, A. Isolation of Carotenoids from Plant Materials and Dietary Supplements by High-Speed Counter-Current Chromatography. *J. Chromatogr. A*. **2005**, *1074* (1–2), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.055>.
- (206) Haładyn, K., Wojdyło, A., Nowicka, P. Shaping the Bioactive Potential, Health-Promoting Properties, and Bioavailability of o/w Nanoemulsions by Modulating the Dose of a Carotenoid

- Preparation Isolated from *Calendula Officinalis* L. *Food Chem.* **2024**, 456, 139990. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139990>.
- (207) Loukri, A., Sarafera, C., Goula, A. M., Gardikis, K., Mourtzinou, I. Green Extraction of Caffeine from Coffee Pulp Using a Deep Eutectic Solvent (DES). *Appl. Food Res.* **2022**, 2 (2), 100176. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100176>.
- (208) Cai, Z. H., Dong, X. Y., Wang, L. T., Zhou, W. M., Wang, Y. N., Yang, J., Fu, Y. J. A Novel Temperature-Responsive Biphasic Deep Eutectic Solvent-Based Solvent System: Integrated Efficient Extraction, Enrichment and Recovery of Phytochemicals. *Chem. Eng. J.* **2024**, 499, 156012. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.156012>.
- (209) Lu, Z., Chen, Y., Tang, X., Gao, J., He, F., Zhang, X., He, H., Dramou, P., Xiao, D. Simultaneous and Selective Extraction of Different Polarity Bioactive Substances from *Ligustri Lucidi Fructus* Based on a Designable Biphasic Deep Eutectic Solvent. *J. Clean. Prod.* **2024**, 449, 141791. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2024.141791>.
- (210) Zarycz, M. N. C., Fonseca Guerra, C. NMR  $^1\text{H}$ -Shielding Constants of Hydrogen-Bond Donor Reflect Manifestation of the Pauli Principle. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, 9 (13), 3720–3724. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.8b01502>.

## Spis tabel

|                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Procentowa zawartość celulozy, ligniny oraz hemiceluloz w wybranych rodzajach biomasy roślinnej. ....                                                                                                         | 15 |
| <b>Tabela 2.</b> Stopień delignifikacji biomasy, zależny od rodzaju lignocelulozy, DESs, temperatury oraz czasu. ....                                                                                                          | 17 |
| <b>Tabela 3.</b> Wybrane związki bioaktywne występujące w roślinach oraz ich właściwości i zastosowania (na podstawie publikacji [P1] <sup>83</sup> ). ....                                                                    | 23 |
| <b>Tabela 4.</b> Wydajność związków bioaktywnych, ekstrahowanych z użyciem DESs z materiałów roślinnych (na podstawie publikacji [P1] <sup>83</sup> ). ....                                                                    | 26 |
| <b>Tabela 5.</b> Gęstość usypowa biomasy przed i po procesie delignifikacji z DES w reaktorze StatBioChem®. ....                                                                                                               | 35 |
| <b>Tabela 6.</b> DESs użyte do badań ich wpływu na aktywność enzymatyczną celulaz. ....                                                                                                                                        | 40 |
| <b>Tabela 7.</b> Wydajność glukozy [mg/g biomasy], otrzymanej w wyniku hydrolizy enzymatycznej trawy wobec Viscozyme® L. ....                                                                                                  | 42 |
| <b>Tabela 8.</b> Wydajność substancji bioaktywnych ekstrahowanych z liści pomidora z użyciem DESs. Kolorem szarym zaznaczono najwyższe wydajności, w zależności od zastosowanego DES (na podstawie [P4] <sup>184</sup> ). .... | 45 |
| <b>Tabela 9.</b> Właściwości przeciwutleniające DESs oraz ekstraktów z liści pomidora w DESs. ....                                                                                                                             | 47 |
| <b>Tabela 10.</b> HDESs zastosowane do badań nad ekstrakcją substancji bioaktywnych z kwiatu nagietka. ....                                                                                                                    | 50 |
| <b>Tabela 11.</b> Procentowy wkład współautorów publikacji. ....                                                                                                                                                               | 88 |

