

AUTOREFERAT
Z DZIAŁALNOŚCI NAUKOWO-BADAWCZEJ

dr inż. Justyna Cybulska

Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów

Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk

Ul. Doświadczalna 4

20-290 Lublin

tel. 081 744 50 61 w. 145

e-mail: j.cybulska@ipan.lublin.pl

Lublin 2015



1. Dane personalne:

Imię i nazwisko: Justyna Cybulska

Nazwisko rodowe: Bednarczyk

Data urodzenia: 02 stycznia 1979 r.

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 30.01.2009** stopień doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii/agrofizyki, Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie.
Tytuł pracy: *Wybrane fizyczne i chemiczne właściwości modelowych ścian komórkowych*. Promotor: prof. dr hab. Krystyna Konstankiewicz
- 30.09. 2008** dyplom ukończenia studiów doktoranckich w zakresie nauk rolniczych – agronomii – agrofizyki w Instytucie Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie
- 12.11.2009** dyplom ukończenia studiów podyplomowych Zarządzanie badaniami naukowymi i pracami rozwojowymi w jednostkach naukowych, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Wydział Filozofii
- 21.05.2013** dyplom magistra na kierunku Chemia, specjalność Chemia środków bioaktywnych i kosmetyków. Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Chemii.
- 14.07.2004** dyplom magistra inżyniera na kierunku Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka w zakresie technologii żywności, specjalność Inżynieria żywności i organizacja produkcji. Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Technologii Żywności.
- 31.05.1999** świadectwo dojrzałości w Technikum Chemicznym w Zespole Szkół Chemicznych w Lublinie, tytuł zawodowy technik chemik o specjalności technologia środków farmaceutycznych.

3. Doświadczenie zawodowe**3.1. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych**

- Od 01.08.2010 - obecnie Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie - **opiekun Laboratorium Biochemicznego**
- 18.02.2011-22.07.2011 urlop macierzyński

Od 01.06 2009 - obecnie	Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie - adiunkt
01.07.2007-31.05.2009	Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie - asystent
01.04.2007–30.06.2007	Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie - technolog
15.11.2004-31.12.2005	Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie – młodszy technolog

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie.

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Cykl publikacji powiązanych tematycznie pt.

Wpływ nanostruktury polisacharydów ścian komórkowych na ich właściwości funkcjonalne.

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa):

H1. Cybulska J., Pieczywek P.M., Zdunek A. 2012 . The effect of Ca²⁺ and cellular structure on apple firmness and acoustic emission. *European Food Research and Technology* 235, 119-128.

IF₂₀₁₂=1,436, IF_{5-letni}=1,863 32 pkt. MNiSW

H2. Cybulska J., Zdunek A., Psonka-Antonczyk K.M., Stokke B.T. 2013. The relation of apple texture with cell wall nanostructure studied using an atomic force microscope. *Carbohydrate Polymers* 92, 128– 137.

IF₂₀₁₃=3,916, IF_{5-letni}=4,330 40 pkt. MNiSW

H3. Cybulska J., Brzyska A., Zdunek A., Woliński K. 2014. Simulation of force spectroscopy experiments on galacturonic acid oligomers. *PLoS ONE* 9(9), e107896.

IF₂₀₁₄=3,234, IF_{5-letni}=3,702 40 pkt. MNiSW

H4. Cybulska J., Zdunek A. Kozioł, A. 2015. The self-assembled network and physiological degradation of pectins in carrot cell walls. *Food Hydrocolloids* 43, 41-50.

IF₂₀₁₄=4,090, IF_{5-letni}=4,637 45 pkt. MNiSW

H5. Zdunek A., Koziół A., Pieczywek P.M., **Cybulska J.** 2014. Evaluation of the nanostructure of pectin, hemicellulose and cellulose in the cell walls of pears of different texture and firmness. *Food Bioprocess and Technology* 7, 3525–3535.

IF₂₀₁₄=2,691, IF_{5-letni}=3,187 40 pkt. MNiSW

H6. Mierczyńska J., **Cybulska J.**, Pieczywek P., Zdunek A. 2015. Effect of storage on rheology of water soluble, chelate-soluble and diluted alkali-soluble pectin in carrot cell walls. *Food Bioprocess and Technology* 8, 171-180.

IF₂₀₁₄=2,691, IF_{5-letni}=3,187 40 pkt. MNiSW

H7. Koziół A., **Cybulska J.**, Pieczywek P. M., Zdunek A. Structure, assembly and mechanical properties of xyloglucan from tamarind seed [*Tamarindus indica*] studied with atomic force microscopy. *Food Biophysics* 10, 396-402.

IF₂₀₁₄=1,63, IF_{5-letni}=2.005 30 pkt. MNiSW

H8. **Cybulska J.**, Mierczyńska J., Pieczywek P., Stasiak M., Zdunek A. 2015. Wpływ jonów metali dwuwartościowych na właściwości reologiczne matrycy polisacharydowej z wyłoków jabłkowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2(99), 103-113.

IF₂₀₁₄= brak, IF_{5-letni}=brak 15 pkt. MNiSW

H9. Mierczyńska J., **Cybulska J.**, Sołowiej B., Zdunek A. 2015. Effect of Ca²⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺ on rheological properties of new food matrix made of modified cell wall polysaccharides from apple. *Carbohydrate Polymers* 133, 547-555.

IF₂₀₁₄=4,074, IF_{5-letni}=4,568 40 pkt. MNiSW

H10. Zdunek A., Koziół A., **Cybulska J.**, Lekka M., Pieczywek P.M. 2015. The stiffening of the cell walls observed during physiological softening of pears. *Planta*. DOI 10.1007/s00425-015-2423-0.

IF₂₀₁₄=3,263, IF_{5-letni}=3,632 40 pkt. MNiSW

Liczba punktów MNiSW* publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **362 pkt.**

Całkowity IF* z roku opublikowania publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **27,025.**

Całkowity 5-letni IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: 31,111.

*W przypadku publikacji, dla których nie określono IF oraz punktów MNiSW za rok opublikowania wykorzystano punktację za rok poprzedni.

Wkład habilitantki w powstanie ww. prac został szczegółowo opisany w **Załączniku 4**. Oświadczenia dotyczące współautorów prac, określające szczegółowo indywidualny wkład w powstanie publikacji znajdują się w **Załączniku 8**.

c) omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wstęp

Polisacharydy ścian komórkowych stanowią obiekt badań naukowych od połowy XX wieku, kiedy to zaczęły ukazywać się pierwsze prace dotyczące analizy składu chemicznego i struktury tych materiałów. Analizując dostępne bazy danych publikacji naukowych można stwierdzić, że mimo stosunkowo długiego okresu eksploracji tej tematyki, zainteresowanie nią nieustannie wzrasta. W roku 2014 ukazało się ponad 4,5 tys. prac indeksowanych w bazie Scopus, które dotyczą tych biomolekuł. Szerokie zainteresowanie tematyką polisacharydów ścian komórkowych związane jest z ważnymi funkcjami, jakie te związki pełnią w tkance roślinnej, ale też z charakterem samych polisacharydów, które mają ogromny potencjał praktycznego zastosowania w różnych gałęziach przemysłu.

Struktura i tekstura tkanki roślinnej jest uzależniona w znacznej mierze od ścian komórkowych, które stanowią jej szkielet i są zbudowane z najbardziej wytrzymałych mechanicznie biopolimerów występujących w komórce roślinnej. Interakcje między biopolimerami ścian komórkowych i ich właściwości na poziomie molekularnym decydują o zachowaniu całego układu biologicznego. Polisacharydy ścian komórkowych dzieli się na trzy główne grupy: celuloza, hemicelulozy oraz pektyny. Związki te różnią się budową i właściwościami, jednak wzajemne oddziaływania zachodzące między nimi oraz naturalne uwarunkowania ich syntezy i występowania dały podstawę do wyodrębnienia ich jako jednej grupy polisacharydów.

Celuloza jest zbudowana z D-glukozy połączonej wiązaniami β -(1 \rightarrow 4)-glikozydowymi w linowe polimery, które formują wyższe struktury w postaci mikrofibryli wskutek oddziaływań wodorowych, liczące około 7-15 tys. jednostek glukozy (Gibson 2012). Mikrofibryle celulozy posiadają regiony krystaliczne oraz amorficzne, co w znacznym stopniu determinuje właściwości materiału i jego zdolność do wchodzenia w różnego rodzaju reakcje. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, mikrofibryle celulozy, tworzące sieć o chaotycznie rozlokowanych elementach, są zanurzone w amorficznej matrycy polisacharydowej składającej się z pektyn i hemiceluloz, w której znajdują się także białka strukturalne, enzymy, związki mineralne i estry fenolowe (McCann i in. 2001). W ścianach komórkowych włókna celulozy są zorganizowane w równoległe warstwy (Geitmann 2010) i usieciowane przez hemicelulozy (McCann, Wells i Roberts 1990). Średnice mikrofibryli celulozy w ścianach komórkowych jabłek wynoszą od 20 do 60 nm (I.A.4., H2), natomiast moduł Younga został określony na około 120-170 GPa (Iwamoto, Kai, Isogai i Iwata 2009).

Hemicelulozy są polisacharydami o szkieletach złożonych z jednostek sacharydów połączonych wiązaniami β -(1 \rightarrow 4) o konfiguracji ekwatorialnej. Do grupy hemiceluloz występujących w ścianach komórkowych należą takie związki jak ksyloglukany, ksylany, mannany, glukomanany, oraz β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)-glukany (Scheller i Ulvskov 2010). Związki z grupy hemiceluloz tworzą niezależną sieć, która jest ściśle połączona z siecią celulozy poprzez wiązania wodorowe (Carpita i McCann 2000; Cosgrove 2005). Ksyloglukany są typowymi związkami z grupy hemiceluloz występującymi w parenchymie owoców, np. jabłek, w postaci długich łańcuchowych struktur. Szkielet ksyloglukanu składa się z cząsteczek glukozy połączonych wiązaniem β -(1 \rightarrow 4), gdzie trzy z czterech reszt

p

glukozowych jest podstawionych przez 1,6- α -D ksylozę (Burton, Gidley i Fincher 2010) Ksyloglukan w ścianie komórkowej jest ściśle powiązany z mikrofibrilami celulozy łącząc je w formę sieci i tym samym wpływając na właściwości mechaniczne układu. Nanostruktura ksyloglukanu determinuje mechanizm sieciowania mikrofibrili celulozy, ponieważ im mniej podstawników w postaci reszt fukozylowych zawiera szkielet ksyloglukanu tym większa jest jego zdolność do wiązania celulozy (Levy, York, Stuike-Prill, Meyer i Staehelin 1991; Lima, Loh i Buckeridge 2004) Łańcuchy ksyloglukanu mają konformację podwójnej helisy (Umemura i Yuguchi 2005; I.A.4., H7). Ksyloglukan sieciuje celulozę pokrywając powierzchnię jej mikrofibrili, wykazano jednak, że jego łańcuchy mogą przechodzić w głąb mikrofibrili niszcząc tym samym ich krystaliczne obszary (Pauly, Albersheim, Darvill i York 1999).

Pektyny stanowią złożoną grupę związków bogatych w kwas galakturonowy (GalA), które można podzielić na trzy główne formy: homogalakturonianu oraz ramnogalakturonianu typu I i typu II (Mohnen 2008). Kwas D-galakturonowy jest związkiem powstałym przez utlenienie D-galaktozy, posiada grupę aldehydową w pozycji C1 i grupę karboksylową w pozycji C6. W stanie naturalnym najpowszechniej występuje izomeryczna forma kwasu D-galakturonowego. Homogalakturonian jest liniowym polimerem kwasu α -D-galakturonowego połączonego wiązaniami α -(1 \rightarrow 4)-glikozydowymi z występującymi sporadycznie resztami ramnozyłowymi powodującymi skręcenie łańcucha. Reszty karboksylowe homogalakturonianów są często estryfikowane grupami metylowymi. W mniejszym stopniu zachodzi także jego acetylacja w pozycjach O-2 lub O-6. Homogalakturoniany mogą być połączone kowalencyjnie z ramnogalakturonianami typu I lub innymi polisacharydami. W dużych ilościach występują przede wszystkim w parenchymie owoców. Wykazano, że homogalakturoniany są zbudowane z około 100 monomerów kwasu galakturonowego (Ridley, O'Neill i Mohnen 2001). Ramnogalakturoniany typu I są zbudowane z powtarzających się jednostek GalA oraz α -(1 \rightarrow 2)- L-ramnozy o stopniu polimeryzacji około 2000, w których boczne łańcuchy przyłączone do reszt ramnozylowych w pozycji O-4 są zbudowane z arabinianów, galaktanów i arabinogalaktanów. Są one szeroko rozpowszechnione w pierwotnych ścianach komórkowych oraz w blaszce środkowej. Homogalakturoniany łączą się z ramnogalakturonianami I za pomocą wiązań kowalencyjnych (Coenen, Bakx, Verhoef, Schols i Voragen 2007; Round, Rigby, MacDougall i Morris 2010; Morris, Gromer, Kirby, Bongaerts i Gunning 2011). Ramnogalakturoniany typu II posiadają natomiast szkielet zbudowany homogalakturonianu zawierający liczne łańcuchy boczne zbudowane z około dziesięciu rodzajów cukrów prostych (Mohnen 2008). Są to molekuły o stopniu polimeryzacji około 60. Stanowią niewielką część związków pektynowych występujących w tkankach roślinnych, pełnią jednak istotną rolę ze względu na zdolność do tworzenia mostków boranowych i tym samym sieciowania matrycy pektynowej (Schols i Voragen 1994). Do związków pektynowych zalicza się ponadto arabiniany, galaktany i arabinogalaktany. Proporcje związków pektynowych występujących w jabłkach są następujące: 36% homogalakturoniany, 27% arabiniany, 20% arabinogalaktany, 14% ramnogalakturoniany. Pektyny o dużych zdolnościach łączenia cząsteczek wody wypełniają przestrzeń pomiędzy włóknami celulozy i hemiceluloz tworząc niezależną sieć i pełniąc rolę plastyfikatora (I.A.2). Pektyny w środowisku o dużej zawartości wody tworzą strukturę sieci wzajemnie połączonych jonowo polimerów. W ścianach komórkowych sieć pektynowa stanowi matrycę dla makromolekuł celulozy i hemiceluloz oraz innych elementów ścian komórkowych: białek,

substancji mineralnych, enzymów. W długich łańcuchach pektynowych występują obszary „gładkie” (*smooth*), zbudowane głównie z homogalakturonianów oraz obszary rozgałęzione (*hairy*) składające się głównie z ramnogalakturonianów. Sieciowanie pektyn zawierających znaczne ilości homogalakturonianów przebiega według modelu egg-box opisanego przez Granta i wsp. (Grant, Morris, Rees, Smith i Thom 1973). Zaobserwowano, że strefy węzłowe formują się przez wiązanie około 20 reszt karboksylowych w GalA przez wapń (Morris, Gromer Kirby, Bongaerts i Gunning 2011). Związki pektynowe w tkance roślinnej mają za zadanie przede wszystkim regulację porowatości ściany komórkowej, utrzymywanie adhezji międzykomórkowej, kontrolę pH ściany i utrzymywanie równowagi jonowej.

Wiele właściwości makroskopowych materiałów roślinnych i żywności pochodzenia roślinnego, zależy od mikro- i nanostruktury (Brummell i Harpster 2001; Aguilera 2005). Ściany komórkowe, obok ciśnienia turgorowego, są głównym elementem tkanki miękkiszowej odpowiedzialnym za jej właściwości mechaniczne. Struktura molekularna polisacharydów w ścianie komórkowej determinuje jej właściwości mechaniczne (Geitmann 2010; Gibson 2012), dyfuzyjność (Fanta i inni 2012) oraz funkcjonalność tych biopolimerów jako składników żywności (Willats, Knox i Mikkelsen 2006) i produktów nieżywnościowych (Eichhorn i wsp. 2010). Polisacharydy ścian komórkowych są zorganizowane w formę wielowymiarowej sieci, stanowiącej swoistą matrycę, określaną w literaturze jako materiał ścian komórkowych (CWM – *cell wall material*) (Massiot, Rouau i Thibault 1987; Redgewell i Hansen 2000). Należy jednak podkreślić, że kompletny opis funkcji poszczególnych polisacharydów w tym układzie oraz interakcji między nimi nie został jeszcze dokonany i wciąż ukazują się nowe prace naukowe poświęcone tym zagadnieniom. Najnowsze modele budowy pierwotnej ściany komórkowej opierają się na założeniu, że polisacharydy wchodzące w skład ściany tworzą niezależne, ale powiązane wzajemnie poprzez różne interakcje struktury (Jarvis 2011). W alternatywnym modelu ściany komórkowej pektyny oddziałują również z celulozą w sposób konkurencyjny do hemiceluloz (Żykwinska, Thibault i Ralet 2008). Rzeczywista struktura polisacharydów w ścianie komórkowej zależy od jej pochodzenia (Ridley, O’Neil i Mohnen 2001).

Właściwości mechaniczne parenchymy są determinowane głównie przez turgor, rozmiar, kształt i rozmieszczenie komórek, grubość ścian komórkowych i stopień adhezji międzykomórkowej (Toivonen i Brummell 2008). Wyższy turgor powoduje usztywnienie i wzrost kruchości tkanki (I.A.1). Mechaniczne właściwości ścian komórkowych zależą głównie od struktury polisacharydów (I.A.2) oraz ich ułożenia i wzajemnych oddziaływań (Jarvis 2011). Adhezja międzykomórkowa, która zależy od stopnia polimeryzacji i usieciowania pektyn, odgrywa bardzo ważną rolę w biomechanice miękkich tkanek roślinnych (Jarvis, Briggs i Knox 2003) i warunkuje inne strukturalne właściwości tkanki (Toivonen i Brummell 2008). Chrupkie owoce pękają poprzez rozerwanie ścian komórkowych (Harker, Stec, Hallett i Bennett 1997), natomiast oddzielanie się komórek bez ich uszkodzeń zachodzi w przypadku dojrzałych, mączystych tkanek (De Belie, Hallett, Harker i De Baerdemaeker 2000).

Podczas cyklu rozwojowego roślin, a także – w przypadku owoców i warzyw – podczas ich pozbiornego przechowywania, polisacharydy ścian komórkowych ulegają intensywnym przemianom wskutek działania enzymów (Brummell, Dal Cin, Crisosto i Labavitch 2004). W czasie rozwoju rośliny glukany matrycowe słabo związane z włóknami celulozy, takie jak glukomannany i ksylany, podlegają

nieznacznej depolimeryzacji, natomiast nie zaobserwowano tego procesu w przypadku ksyloglukanów, ściśle związanych z mikrofibrylami celulozy (Redgwell, Curti i Gehin-Delval 2008). Istotne przemiany zachodzą jednakże w przypadku związków pektynowych, które podlegają znacznej depolimeryzacji i część z nich staje się rozpuszczalna (Redgwell, Curti i Gehin-Delval 2008). Depolimeryzacja zwiększa porowatość ścian komórkowych, która w przypadku niedojrzałych owoców jest niska i ogranicza dostęp enzymów hydrolitycznych do komponentów ścian komórkowych. Deestryfikacja pektyn prowadzi do utraty integralności ścian komórkowych, adhezji międzykomórkowej oraz zmienia strukturę tkanki. Na skutek aktywności enzymów pektynolitycznych następuje utrata jędrności i obniżenie jakości owoców. Istnieją trzy główne klasy enzymów degradujących pektyny obecne w przyrodzie: pektynometyloesterazy (PME), poligalakturonazy (PG) i liazy (PL) (Jayani, Saxena, i Gupta 2005; Wei i in. 2010). Pektynometyloesteraza katalizuje hydrolizę estrów metylowych tworząc łańcuchy niskometylowanych pektyn. Poligalakturonaza katalizuje hydrolityczny rozpad wiązań α -(1,4) glikozydowych, natomiast liaza pektynowa (PL) degradowuje te wiązania bez wprowadzania wody przez proces beta-eliminacji. β -galaktozydaza (β -Gal) i α -L-arabinofuranozydaza (α -L-AF) są odpowiedzialne za usuwanie bocznych łańcuchów galaktozylowych i arabinozylowych z polisacharydów ściany komórkowej (Jayani, Saxena, i Gupta 2005; Wei i in. 2010). Aktywność tych enzymów wzrasta istotnie w czasie pozbiornego dojrzewania (Goulao, Santos, de Sousa i Oliveira 2007). W efekcie aktywności enzymów pektynolitycznych sieć pektynowa ulega fragmentacji, długie łańcuchy zostają zdegradowane, następuje odcięcie bocznych łańcuchów oraz grup metylowych połączonych wiązaniem estrowym z grupami karboksylowymi (Sila i in. 2008). Funkcjonalność polimerów pektynowych jest połączona z ich strukturą. Stopień metylacji i stopień acetylacji określają zdolność do żelowania i właściwości reologiczne produktów na bazie pektyn. Gdy grupy karboksylowe GalA nie są estryfikowane metanolem w pozycji C-6 posiadają ładunek ujemny i w ten sposób są zdolne do wchodzenia w reakcje z niektórymi jonami, takimi jak jony wapnia, formując międzycząsteczkowe sieci, co jest powszechnie wykorzystywane w przemyśle spożywczym (Caffall i Mohnen 2009). W zależności od stopnia estryfikacji, pektyny można podzielić na dwie główne grupy: pektyny wysokometylowane (HMP – high-methoxyl *pectin*) i niskometylowane (LMP – low-methoxyl *pectin*).

Obserwacja rzeczywistej nanostruktury polisacharydów jest możliwa przede wszystkim dzięki zastosowaniu mikroskopii elektronowej lub mikroskopii sił atomowych. Mikroskopia sił atomowych (AFM) umożliwia obrazowanie powierzchni próbki o wymiarach rzędu kilkuset nanometrów z dużą rozdzielczością, a także wykonanie charakterystyki właściwości mechanicznych. Podczas skanowania powierzchni próbki następują wychylenia sondy przymocowanej do elastycznej dźwigni, które są rejestrowane i przekształcane w celu otrzymania informacji m.in. o topografii powierzchni próbki, nierównościach, adhezji. Badania nad nanostrukturą ścian komórkowych rozpoczęto w latach 90. XX wieku (Kirby, Gunning, Waldron, Morris i Ng 1996, Morris i in. 1997, Round i in. 1997), ale dotychczas tylko kilka grup na świecie zajmuje się badaniami nanostruktury tego układu (Marszałek, Oberhauser, Pang i Fernandez 1998; Yang, Feng, An i Li 2006; Zhang i in. 2010; Pose, Kirby, Mercado, Morris i Quesada 2012). AFM był wykorzystywany do obserwacji struktury ścian komórkowych (Kirby, Gunning, Waldron, Morris i Ng 1996; I.A.4; H2) oraz pojedynczych łańcuchów polisacharydowych (Kirby, Gunning i Morris 1995; Kirby, Gunning, Morris i Ridout 1995), w szczególności pektyn

pochodzących ze ścian komórkowych owoców (Kirby, MacDougall i Morris 2008; Liu i in. 2009; Yang, An, Feng, Li i Lai 2005; Zhang i in. 2010, Zhang i in. 2012; Pose, Kirby, Mercado, Morris i Quesada 2012). Te badania pokazały, że rozdzielczość AFM, uzależniona głównie od geometrii sondy, jest wystarczająca do obserwacji pojedynczych molekuł i wymaga preparatyki próbki, która stosunkowo nieznacznie ingeruje w naturalną postać biomolekuł. Rozdzielczość AFM w osi Z jest znacznie lepsza w porównaniu z rozdzielczością w osi X-Y, ograniczaną przez zjawisko konwolucji sondy (Yang, Chen, An i Lai 2009). Poprzez analizę obiektów na obrazach AFM możliwe jest także rozpoznanie efektu nakładania się molekuł od rzeczywistego rozgałęzienia polimerów (Round, Rigby, MacDougall, Ring i Morris 2001). W płaszczyźnie XY otrzymuje się natomiast wartościowe informacje dotyczące struktury molekularnej, w szczególności w przypadku długich cząsteczek, gdzie konwolucja sondy nie odgrywa tak znaczącej roli (Round, Rigby, MacDougall, Ring i Morris 2001; Round, Rigby, MacDougall i Morris 2010). Pomiar mniejszych wielkości, o średnicy lub grubości rzędu kilku-kilkunastu nanometrów, jest obarczony dość wysokim błędem procentowym. Jednakże pomiar długości również może być problematyczny, jeżeli występuje skrzywienie lub zapętlenie łańcuchów. W takich przypadkach można zastosować analizę obrazu (I.A H4), która dodatkowo zapewnia szybką i obiektywną ocenę reprezentatywnej liczby molekuł.