## Spis rysunków

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Rysunek 1.</b> Wybrane zastosowania DESs i HDESs <sup>31–35</sup> .....                                                                                                                                                                                                                                                  | 14 |
| <b>Rysunek 2.</b> Wybrane metody obróbki biomasy lignocelulozowej <sup>44–53</sup> .....                                                                                                                                                                                                                                    | 16 |
| <b>Rysunek 3.</b> Stopień delignifikacji biomasy w procesie z użyciem DES, w zależności od konstrukcji reaktora (na podstawie publikacji [P2] <sup>155</sup> ) .....                                                                                                                                                        | 32 |
| <b>Rysunek 4.</b> Zdjęcia SEM trawy przed delignifikacją (A) oraz po delignifikacji (B i C) w DES, w reaktorze StatBioChem® (na podstawie publikacji [P2] <sup>155</sup> ) .....                                                                                                                                            | 34 |
| <b>Rysunek 5.</b> Zdjęcia SEM słomy żytniej przed delignifikacją (A) oraz po delignifikacji (B) w DES, w reaktorze StatBioChem® (na podstawie publikacji [P2] <sup>155</sup> ) .....                                                                                                                                        | 34 |
| <b>Rysunek 6.</b> Współczynnik retencji wody dla biomasy przed i po delignifikacji z ChCl:LacA (na podstawie publikacji [P2] <sup>155</sup> ) .....                                                                                                                                                                         | 36 |
| <b>Rysunek 7.</b> Wpływ delignifikacji biomasy z użyciem ChCl:LacA w różnych typach reaktorów, na wydajność glukozy otrzymanej w następczej hydrolizie enzymatycznej (na podstawie publikacji [P2] <sup>155</sup> ) .....                                                                                                   | 37 |
| <b>Rysunek 8.</b> Wpływ DESs zawierających chlorek choliny (A) lub betainę (B) jako HBA na aktywność wybranych enzymów w procesie hydrolizy celulozy (na podstawie publikacji [P3] <sup>173</sup> ) .....                                                                                                                   | 40 |
| <b>Rysunek 9.</b> Wydajność związków bioaktywnych (związków fenolowych oraz flawonoidów), ekstrahowanych z liści pomidora, w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika (na podstawie publikacji [P4] <sup>184</sup> ) .....                                                                                               | 44 |
| <b>Rysunek 10.</b> Wydajność związków bioaktywnych: A - związków fenolowych, B – flawonoidów oraz C - karotenoidów, ekstrahowanych z kwiatu nagietka, w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika (na podstawie publikacji [P6] <sup>203</sup> ) .....                                                                    | 51 |
| <b>Rysunek 11.</b> Wydajność związków bioaktywnych (związków fenolowych, flawonoidów oraz karotenoidów) ekstrahowanych z kwiatu nagietka w układzie podwójnym DES-HDES, w zależności od zastosowanego reaktora (A – reaktor okresowy; B – reaktor koszykowy SpinChem®) (na podstawie publikacji [P6] <sup>203</sup> ) ..... | 54 |
| <b>Rysunek 12.</b> Wydajność związków bioaktywnych (A - związki fenolowe i flawonoidy; B – karotenoidy) ekstrahowanych z kwiatu nagietka w układzie podwójnym DES-HDES, w następujących po sobie cyklach (na podstawie publikacji [P6] <sup>203</sup> ) .....                                                               | 55 |

## Wkład autorski Doktorantki

Poniżej opisany został mój wkład procentowy oraz merytoryczny w publikacjach składających się na rozprawę doktorską.

### **Publikacja [P1] 70%:**

- przygotowanie przeglądu literaturowego oraz jego usystematyzowanie,
- przygotowanie tabel i grafik występujących w publikacji,
- wprowadzenie zmian sugerowanych przez recenzentów pracy,
- współautorstwo odpowiedzi dla recenzentów pracy.

### **Publikacja [P2] 70%:**

- konceptualizacja badań,
- przygotowanie przeglądu literaturowego,
- przygotowanie materiału lignocelulozowego oraz przeprowadzenie analizy zawartości poszczególnych komponentów biomasy,
- przeprowadzenie procesów delignifikacji biomasy w trzech reaktorach i oznaczenie stopnia wydzielenia ligniny,
- przeprowadzenie hydrolizy enzymatycznej biomasy oraz wykonanie analizy jakościowej i ilościowej mieszanin poreakcyjnych metodą HPLC,
- zastosowanie metod analitycznych: określenie stopnia delignifikacji biomasy, wykonanie analizy FT-IR i NMR, wyznaczenie gęstości usypowej materiału oraz współczynnika retencji wody,
- przygotowanie oprawy graficznej publikacji (tabele, wykresy, widma FT-IR oraz NMR, zdjęcia SEM),
- przygotowanie części opisowej publikacji,
- przeprowadzenie analizy statystycznej wyników,
- wprowadzenie zmian sugerowanych przez recenzentów pracy,
- współautorstwo odpowiedzi dla recenzentów pracy.