AFM stosowano między innymi do obserwacji mikrofibryli celulozy w próbkach modelowej rośliny dwuliściennej *Arabidopsis thaliana* oraz jednoliściennej – cebuli (Davies i Harris 2003), a także w komórkach izolowanych z ogórków (Marga, Grandbois, Cosgrove i Baskin 2005). Geometryczne wymiary włókien celulozowych w dużej mierze zależą od ich uwodnienia (Thimm, Burritt, Ducker i Melton 2000). W oparciu o obserwacje AFM biosyntezy komórek parenchymy kukurydzy, zaproponowano model mikrofibryli składający się z 36 pojedynczych łańcuchów celulozy (Ding i Himmel 2006). AFM był także stosowany do obserwacji enzymatycznej degradacji włókien celulozowych (Liu, Fu, Zhu, Li i Zhan 2009). Charakterystyka nanostruktury związków pektynowych jest zadaniem znacznie trudniejszym w porównaniu z obrazowaniem sieci celulozowych ze względu na mniejsze wymiary, złożoność budowy oraz adhezyjność pektyn. Zaobserwowano różnice w nanostrukturze pektyn pozyskanych z różnych owoców cytrusowych (Fishman, Cooke i Coffin 2006). Obrazowano również proces degradacji pektyn rozpuszczalnych w wodzie (Yang, An, Feng, Li i Lai 2005), kompleksy złożone z pektyn i białek, które znaleziono w niedojrzałych pomidorach (Kirby, MacDougall i Morris 2008), zmiany spowodowane działaniem Ca^{2+} na pektyny (Liu i in. 2009; Chen i in. 2011) oraz hydrolizę enzymatyczną łańcuchów pektynowych (Round, Rigby, MacDougall i Morris, 2010). Badania AFM nanostruktury pektyn ekstrahowanych ze ścian komórkowych pokazały skalę różnic strukturalnych na poziomie molekularnym pomiędzy odmianami (Yang, Chen, An i Lai 2009; Chen i in. 2009), przemiany zachodzące podczas hydrolizy kwasowej (Round, Rigby, MacDougall i Morris 2010) i podczas przechowywania pozbiorniczego (Zhang i in. 2010; Yang, An, Feng, Li i Lai 2005; Yang, Feng, An i Li 2006; Xin i in. 2010). Te wyniki pokazały, że AFM umożliwia ilościową charakterystykę dowolnych polisacharydów i w ten sposób przyczynia się do zrozumienia różnic odmianowych w zakresie tekstury owoców z perspektywy budowy ich ścian komórkowej. AFM stosowano również do badań właściwości mechanicznych materiałów biologicznych za pomocą testu nano-indentacji (Radmacher, Cleveland, Fritz i Hansma 1994; Radmacher, Fritz i Hansma 1995; Kuznetsova, Starodubtseva, Yegorenkov, Chizhik i Zhdanov 2007; Lekka i Laidler 2009; Lekka 2012;

Kurland, Drira i Yadavall 2012). Ta technika stanowi połączenie obrazowania topografii powierzchni próbek i wykorzystanie sondy jako indentera w celu określenia nano-mechanicznej charakterystyki materiału. Przez dopasowanie modelu matematycznego opisującego oddziaływanie sondy i materiału możliwe jest określenie modułu Younga próbki. Jednym z najczęściej wykorzystywanych do tego celu modeli jest model Hertza–Sneddona (Sneddon 1965).

Polisacharydy ścian komórkowych są wykorzystywane w znacznym stopniu jako zagęstniki, stabilizatory tekstury, wypełniacze, co jest związane z ich wodochłonnością, a w przypadku pektyn ze zdolnościami do żelowania. W przetwórstwie żywności polisacharydy te są stosowane w produkcji soków, żelków, dżemów, napojów, syropów, produktów piekarniczych oraz mleczarskich (Arancibia i Motsenbocker 2006; Jayani, Saxena i Gupta 2005; Mesbahi, Jamalian i Farahnaky 2005). Żelowanie pektyn może odbywać się według dwóch mechanizmów. W przypadku pektyn o stopniu estryfikacji powyżej 50% zachodzi strukturyzowanie łańcuchów pektynowych poprzez oddziaływania wodorowe oraz hydrofobowe pomiędzy grupami metoksyłowymi. Sieciowanie w tym przypadku zachodzi w wysokim stężeniu cukru i niskim pH. Natomiast pektyny o niskim stopniu estryfikacji są zdolne do tworzenia mostków wapniowych pomiędzy wolnymi grupami karboksylowymi. Pektyny mogą także ulegać depolimeryzacji nieenzymatycznej pod wpływem rodników hydroksylowych lub obróbki termicznej w środowisku kwaśnym lub zasadowym (Sila i in. 2008).

Zdolności do strukturyzowania roztworów przez polisacharydy można zaobserwować za pomocą monitorowania ich właściwości reologicznych (Tabilo-Munizaga i Barbosa-Cánovas 2005; Juszczak, Witczak, Zięba i Fortuna 2012; Espinosa-Muñoz, Renard, Symoneaux, Biau i Cuvelier 2013). Określenie charakteru płynu oraz jego zachowania w różnych warunkach przepływu lub mieszania ma wpływ na projektowanie procesów technologicznych (Ma, Lin, Chen, Zhao i Zhang 2014). Badania reologiczne polisacharydów ścian komórkowych były prowadzone głównie dla roztworów związków pektynowych (Alonso-Mongán, Meijide, Jover., Rodríguez-Núñez i Vázquez-Tato 2002; Schmelter, Wientjes, Vreeker i Klaffkeal 2002, Espinosa-Muñoz, Renard, Symoneaux, Biau i Cuvelier 2013), a w mniejszym stopniu dla systemów opartych na celulozie (Agoda Tandjawa i in. 2010) i hemicelulozach (Söderqvist, Albertsson, Ranucci, Laus i Giani 2005). Dotychczas nie publikowano jednak badań dotyczących opisu zmian właściwości reologicznych związków pektynowych w czasie pozbiorniczego dojrzewania owoców, chociaż pokazano, że w tym czasie zachodzą istotne zmiany strukturalne (Yang, An, Feng, Li i Lai 2005, Yang, Feng, An i Li 2006; Zhang i in. 2012).

Polisacharydy ścian komórkowych z żywieniowego punktu widzenia stanowią bardzo istotny składnik diety jako błonnik pokarmowy. Od wielu lat spożycie błonnika pokarmowego jest średnio niższe niż zalecane w krajach rozwiniętych, gdzie dominuje żywność wysoko przetworzona wynosząc zaledwie 20 g/dobę/osobę przy zaleceniach 30-45 g/dobę/osobę (Bach Knudsen 2001; Colin-Henrion, Mehinagic, Renard, Richomme i Jourjon, 2009; McCann, Fabre i Day 2011). Polisacharydy wchodzące w skład błonnika pokarmowego mają szerokie prozdrowotne działanie, uczestniczą bowiem w obniżaniu poziomu cholesterolu we krwi, redukcji absorpcji cukru, obniżaniu poziomu lipidów we krwi czy też redukcji ryzyka otyłości (Brownlee 2011; Colin-Henrion, Mehinagic, Renard, Richomme i Jourjon, 2009; Comino, Collins, Lahnstein, Beahan i Gidley 2014; Kahlon i Smith 2007; Kendall, Esfahani i Jenkins 2010; Zhu, Du, Zheng i Li 2014).

Cel naukowy oraz omówienie wyników badań

Celem naukowym badań prac stanowiących *Osiągnięcie* było powiązanie nanostrukturalnych cech polisacharydów ścian komórkowych z wybranymi owocami i warzywami z ich makroskopowymi właściwościami funkcjonalnymi, głównie chemicznymi, reologicznymi, teksturalnymi i mechanicznymi. Powyższy cel naukowy podjęto ze względu na:

1. Brak pełnej charakterystyki struktury polisacharydów ścian komórkowych owoców i warzyw, tj. pektyn, hemiceluloz i celulozy, a szczególnie ich organizacji w ścianach komórkowych, jak również brak wyczerpującego opisu dynamiki ich przemian na skutek aktywności natywnych enzymów.
2. Luki w wiedzy na temat funkcji każdego z tych polisacharydów w kształtowaniu właściwości makroskopowych, w szczególności tekstury i właściwości mechanicznych owoców i warzyw.
3. Możliwość funkcjonalizacji polisacharydów ścian komórkowych pozyskiwanych z owoców i warzyw w celu modyfikacji produktów żywnościowych, co dotychczas było wykorzystane w bardzo nieznacznym stopniu.

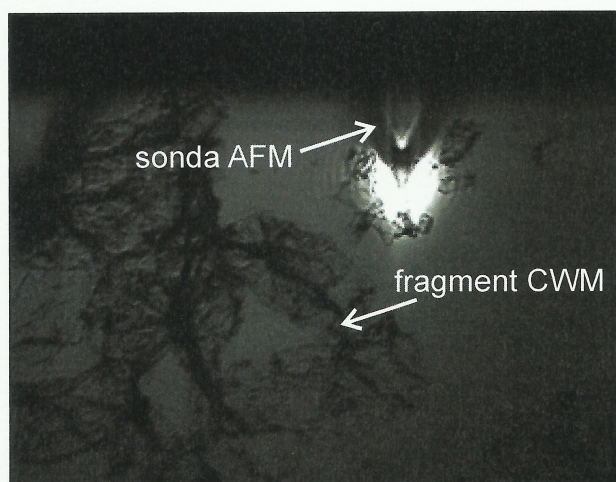
W odniesieniu do powyższych motywów, badania były realizowane w następujących etapach:

1. Charakterystyka nanostruktury polisacharydów ścian komórkowych z wybranych owoców i warzyw.
2. Wpływ budowy molekularnej polisacharydów ścian komórkowych na ich właściwości funkcjonalne.
3. Zdolność polisacharydów ścian komórkowych (pektyn) do sieciowania jonami metali dwuwartościowych.

1. Charakterystyka nanostruktury polisacharydów ścian komórkowych (H2, H4, H5, H7)

Badania będące przedmiotem *Osiągnięcia* poprzedziłam badaniami nad nanostrukturą modelowych ścian komórkowych opartych na celulozie bakteryjnej w ramach realizacji mojej pracy doktorskiej. Wykorzystanie AFM do badań tych analogów pozwoliło mi zdobyć niezbędną wiedzę i umiejętności do realizacji prac związanych z naturalnymi ścianami komórkowymi. W swojej pracy doktorskiej udało mi się zobrazować przy pomocy AFM również ściany komórkowe z jabłek. Pomimo, że badania te na naturalnych ścianach miały charakter wstępny, spowodowały podjęcie decyzji o dalszym rozwoju tej techniki w Zakładzie Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów IAPAN, w którym jestem zatrudniona. W tym celu odbyłam dwumiesięczny staż naukowy na Wydziale Fizyki w The Norwegian University of Science and Technology (NTNU) w Trondheim, gdzie miałam możliwość pracy w jednym z najbardziej doświadczonych zespołów na świecie wykorzystujących AFM do badania struktur biologicznych pod kierunkiem Biorna T. Sokke. Na bazie zdobytej wiedzy opracowałam metodę przygotowania próbek materiałów ścian komórkowych do obserwacji za pomocą AFM wykorzystując różne tryby pracy tego mikroskopu (Rys. 1). Następnie brałam udział w tworzeniu Laboratorium Mikroskopii w Zakładzie Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów IAPAN, gdzie zakupiono dwa AFM-y: Bioscope Catalyst II oraz Multimode 8, które umożliwiły dalszy rozwój preparatyki próbek, obrazowania, analizy obrazu i badań mechanicznych różnych biomolekuł, w tym szczególnie polisacharydów i ścian komórkowych owoców i warzyw.

W badaniach wykonanych częściowo podczas mojego stażu w NTNU nad teksturalnymi właściwościami jabłek różnych odmian wykazano (H2), że nanostruktura ścian komórkowych ma wpływ na teksturę jabłek ocenianą instrumentalnie oraz sensorycznie. Badania obejmowały sześć odmian jabłek: Cortland, Honeycrisp, Jonagold, Ligol, Mutsu i Rubin. Poza charakterystyką nanostruktury materiałów ścian komórkowych (CWM) oraz celulozy wyizolowanej z tych materiałów, wykonano również oznaczenia krystaliczności celulozy metodą szerokokątnej dyfrakcji rentgenowskiej i oznaczenia zawartości kwasu galakturonowego metodą kolorymetryczną. Również, w celu sprawdzenia, czy istnieje związek z nanostrukturą ścian komórkowych a makroskopowymi właściwościami tkanki jabłek wykonano testy makroskopowe: test przebiccia z rejestracją emisji akustycznej oraz analizę sensoryczną parametrów teksturalnych jabłek. Wysokościowe obrazy AFM poddano analizie komputerowej w celu ilościowego opisu ich parametrów topograficznych. Określano średnią średnicę mikrofibryli celulozy na podstawie analizy ich przekrojów, a także średni błąd kwadratowy (RMS) chropowatości na podstawie histogramów wysokości elementów strukturalnych obrazów wysokościowych.

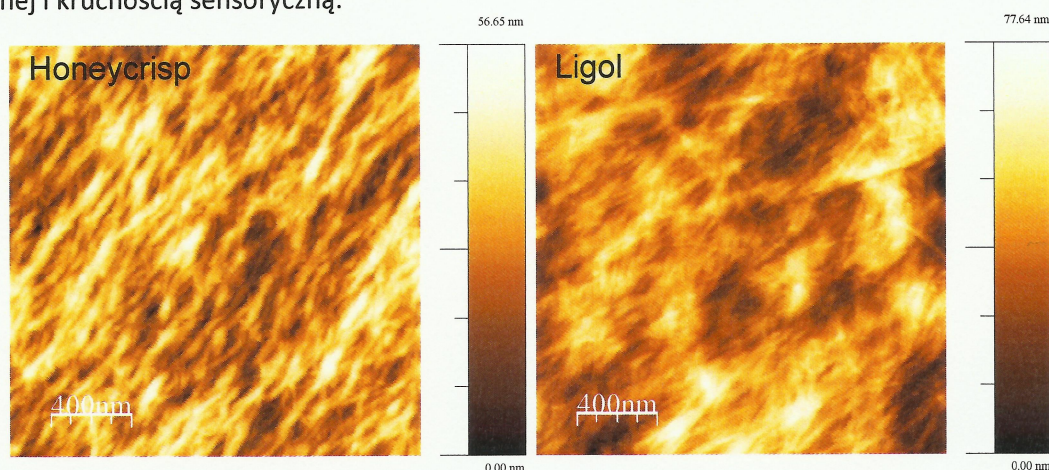


Rys. 1. Skanowanie próbki materiału ścian komórkowych (CWM) sondą AFM w trybie kontaktowym.

Materiały ścian komórkowych (CWM) ekstrahowane z próbek parenchymy jabłek charakteryzowały się typową strukturą wyraźnie zaznaczonych mikrofibryli w matrycy hemicelulozowo-pektynowej. Analiza średniego błędu chropowatości pokazała, że chropowatość CWM uzyskanego z jabłek odmiany Honeycrisp była istotnie większa w porównaniu z chropowatością innych próbek. W celu określenia, czy różnice chropowatości, automatycznie obliczonej z obrazów AFM, wynikały z różnic w budowie molekularnej, usunięto z CWM pektyny i hemicelulozy pozostawiając jedynie czystą sieć celulozową. Stwierdzono na tej podstawie, że istnieją różnice pomiędzy różnymi odmianami jabłek w orientacji, uporządkowaniu i wymiarach geometrycznych mikrofibryli. Na Rys. 2 pokazano przykładowe obrazy nanostruktury celulozy dwóch odmian Honeycrisp i Ligol. Celuloza izolowana z tkanki jabłek odmiany Honeycrisp cechowała się średnią średnicą mikrofibryli około 38 nm, odmiana Mutsu około 33 nm, natomiast pozostałe odmiany w granicach 26-28 nm.

Stopień krystaliczności celulozy wyznaczony na podstawie uśrednionych dyfraktogramów był natomiast najniższy dla odmiany Honeycrisp, najwyższy zaś dla odmiany Jonagold i wynosił

odpowiednio 13 i 24 %. Stopień krystaliczności określa stosunek obiektów krystalicznych do amorficznych i w przypadku celulozy jest różny dla różnych materiałów, np. kilkanaście % dla celulozy pochodzącej z tkanek roślinnych i około 60 % dla celulozy syntetyzowanej przez bakterie. Aby określić zależność parametrów nanostruktury z parametrami opisującymi skład chemiczny, właściwości mechaniczne i sensoryczne, została wykonana analiza głównych składowych (PCA – *principal component analysis*). Wykazałam między innymi, że odmiany o grubszych włóknach celulozy, ale o najniższym stopniu krystaliczności, charakteryzowały się wyższą liczbą zdarzeń w teście emisji akustycznej i kruchością sensoryczną.



Rys. 2. Nanostruktura celulozy ekstrahowanej sekwencyjnie z tkanki miększowej jabłek odmiany Honeycrisp i Ligol. Obrazy wysokościowe AFM wykonane w trybie *tapping* o wymiarach $2 \times 2 \mu\text{m}$.

W kolejnej pracy (H4) podjęłam próbę charakterystyki nanostruktury pektyn ekstrahowanych na drodze ekstrakcji sekwencyjnej ze ścian komórkowych marchwi. Pektyny można podzielić na frakcje pod kątem ich rozpuszczalności. W badaniach zastosowałam ekstrakcję sekwencyjną wg Selvendrana i O’Neilla (1987), w wyniku której otrzymałam następujące frakcje pektyn:

1. WSP- *water soluble pectin*- pektyny rozpuszczalne w wodzie,
2. CSP – *chelator soluble pectin* – pektyny rozpuszczalne w chelatorach wapnia takich jak EGTA (kwas etyleno-glikolo-bis aminoetylo-eterowy), szczawian amonu, EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy), CDTA (kwas cykloheksanodiaminotetraoctowy). Chelator wapnia ma za zadanie usunąć wapń z usieciowanych jonowo pektyn, powodując tym samym ich uwalnianie ze ścian komórkowych
3. DASP – *diluted alkali soluble pectin* – pektyny rozpuszczalne w słabych zasadach, takich jak Na_2CO_3 , które powodują uwolnienie z CWM pektyn związanych kowalencyjnie (Brummell i Harpster, 2001).

Ten schemat ekstrakcji pektyn stosowano w kolejnych pracach H5, H6 i H10. Stosując AFM wykonano charakterystykę nanostruktury frakcji pektyn umieszczonych na mice, wysuszonych i obrazowanych w powietrzu.

Struktura molekularna pektyn rozpuszczalnych w wodzie (WSP)

Za pomocą oprogramowania do analizy obrazu wyodrębniono ponad 50 tys. elementów strukturalnych na obrazach AFM frakcji WSP. Średnia średnica tych obiektów wynosiła $22 \pm 6 \text{ nm}$, przy czym w tej grupie zarejestrowano również ponad 1500 obiektów większych niż 1000 nm^2 .

Zauważono również znikomą ilość wydłużonych obiektów o długości powyżej 50 nm, które stanowiły około 3% wszystkich wykrytych cząsteczek. Pomiary pozwoliły stwierdzić, że pektyny frakcji WSP izolowane z marchwi składają się głównie z bardzo krótkich polimerów pektynowych o średnicy około 22 nm. Wysokość cząstek WSP wynosiła od 0,05 nm do około 3,2 nm, jednak większość z nich mieściła się w zakresie pomiędzy 0,2 a 0,4 nm. Struktura frakcji WSP marchwi posiadała podobne cechy strukturalne do opisanych w literaturze dla brzoskwiń (Yang, An, Feng, Li i Lai 2005; Yang, Chen, An, Lai 2009; Zhang i in. 2012). W badaniach opisanych przez Yanga i wsp. (Yang, An, Feng, Li i Lai 2005) zidentyfikowano dużą liczbę struktur łańcuchowych, wynikało to jednak z wyłączenia małych polimerów z analizy z powodu ograniczeń wynikających z oprogramowania. Podobnie w pracy Zhanga i wsp. (Zhang i in. 2012) wymiary agregatów były większe (91 – 217 nm średnicy) niż w naszych badaniach (16–140 nm średnicy). Różnice te wynikały z różnego pochodzenia pektyn, ale przede wszystkim z zastosowania przez nas komputerowej analizy obrazu, która umożliwiła zwiększenie dokładności detekcji. W kolejnej pracy (H7) w badaniach wykonanych dla gruszek parametry geometryczne agregatów WSP były podobne do tych czasek ekstrahowanych z marchwi, wynosząc średnio 30 nm dla średnicy (płaszczyzna XY) i 0,5 nm wysokości (oś Z). W naszych badaniach udowodniliśmy, ponownie stosując automatyczną analizę obrazu, że około 80-90% cząstek WSP występuje w postaci małych polimerów o powierzchni mniejszej niż 1000 nm². Frakcja WSP zawierała mniejsze ilości kwasu galakturonowego (12,1 mg/g AIR dla marchwi) w porównaniu z innymi frakcjami pektyn, z czego wynika, że prawdopodobnie tworzyły ją również inne oligosacharydy będące wynikiem depolimeryzacji rozgałęzionych pektyn i oddzielenia ich bocznych łańcuchów. W przypadku gruszek zawartość kwasu galakturonowego w WSP była większa w porównaniu z frakcją CSP i różniła się znacznie w zależności od odmiany. Odmiana Konferencja, określana jako miękka, posiadała więcej GaLA we frakcji WSP (56,76 mg/g AIR) niż odmiana Xenia, o jędrnej teksturze (20,17 mg/g AIR).