### **Publikacja [P3] 65%:**

- konceptualizacja badań,
- przygotowanie przeglądu literaturowego,
- przeprowadzenie reakcji hydrolizy enzymatycznej celulozy i biomasy w środowisku rozpuszczalników głęboko eutektycznych,
- przeprowadzenie obróbki wstępnej biomasy i jej późniejszej hydrolizy enzymatycznej,
- wykonanie analizy jakościowej i ilościowej mieszanin poreakcyjnych metodą HPLC,
- przygotowanie części opisowej oraz oprawy graficznej (tabele, wykresy),
- wprowadzenie zmian sugerowanych przez recenzentów pracy,

- współautorstwo odpowiedzi dla recenzentów pracy.

**Publikacja [P4] 40%:**

- konceptualizacja badań,
- przygotowanie przeglądu literaturowego,
- przeprowadzenie ekstrakcji związków bioaktywnych z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych oraz za pomocą metod konwencjonalnych,
- wykonanie analizy całkowitej zawartości związków fenolowych oraz flawonoidów,
- przeprowadzenie recyklu rozpuszczalnika z użyciem ekstrakcji do fazy stałej,
- przygotowanie części opisowej oraz oprawy graficznej (tabele, wykresy, grafiki),
- wprowadzenie zmian sugerowanych przez recenzentów pracy,
- współautorstwo odpowiedzi dla recenzentów pracy.

**Publikacja [P5] 20%:**

- przygotowanie ekstraktów roślinnych w DESs,
- współautorstwo opisu części pracy dotyczącej metodyki badań,
- wykonanie opisu widm FT-IR,
- współautorstwo odpowiedzi dla recenzentów pracy.

**Publikacja [P6] 70%:**

- konceptualizacja badań,
- przygotowanie przeglądu literaturowego,
- przeprowadzenie ekstrakcji związków bioaktywnych z użyciem rozpuszczalników głęboko eutektycznych oraz za pomocą metod konwencjonalnych,
- wykonanie analizy całkowitej zawartości związków fenolowych, flawonoidów oraz karotenoidów,
- przeprowadzenie ekstrakcji związków bioaktywnych w systemie binarnym, z użyciem rozpuszczalników o różnej hydrofilowości,
- przeprowadzenie recyklu rozpuszczalników,
- wykonanie analizy NMR,
- przygotowanie części opisowej oraz oprawy graficznej (tabele, wykresy, grafiki),
- wprowadzenie zmian sugerowanych przez recenzentów pracy,
- współautorstwo odpowiedzi dla recenzentów pracy.

## Załącznik 1. Wkład autorski współautorów publikacji

W Tabeli 11 przedstawiono procentowy wkład współautorów. Deklaracje o indywidualnym wkładzie procentowym i merytorycznym współautorów publikacji składających się na rozprawę doktorską zostały umieszczone poniżej.

**Tabela 11.** Procentowy wkład współautorów publikacji.

| Autor                  | P1 [%] | P2 [%] | P3 [%] | P4 [%] | P5 [%] | P6 [%] |
|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Agata Wawoczny         | 70     | 70     | 65     | 40     | 20*    | 70     |
| Danuta Gillner         | 30     | 15     | 15     | 10     | 5      | 15     |
| Katarzyna Szymańska    |        | 15     |        |        |        |        |
| Marta Przypis          |        |        | 20     |        |        |        |
| Joanna Wilk            |        |        |        | 5      |        | 10     |
| Divine Shyntum         |        |        |        | 5      | 5      |        |
| Sara Shakibania        |        |        |        | 5      |        |        |
| Katarzyna Krukiewicz   |        |        |        | 10     | 5      |        |
| Joanna Gibas           |        |        |        | 5      |        |        |
| Marcin Machulik        |        |        |        | 5      |        |        |
| Joanna Płonka          |        |        |        | 5      |        |        |
| Sylwia Bajkacz         |        |        |        | 5      |        | 5      |
| Gabriela Dudek         |        |        |        | 5      | 14     |        |
| Justyna Jakubská       |        |        |        |        | 20*    |        |
| Dominika Kluska        |        |        |        |        | 5      |        |
| Paweł Grzybek          |        |        |        |        | 5      |        |
| Andrzej Hudecki        |        |        |        |        | 2      |        |
| Martyna Kołodziej      |        |        |        |        | 2      |        |
| Katarzyna Jasiak-Jaroń |        |        |        |        | 2      |        |
| Abdullah               |        |        |        |        | 5      |        |
| Klaudiusz Gołombek     |        |        |        |        | 5      |        |
| Wojciech Pakieła       |        |        |        |        | 5      |        |

\*Autorzy deklarują ten sam udział procentowy w publikacji [P5].