Struktura molekularna pektyn rozpuszczalnych w chelatorach wapnia (CSP)

Frakcja CSP ekstrahowana przez CDTA zawierała w przypadku marchwi mieszaninę struktur łańcuchowych oraz agregatów składających się z krótkich polimerów podobnych do tych nielicznych wydłużonych uzyskanych we frakcji WSP. W przypadku gruszek, zdecydowanie dominującymi formami były natomiast długie rozgałęzione polimery. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy dla pektyn ekstrahowanych z pomidorów, buraków cukrowych i truskawek (Round, Rigby, MacDougall, Ring i Morris 2001; Kirby, MacDougall i Morris 2008; Round, Rigby, MacDougall i Morris 2010; Pose, Kirby, Mercado, Morris i Quesada 2012). Dla tej frakcji analizowaliśmy obiekty dłuższe niż 30 nm, biorąc pod uwagę całkowitą długość molekuł łącznie z łańcuchami bocznymi. Wyniki analizy obrazu pokazały, że we frakcji CSP znaczącą ilość obiektów stanowią molekuly dłuższe niż 400 nm, a nawet przekraczające 1 µm. Poniżej 30% obiektów miało długość szkieletu od 30 do 100 nm. Wysokość łańcuchów, będąca miarą ich średnicy zgodnie z zasadą, że wysokość na obrazach AFM wierniej odzwierciedla wymiary geometryczne próbki, była niższa niż w przypadku frakcji WSP i wynosiła średnio 0,21 nm dla marchwi i pomiędzy 0,3 a 0,4 nm dla gruszek. Analiza profilu molekuł pokazała, że w miejscach rozgałęzień nie następowało podwajanie wysokości, co świadczyło o rzeczywistych rozgałęzieniach, a nie o przypadkowym nakładaniu się łańcuchów pektyn. W ten sposób

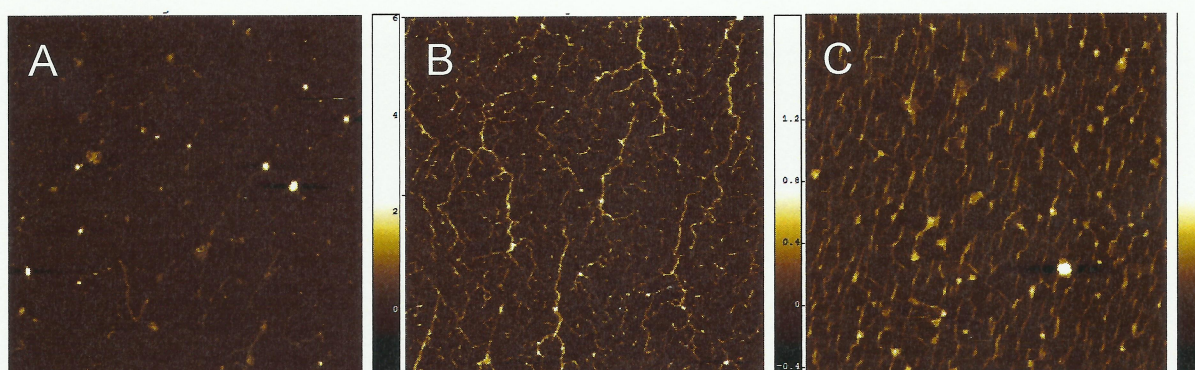
potwierdzono, że molekuly frakcji CSP mają faktycznie rozgałęzioną strukturę, którą zaproponowali wcześniej Round i wsp. (Round, Rigby, MacDougall, Ring i Morris 2001). Uważa się, że frakcja CSP jest zbudowana głównie z częściowo estryfikowanych homogalakuronianów pochodzących z blaszki środkowej (Redgwell, Melton i Brasch 1992; Willats, Knox i Mikkelsen 2006). Wyniki pomiarów zawartości kwasu galakturonowego dla marchwi wykazały, że ilość GalA była znacznie większa niż dla frakcji WSP i wynosiła około 52 mg/g AIR, natomiast w przypadku gruszek wartość ta wynosiła zaledwie kilkanaście mg/g AIR. Traktowanie próbki chelatorem wapnia miało za zadanie usunięcie jonów Ca^{2+} , w związku z tym widoczne rozgałęzienia nie mogły być związane z obecnością mostków wapniowych. Zaproponowano więc, że rozgałęzione struktury mogą być zbudowane z homogalakuronianów związanych kowalencyjnie z ramnogalakuronianami typu I (RG-I) (Coenen, Bakx, Verhoef, Schols i Voragen 2007; Round, Rigby, MacDougall i Morris 2010). Zostało to potwierdzone przez analizę widm FT-IR, gdzie stwierdzono obecność pasm 1040, 975 i 945 cm^{-1} charakterystycznych dla obszaru daktyloskopowego RG-I zawierającego jednostki galaktozy i arabinozy (Coimbra, Barros, Barros, Rutledge i Delgadillo 1998; Kacuráková, Capek, Sasinková, Wellner i Ebringerová 2000).

Struktura molekularna pektyn rozpuszczalnych w słabych zasadach (DASP)

Frakcja DASP ekstrahowana z marchwi oraz gruszek za pomocą węgla sodu cechowała się odmienną strukturą w porównaniu do frakcji WSP i CSP. Molekuly DASP tworzyły na mice regularną, samoorganizującą się sieć. Wyjątkowa organizacja tej frakcji została potwierdzona także dla innych owoców, takich jak jabłka, cytryny, truskawki, śliwki. Większość cząsteczek pektyn tworzących tą frakcję posiadało wysokość około 0,8 nm. Ta wartość odpowiada spodziewanej średnicy pojedynczego łańcucha polisacharydowego o konformacji helisy (Round, MacDougall, Ring i Morris 1997). Pomimo wcześniejszych badań tej frakcji przy pomocy AFM w podobnych warunkach (Pose, Kirby, Mercado, Morris i Quesada 2012, Round, Rigby, MacDougall i Morris 2010) samoorganizujące się właściwości tej frakcji nie były wcześniej prezentowane. Należy podkreślić, że charakterystyczna samoorganizująca się struktura występowała w terminie dojrzałości zbiorczej, po którym następował jej rozpad. Prawdopodobnie precyzyjne określenie terminu dojrzałości zbiorczej oraz wykonanie badań na świeżych próbkach pozwoliło nam na uchwycenie tych właściwości. Badania FT-IR pokazały, że DASP zawierała poza kwasem galakturonowym także łańcuchy galaktozy i arabinozy oraz inne cukry proste. Zawartość kwasu galakturonowego była znacznie większa niż w przypadku WSP i CSP. Szczegółowa analiza obrazów AFM pokazała, że długie, proste molekuly, posiadające miejscami wyraźnie pogrubione odcinki, są połączone przez łańcuchy boczne. Zaobserwowano również, że długie i proste molekuly posiadają liczne zgięcia pod charakterystycznym kątem około $118^\circ \pm 11^\circ$. Natomiast łańcuchy boczne łączyły się z prostymi polimerami poprzez miejsca węzłowe pod kątem około $119 \pm 11,7^\circ$, czyli podobnym do kąta zginania. Te charakterystyczne kąty były odpowiedzialne za tworzenie regularnej struktury sieci na mice. Średnia odległość pomiędzy długimi molekulami wynosiła około 50–70 nm. Długie proste molekuly prawdopodobnie można uznać za odcinki liniowego homogalakuronianu, podczas gdy pogrubione obszary mogą być rozgałęzionymi RG-I, połączonymi wiązaniami kowalencyjnymi zgodnie z modelem zaproponowanym przez Rounda i wsp. (Round, Rigby, MacDougall i Morris 2010). Struktury agregatowe widoczne pomiędzy liniowymi

cząsteczkami mogą być cząsteczkami ramnogalakturonianów typu I. Samoorganizująca się budowa frakcji DASP może tłumaczyć wiele procesów zachodzących w ścianach komórkowych. Przestrzenie tworzone między usieciowanymi biopolimerami są wystarczające do pomieszczenia włókien celulozy i hemiceluloz, mogą zatem stabilizować, a nawet warunkować przestrzenną budowę ściany komórkowej.

Właściwości nanostrukturalne frakcji pektyn, opisane po raz pierwszy w tych publikacjach, można uznać za uniwersalne dla pektyn ekstrahowanych z tkanek miękkich owoców i korzeni roślin (Rys. 3). Rozdzielone w opisany sposób frakcje WSP, CSP i DASP mogą mieć znaczenie także w inżynierii materiałowej. Istotne różnice między budową pektyn poszczególnych frakcji pociągają za sobą także różnice w ich właściwościach, m.in. reologicznych, co może skutkować nowymi zastosowaniami tych związków w żywności lub redefiniowaniem ich roli we właściwościach ścian komórkowych.



Rys. 3. Obrazy AFM nanostruktury frakcji pektyn ekstrahowanych z tkanki miękkiej jabłek odmiany Szampion w terminie dojrzałości zbiorczej, A) WSP, B) CSP, C) DASP. Wyniki niepublikowane, komplementarne do opublikowanych w pracach H4 i H5.

Struktura molekularna hemiceluloz

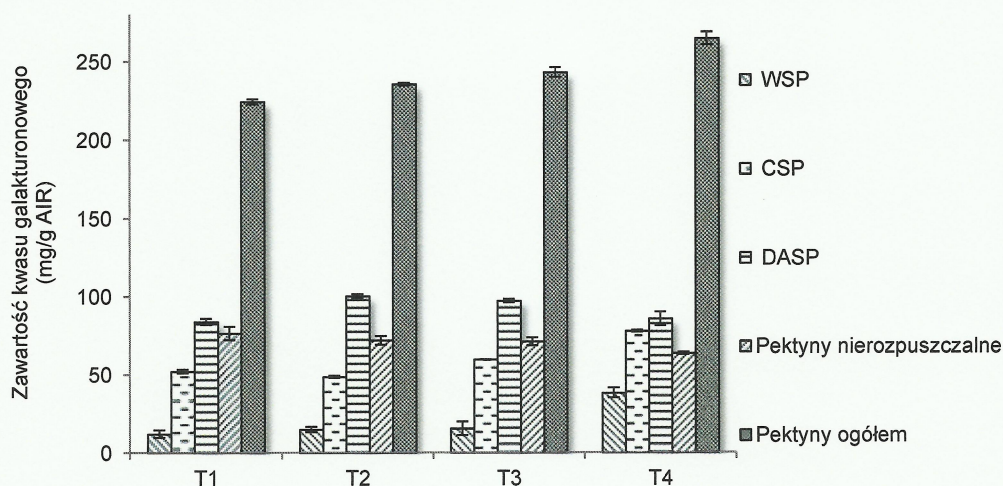
Frację hemiceluloz otrzymywano w wyniku sekwencyjnej ekstrakcji, traktując osad po etapach izolacji frakcji pektyn wodorotlenkiem potasu. Hemicelulozy sporadycznie występowały również w formie prostych, długich molekuł we frakcji DASP formując niezależną sieć, istotnie różniącą się od samoorganizującej się sieci pektynowej (H4). Właściwe frakcje hemiceluloz, ekstrahowane z tkanki miękkiej gruszek, miały strukturę odcinków o długości od 20 do 400 nm. W przypadku dwóch odmian gruszek zaobserwowano różnice w budowie cząstek hemiceluloz, ponieważ dla odmiany Xenia te polimery miały skłonności do wygięć i formowania splątanej sieci, co nie miało miejsca w przypadku odmiany Konferencja. Wysokość tych molekuł była znacznie większa niż wysokość łańcuchów pektynowych i wynosiła pomiędzy 1 a 4 nm dla Konferencji i około 1 nm dla odmiany Xenia (H5). W pracy H7 podjęto próbę opisu nanostruktury ksyloglukanu, który jest dominującym związkiem z grupy celuloz w tkance miękkiej jabłek. Jako model wybrano jednak komercyjny ksyloglukan z tamaryndowca stosowany jako standard porównawczy w tego typu badaniach. Badania AFM pokazały, że molekuły ksyloglukanu miały budowę prostoliniowych odcinków o średniej średnicy $2,3 \pm 0,5$ nm i średniej długości 640 ± 360 nm ułożonych w większości jako indywidualne i odseparowane molekuły. Z analizy obrazów topograficznych wynikało, że łańcuchy ksyloglukanu mają konformację helikalną o skoku $115,8 \pm 29,2$ nm. Cząsteczki miejscami były

ugięte pod kątem $127,8 \pm 25,6^\circ$. Molekuły ksyloglukanu były zdolne do formowania agregatów poprzez krzyżowanie się cząsteczek pod preferowanym kątem $114,2 \pm 36,3^\circ$. Scharakteryzowano dwa alternatywne sposoby łączenia się łańcuchów ksyloglukanowych. Pierwszy polegał na łączeniu końca jednego łańcucha do drugiego w środku tego drugiego poprzez ich nakładanie się, co stwierdzono przez analizę profilu utworzonego węzła. Drugi sposób agregacji polegał na wzdłużnym łączeniu równoległe biegnących łańcuchów przez pewien odcinek, które także powodowało podwojenie wysokości profilu połączonych cząstek. Równoległe połączenie sąsiadujących łańcuchów było analogicznym sposobem sieciowania, jaki występuje dla ugrupowań ksyloglukan-celuloza, gdzie proste odcinki ksyloglukanu łączą się z celulozą za pomocą oddziaływań wodorowych. Badania przeprowadzone na modelowym ksyloglukanie z tamaryndowca pokazały nowe cechy strukturalne tego polisacharydu oraz jego zdolności do formowania regularnych struktur.

Naturalne przemiany związków pektynowych

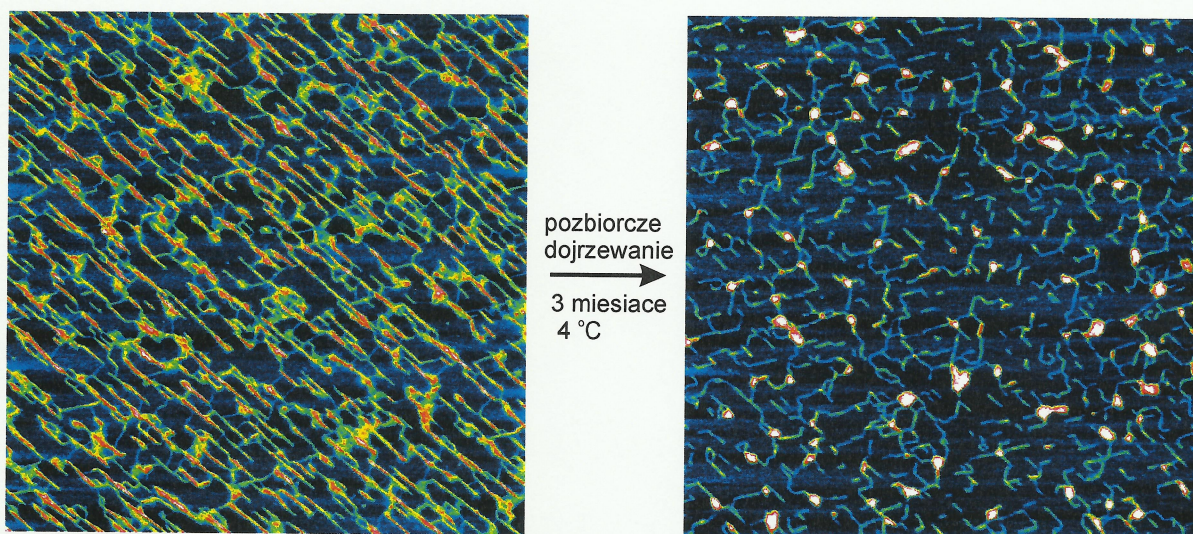
W ścianach komórkowych najszybszym zmianom fizjologicznym ulegają związki pektynowe, które podlegają degradacji enzymatycznej. W celu zbadania charakteru tych zmian w odniesieniu do ich nanostruktury oraz parametrów biochemicznych wykonano trzymiesięczny eksperyment przechowalniczy marchwi, w miesięcznych odstępach (H4).

Podczas przechowywania w warunkach chłodniczych stwierdzono wzrost zawartości kwasu galakturonowego ogółem z poziomu 224 mg/g w terminie zbioru do 265 mg/g po trzech miesiącach przechowywania (Rys. 4). W poszczególnych frakcjach pektyn zaobserwowano wzrost zawartości GaLA w WSP i CSP, a spadek dla DASP. Zmiany zawartości GaLA powiązano z dwoma procesami: przekształceniach związków pektynowych pod wpływem działalności enzymów oraz biosyntezą nowych pektyn. Enzymatyczna degradacja powodowała transfer części kowalencyjnie związanych pektyn frakcji DASP oraz pektyn nierozpuszczalnych do frakcji rozpuszczalnych w wodzie i chelatorze wapnia.



Rys. 4. Zmiany zawartości kwasu galakturonowego we frakcjach pektyn ekstrahowanych z marchwi podczas pozbiorniczego dojrzewania. AIR – materiał ścian komórkowych ekstrahowany etanolem. T1 - termin zbioru, T2, T3, T4 – 1, 2, i 3 miesiąc przechowywania. Wykres zaadaptowany z H4.

W badanym okresie nastąpił wzrost ilości i rozmiarów cząsteczek frakcji WSP, co było spowodowane najprawdopodobniej przez agregację zdepolimeryzowanych fragmentów pektyn na skutek działalności pektynaz. Jednocześnie nastąpiły znaczne zmiany w nanostrukturze pektyn CSP: skrócenie łańcuchów, spadek ilości łańcuchów bocznych i spadek wysokości molekuł. Podczas pozbiórczego dojrzewania nastąpiła całkowita dekompozycja samoorganizującej się sieci frakcji DASP (Rys. 5). Po trzech miesiącach przechowywania pektyny tej frakcji występowały w formie pojedynczych molekuł o znacznie skróconych wymiarach. Zmiany strukturalne we frakcji CSP były spowodowane najprawdopodobniej aktywnością pektynometyloesterazy i poligalakturonazy, a we frakcji DASP również β -galaktozydazy i α -arabinofuranozydazy, co potwierdziły zmiany widm FT-IR.



Rys. 5. Transformacje frakcji pektyn DASP w wyniku pozbiórczego dojrzewania w czasie 3-miesięcznego okresu przechowywania marchwi w warunkach chłodniczych. Obrazy AFM o wymiarach $2 \times 2 \mu\text{m}$. Analogiczne wyniki zaprezentowano w pracy H4.

Wykazano, że zmiany nanostruktury związków pektynowych skutkują zmianami ich właściwości reologicznych, co pokazano w pracy H6 oraz nanomechanicznych, opisanych w pracy H10. Procesy te zostały opisane w kolejnej części Autoreferatu.

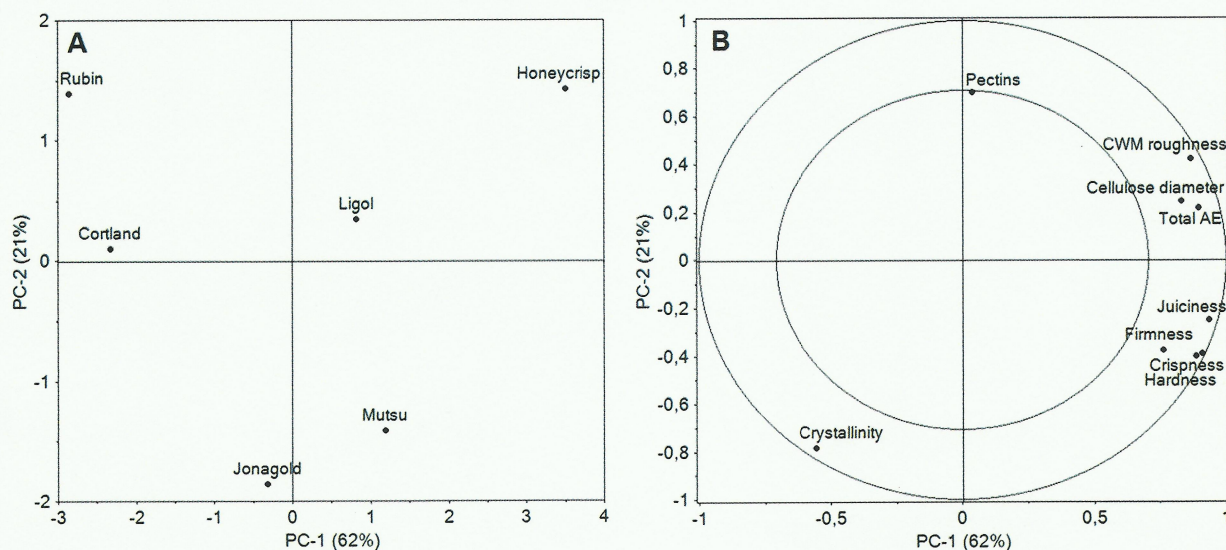
2. Wpływ budowy molekularnej polisacharydów ścian komórkowych na ich właściwości funkcjonalne (H2, H3, H4, H5, H6, H10)

Zależność tekstury i nanostruktury ścian komórkowych

W pracy H2 pokazano, że molekularna budowa sieci celulozowej, tworzącej szkielet ścian komórkowych, ma istotny wpływ na właściwości makroskopowe tkanki jabłek. Analiza PCA parametrów nanostruktury, takich jak stopień krystaliczności celulozy, chropowatość, średnica mikrofibrili celulozy, wykazała, że mają one istotny związek z kruchością i jędrnością owoców.

Badania pokazały, że pomiędzy różnymi odmianami owoców tego samego gatunku, w tym przypadku jabłek, wystąpiły znaczące różnice w budowie ściany komórkowej. Jabłka odmiany Honeycrisp charakteryzowały się istotnie odmienną nanostrukturą od pozostałych odmian, posiadały najgrubsze mikrofibryle celulozy i najniższy stopień ich krystaliczności. Odmiany Cortland i Rubin

posiadały natomiast najcieńsze mikrofibryle i stosunkowo wysoki stopień krystaliczności. Porównując właściwości makroskopowe, odmiana Honeycrisp została oceniona jako bardzo krucha, soczysta i twarda, podczas gdy Cortland i Rubin zostały określone jako miękkie i o niskiej chrupkości. Owoce określane jako kruche, twarde i soczyste posiadały grubsze mikrofibryle i niższą krystaliczność. Takie owoce emitowały silny dźwięk podczas testu przebicia, co zostało zmierzone jako wysoka liczba zliczeń emisji akustycznej, jakkolwiek nie stwierdzono równie silnej zależności z jędrnością określaną w teście przebicia. Kruchość i soczystość owoców jest powiązana z pękaniem ścian komórkowych (Waldron, Smith, Parr, Ng i Parker 1997). Podczas ściskania komórki o wysokim ciśnieniu turgorowym ściany komórkowe pękają generując fale dźwiękowe, których amplituda jest proporcjonalna do naprężenia w momencie pęknięcia (Malecki i Opilski 1994). Na podstawie wyników eksperymentu wysunięto więc przypuszczenie, że grubsze fibryle celulozy powodują wyższe naprężenie podczas pęknięcia ścian komórkowych i wzrost odczucia kruchości oraz ilości zliczeń emisji akustycznej. Hipoteza, że średnica mikrofibryli celulozy wpływa na teksturę, jest poparta także wynikami testu mechanicznego (H2). Grubsze mikrofibryle korespondowały bowiem z twardszą tkanką ze względu na wzrost wytrzymałości na rozciąganie ściany komórkowej. Grubsze mikrofibryle cechowały się niższą krystalicznością. Na podstawie analizy PCA stwierdzono, że stopień krystaliczności korelował negatywnie z parametrami charakteryzującymi teksturę tkanek (Rys.6). Wyniki eksperymentu sugerują, że grubość mikrofibryli celulozy wpływa na wytrzymałość mechaniczną tkanki, co z kolei ma odbicie we właściwościach teksturalnych mierzonych sensorycznie i instrumentalnie. Na podstawie tych wyników wysunięto wniosek, że w biomechanicznym modelu tkanki roślinnej należy uwzględnić również nanostrukturalne właściwości ścian komórkowych.



Rys. 6. Analiza głównych składowych (PC1i PC2) dla parametrów oceny sensorycznej (chrupkość, twardość i soczystość), właściwości mechanicznych (jędrność i ogólna liczba zliczeń emisji akustycznej), oraz parametrów nanostruktury ścian komórkowych (chropowatość CWM, średnica mikrofibryli celulozy, krystaliczność, zawartość pektyn) dla sześciu odmian jabłek, (a) wykres przypadków, (b) wykres ładunków czynnikowych.

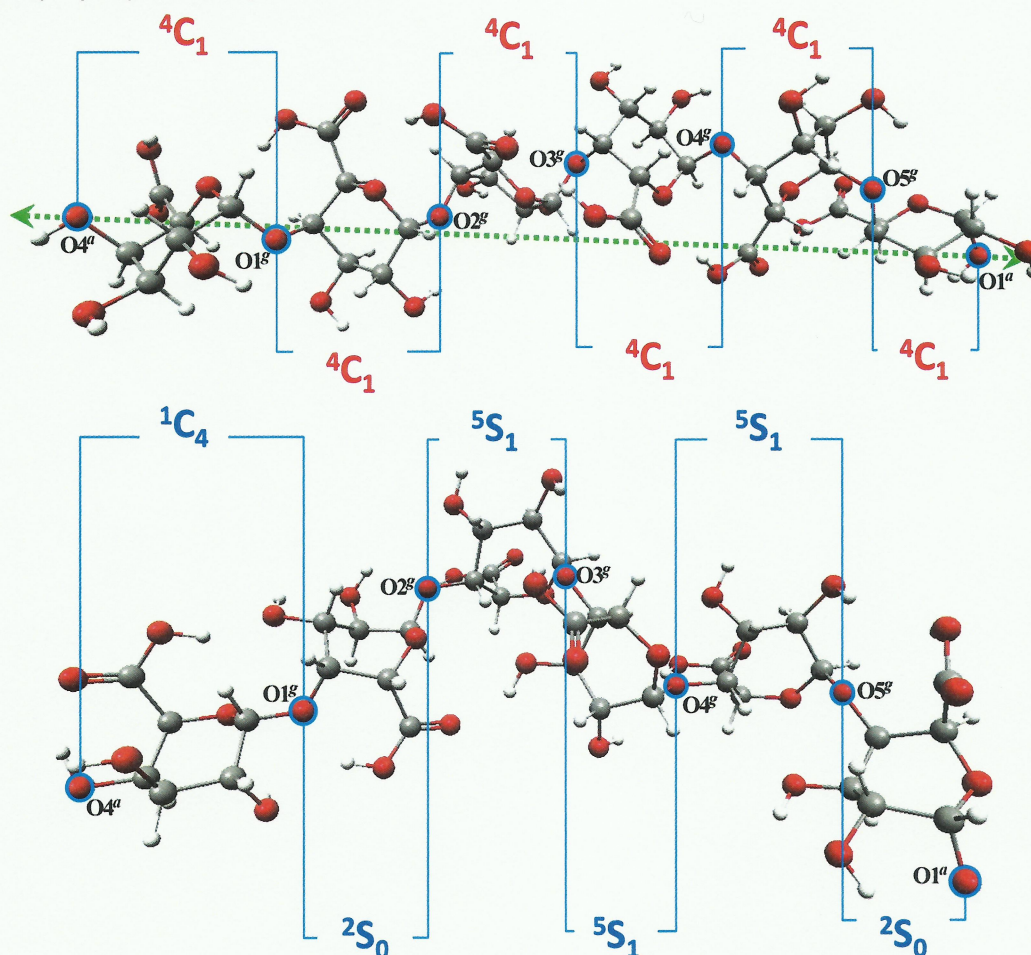
Opublikowano w H2: Cybulska J., Zdunek A., Psonka-Antończyk K.M., Stokke B.T. 2013. The relation of apple texture with cell wall nanostructure studied using an atomic force microscope. *Carbohydrate Polymers* 92, 128–137.

W publikacji H5 analizowano związek pomiędzy nanostrukturą gruszek dwóch odmian – Konferencja i Xenia, z ich właściwościami teksturalnymi. Odmiany różniły się istotnie pod względem tekstury określanej poprzez jędrność, zliczenia emisji akustycznej oraz sensorycznie. Odmiana Xenia charakteryzowała się wyższą jędrnością oraz kruchością (wyrażaną sensorycznie oraz instrumentalnie jako ilość zliczeń emisji akustycznej podczas testu przebiccia) w porównaniu z odmianą Konferencja. Cechy makroskopowe zostały porównane z budową molekularną ścian komórkowych, które warunkują makroskopową teksturę. Frakcja WSP składała się z pektyn luźno związanych oraz powstałych w wyniku depolimeryzacji materiału ścian komórkowych (H4). Wysokość tych obiektów strukturalnych wynosiła około 0,5 nm, co jest zgodne z teoretyczną średnicą jednostki kwasu galakturonowego (H3), określoną na około 0,4-0,6 nm. Większą ilość WSP (5,7 % AIR) znaleziono w ścianach komórkowych odmiany Konferencja, natomiast w przypadku odmiany Xenia frakcja ta była mniej liczna (2 % AIR). Analiza obrazów AFM pokazała, że odmiana Xenia posiadała grubsze molekuly frakcji CSP, które były również bardziej rozgałęzione (*branching index*) niż analogiczne struktury odmiany Konferencja, które cechowały się ponadto bardziej homogenicznym rozkładem grubości. Mniejsza średnica włókien stwierdzona dla odmiany Konferencja korespondowała z teoretyczną średnicą szkieletu homogalakturonianu. Natomiast średnica około 1,3 nm włókien CSP izolowanych z odmiany Xenia świadczyła najprawdopodobniej o obecności obojętnych cukrów przyłączonych do szkieletu homogalakturonianu w postaci łańcuchów bocznych. Bardziej rozgałęziona struktura CSP odmiany Xenia powinna zapewniać większą adhezję międzykomórkową, co prowadzi do większej jędrności oraz niższej mączystości. Frakcja DASP ekstrahowana z gruszek posiadała zdolność do samoorganizacji na mice, jednak w przypadku odmiany Xenia zaobserwowano większą zdolność do zagęszczenia polimerów w tej strukturze w porównaniu do odmiany Konferencja, co także powiązano z wyższą jędrnością odmiany Xenia. Frakcje hemiceluloz, ekstrahowane wodorotlenkiem potasu także były różne dla badanych odmian gruszek. We frakcji hemiceluloz z gruszek odmiany Konferencja zaobserwowano pogrubienie włókien, natomiast hemicelulozy pochodzące z odmiany Xenia były bardziej skręcone i cieńsze, z tendencją do tworzenia splątanej, ale homogenicznej sieci. Z tych obserwacji wywnioskowano, że hemicelulozy o cieńszych i bardziej giętkich łańcuchach prawdopodobnie łatwiej sieciują mikrofibryle celulozy w ścianie komórkowej, uczestnicząc w podwyższeniu jej sztywności. Nie znaleziono natomiast istotnych różnic w budowie sieci celulozowej, tj. grubość włókien była podobna na granicy błędu. Badania wykazały, że tekstura oceniana makroskopowo jest powiązana z cechami nanostrukturalnymi polisacharydów ścian komórkowych, w szczególności pektyn i celulozy. Mniej zdegradowane, grubsze i bardziej rozgałęzione cząsteczki pektyn występowały w odmianie o większej jędrności i lepiej ocenianej sensorycznie teksturze. Z kolei struktura hemiceluloz zapewniająca większe możliwości sieciowania mikrofibryli celulozy była charakterystyczna dla odmiany o większej jędrności.

Symulacja eksperymentu AFM na cząsteczkach homogalakturonianu (H3)

Ze względu na kluczowe znaczenie właściwości nanomechanicznych pektyn dla ich funkcji w systemie ściany komórkowej, ale również dla ich charakterystyki materiałowej, rozpoczęto badania teoretyczne symulacji testu mechanicznego na cząsteczkach modelowego homogalakturonianu (H3). Fisher i wsp. (Fischer, Marszałek i Fernandez 2000) wykazali, że rozciąganie monomerów

polisacharydów takich jak celuloza i kwas poligalakturonowy pozwala na opisanie transformacji przestrzennych tych związków oraz opracowanie teoretycznego modelu ich sprężystości. Eksperymenty AFM z zakresu manipulacji pojedynczymi molekułami mogą być symulowane przy zastosowaniu modelowania molekularnego. Poprzez oddziaływanie końcówką sondy na cząsteczkę, można przykładać do niej dowolną siłę w dowolnym kierunku. W praktyce oznacza to, że możliwe jest ściskanie lub rozciąganie molekuł. Pod wpływem oddziaływań z sondą AFM następuje szereg różnego rodzaju przekształceń, takich jak zmiana geometrii molekuły, pękanie wiązań chemicznych lub powstawanie nowych wiązań, które mogą wpływać na makroskopowe procesy biologiczne. Przeprowadzane były badania sił umożliwiające rozciąganie pojedynczych molekuł związków cyklicznych, polisacharydów, białek oraz kwasów nukleinowych (Fischer, Marszałek i Fernandez 2000, Woliński i Baker 2009). Woliński i Baker (2009) zaproponowali kwantowy model EGO (*enforced geometry optimisation*) symulujący rozciąganie cząsteczki w mikroskopie sił atomowych. W ramach teoretycznego eksperymentu, w pracy H3 wykonano model homogalakturonianu i opisano parametry tej cząsteczki (Rys. 7).



Rys. 7. Struktury molekularne otrzymane w wyniku symulacji eksperymentu AFM homogalakturonianu składającego się z sześciu jednostek kwasu galakturonowego przed i po procesie relaksacji struktury otrzymanej w wyniku działania sił zewnętrznych. Symulacje EGO pokazują zmianę konformacji jednostek kwasu α -D-galakturonowego z konformacji krzesłowej na konformację odwróconego krzesła przez struktury skręconej łańcucha.

Opublikowano w H3: Cybulska J., Brzyska A., Zdunek A., Woliński K. 2014. Simulation of force spectroscopy experiments on galacturonic acid oligomers. *PLoS ONE* 9(9), e107896.

Podczas symulacji EGO rozciągania biopolimerów przy użyciu AFM (H3), wykazano, że cząsteczki kwasu poligalakturonowego przechodzą z konformacji krzesłowej 4C_1 do postaci odwróconego krzesła 1C_4 poprzez niestabilne struktury skręconej łódki (5S_1 i 2S_0). Określono wartość sił zewnętrznych, które są wymagane do wywołania takich nieodwracalnych przemian, a także do rozerwania wiązania glikozydowego. Modelowanie kwantowochemiczne tych procesów pozwoliło na opis zjawisk obserwowanych doświadczalnie, a do tej pory nie zinterpretowanych. Ponadto, teoretycznie udowodniono zmniejszenie stopnia skręcenia helisy kwasu poligalakturonowego jako skutek przyłożenia sił zewnętrznych.

Pokazano, że pozycja pojedynczego pierścienia monosacharydu w łańcuchu poli/oligosacharydowym ma istotny wpływ na charakter zmian konformacyjnych wywołaniem siłami zewnętrznymi (Tabela 1). Wymuszone przejście konformacyjne ${}^4C_1 \rightarrow {}^1C_4$ zachodziło we wszystkich terminalnych jednostkach kwasu galakturonowego posiadających niezwiązany atom $O4^a$. Jednostki terminalne posiadające niezwiązany atom $O1^a$ podlegały natomiast w takich samych warunkach konwersji ${}^4C_1 \rightarrow {}^2S_0$ pierścienia. W pozostałych jednostkach kwasu α -D-galakturonowego ulokowanych wewnątrz łańcuchów oligomerów zachodziło przejście ${}^4C_1 \rightarrow {}^5S_1$. Przeprowadzone symulacje rozciągania homogalakturonianów pokazały, że reprezentatywną strukturą, wystarczającą do przeprowadzania badań teoretycznych właściwości nanomechanicznych jest struktura tetrameru, zbudowanego z czterech jednostek kwasu galakturonowego. Opracowany teoretyczny model molekularny odwzorowywał prawidłowo liniowe i nierozgałęzione struktury homogalakturonianu. Opracowany model ma znaczenie dla dalszych badań nad zmianami w strukturze pektyn w wyniku oddziaływania z białkami oraz ich sieciowania, np. jonami metali, które może zależeć od aktualnej konformacji cząsteczki.

Tabela 1. Odległości pomiędzy kolejnymi atomami tlenu zaangażowanymi w kolejne wiązania glikozydowe ($O4^a$, $O1^a$ i O^g) cząsteczki heksameru kwasu α -D-galakturonowego początkowej, po teście rozciągania i po procesie relaksacji otrzymane jako wynik przyłożenia sił zewnętrznych $f=0,07$ au (5,77 nN). Tabela zaadoptowana z H3.

	$O4^aO1^{g*}$	$O1^bO2^{b*}$	$O2^gO3^{g*}$	$O3^gO4^{g*}$	$O4^gO5^{g*}$	$O5^gO1^a$	L(długość cząsteczki)
	[Å]						
<i>struktura początkowa</i>							
heksamer	4,486 ^c	4,518 ^c	4,501 ^c	4,493 ^c	4,503 ^c	4,618 ^c	25,329
<i>struktura powstała w wyniku rozciągania z $f=0,07$ au</i>							
heksamer	6,090	5,964	5,971	5,968	5,968	6,066	35,830
<i>struktura po relaksacji</i>							
heksamer	5,517 ^{ic}	5,079 ^{b2}	4,340 ^{b1}	4,389 ^{b1}	4,376 ^{b1}	5,123 ^{b2}	20,964

c – konformacja krzesłowa (4C_1)

b1 – konformacja skręconej łódki (1)

b2 – konformacja skręconej łódki (2)

ic – konformacja odwróconego krzesła (1C_4)

$O^{g*}=O1^a$ – dla skrajnego atomu tlenu

Zmiany właściwości mechanicznych ścian komórkowych podczas pozbiornego dojrzewania (H10)

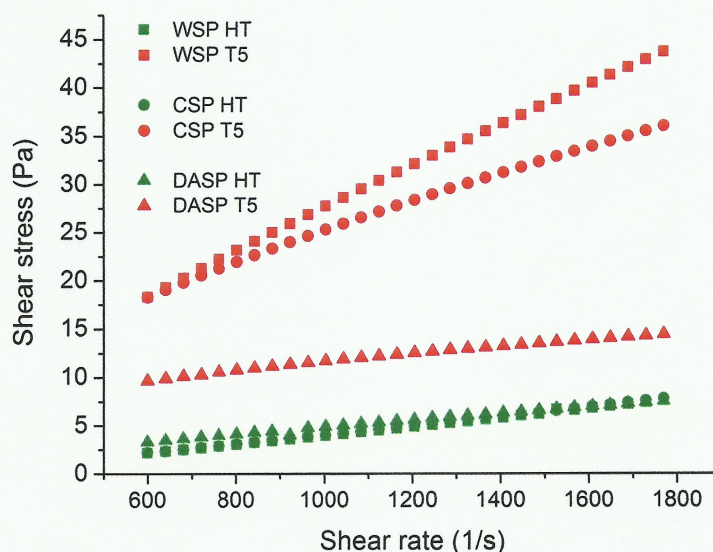
Na podstawie zaobserwowanych zmian nanostruktury poszczególnych polisacharydów ścian komórkowych wysunięto hipotezę, że podczas fizjologicznych transformacji, zmianom podlegają także właściwości mechaniczne ścian komórkowych. Opracowano metodę pomiaru modułu Younga z wykorzystaniem AFM dla ścian komórkowych ekstrahowanych etanolem z parenchymy gruszek w środowisku ultraczystej wody (H10). Wykorzystano badane wcześniej odmiany Konferencja i Xenia, w tym przypadku uwzględniając okres dojrzewania przed- jak i pozbiornego. Moduł Younga materiału ścian komórkowych malał linowo w okresie przedzbiornym z $3,2 \pm 1,8$ do $1,1 \pm 0,7$ MPa dla odmiany Konferencja i z $1,9 \pm 1,2$ do $0,2 \pm 0,1$ MPa dla odmiany 'Xenia', co było skorelowane z liniowym spadkiem jędrności owoców. Natomiast podczas pozbiornego przechowywania moduł Younga ścian komórkowych wzrastał, podczas gdy jędrność owoców nadal się zmniejszała. Analiza korelacji z całego okresu eksperymentu pokazała brak bezpośredniej relacji pomiędzy modułem Younga pierwotnych ścian komórkowych a jędrnością owoców. Moduł Younga ścian komórkowych korelował natomiast ujemnie z zawartością kwasu galakturonowego we frakcji DASP Konferencji oraz we frakcji pektyn nierozpuszczalnych w odmianie Xenia, a także dodatnio z aktywnością poligalakturonazy w obu odmianach. Uznano, że jest to dowód na to, że kowalennie związane pektyny odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu sztywności ścian komórkowych owoców, tj. ich degradacja powoduje zwiększenie sztywności. W oparciu o otrzymane eksperymentalne wyniki zaproponowano model przemiany owoców podczas pozbiornego przechowywania. Usztywnianie ścian komórkowych powoduje, że wraz z degradacją blaszki środkowej proces pękania zmienia się na międzykomórkowy, co skutkuje spadkiem kruchości i wzrostem mączystości owoców. Jest zgodne z wcześniejszymi hipotezami i wynikami eksperymentów (Zdunek 2008, H1).

Właściwości reologiczne polisacharydów ścian komórkowych (H6)

Właściwości reologiczne należą do głównych cech polisacharydów, w szczególności pektyn, które są wykorzystywane w praktyce. Dotychczas były one badane przede wszystkim dla pektyn ekstrahowanych za pomocą jednego czynnika, zwykle kwasu solnego, azotowego lub szczawiowego. W moich badaniach postawiłam hipotezę, że frakcje pektyn, które znacznie różnią się nanostrukturą, będą posiadały również odmienne właściwości reologiczne. W celu jej weryfikacji wykonano analizę właściwości reologicznych na 2% wodnych roztworach frakcji WSP, CSP i DASP ekstrahowanych z korzenia marchwi podczas pięciomiesięcznego okresu przechowywania. Wyznaczono lepkość roztworów oraz krzywe płynięcia (zależność naprężenia stycznego od prędkości ścinania) i krzywe lepkości (zależność lepkości od prędkości ścinania). W terminie dojrzałości zbiorczej lepkość wszystkich frakcji była na podobnym poziomie, natomiast wraz z postępującymi transformacjami molekularnymi, zmieniała się charakterystyka reologiczna każdej frakcji (Rys. 8). Najwyższą lepkością charakteryzowały się pektyny frakcji WSP (maksymalna lepkość wynosiła $0,045 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) w porównaniu do CSP ($0,023 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) i DASP ($0,011 \text{ Pa}\cdot\text{s}$).

Pektyny związane kowalencyjnie w ścianach komórkowych (DASP) wykazywały właściwości tiksotropowe. Zjawisko tiksotropii można opisać jako odwracalne przejścia płynu ze stanu żelu w zol pod wpływem przyłożonej siły, po czym powrót do stanu żelu następuje po usunięciu działania siły.

W płynach tiksotropowych lepkość maleje pod wpływem naprężenia stycznego, po czym po zakończeniu procesu ścinania płyn pozostawiony w spoczynku powraca do początkowej lepkości. W celu określenia wielkości efektu tiksotropowego wykorzystano metodę obliczenia pola powierzchni pętli tiksotropowej (pętli histerezy). Efekt tiksotropowy frakcji DASP wzrastał w czasie pozbiorczego dojrzewania i wynosił 14% po pięciu miesiącach, w porównaniu do 3% w terminie zbioru. Frakcja DASP złożona z polisacharydów związanych ze ścianą komórkową za pomocą kowalencyjnych wiązań i wykazująca zdolność samoorganizacji wykazywała większą zdolność do odbudowy struktury żelu niż luźno połączone wiązaniami wodorowymi polisacharydy frakcji WSP czy też usieciowane za pomocą wiązań jonowych frakcji CSP. W oparciu o model Ostwalda (*Power law model*) określono specyficzne dla każdej frakcji właściwości płynięcia. Ustalono, że parametry płynięcia frakcji DASP (współczynnik konsystencji oraz wskaźnik płynięcia) nie zależały od czasu, natomiast analiza WSP i CSP pokazała zmianę przepływu z dylatacyjnego na pseudoplastyczny. Te zmiany były związane z indukowanymi enzymatycznie transformacjami molekularnymi, które prowadziły do osiągnięcia zdolności żelowania. Wyniki tych badań pokazały, że w zależności od użytego rozpuszczalnika do ekstrakcji pektyn oraz od stopnia dojrzałości, w tym konkretnym przypadku korzeni marchwi, właściwości pektyn mogą być dostosowywane do specyficznych zastosowań.



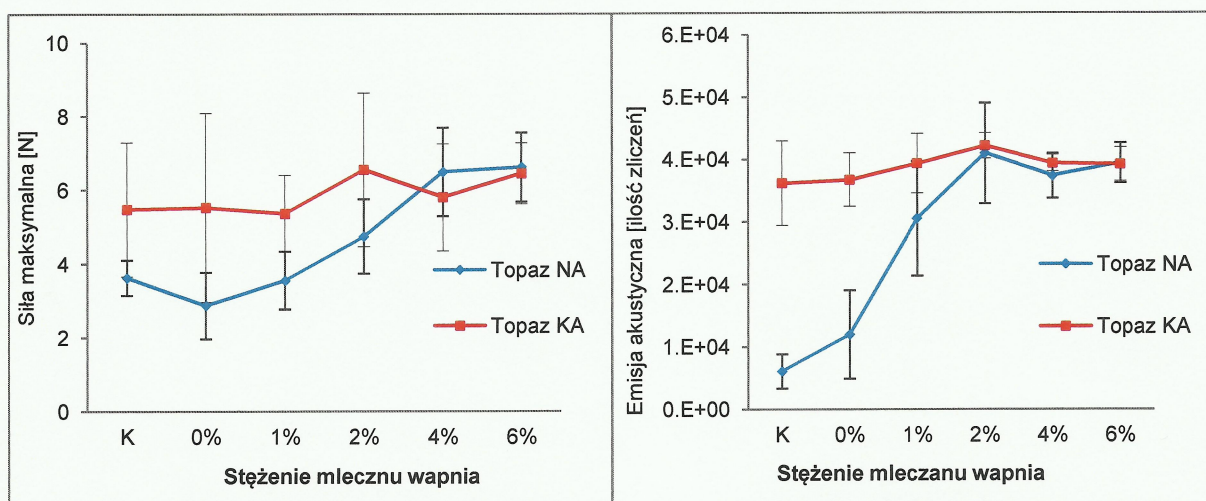
Rys. 8. Krzywe płynięcia (krzywe wstępujące) wyznaczone wg modelu Ostwalda dla frakcji pektyn WSP, CSP i DASP z marchwi w terminie zbioru (HT, zielone symbole) oraz po pięciu miesiącach pozbiorczego dojrzewania (T5, czerwone symbole). Na podstawie H6.

3. Zdolność polisacharydów ścian komórkowych do sieciowania jonami metali dwuwartościowych (H1, H8, H9)

Pektyny wykazują specyficzną reaktywność chemiczną ze względu na swoją budowę. Przy spełnieniu odpowiednich warunków mogą tworzyć kompleksy z dwuwartościowymi kationami, w naturalnym stanie z jonami wapnia. Właściwość ta ma znaczenie praktyczne, gdyż usieciowane w ten sposób pektyny tworzą żel bez konieczności dodatku cukru oraz utrzymywania niskiego pH. Mechanizm tworzenia żeli przez niskoestryfikowane pektyny przy udziale mostków wapniowych jest

oparty na modelu *egg-box* dotyczącym sieciowania polisacharydów przez dwuwartościowe kationy (Grant i inni, 1973). Formacja tzw. stref węzłowych (*junction zones*) według modelu *egg-box* odbywa się poprzez tworzenie wiązań jonowych przez jony Ca^{2+} pomiędzy przyległymi, nieestryfikowanymi resztami karboksylowymi kwasu galakturonowego cząsteczek pektyn.

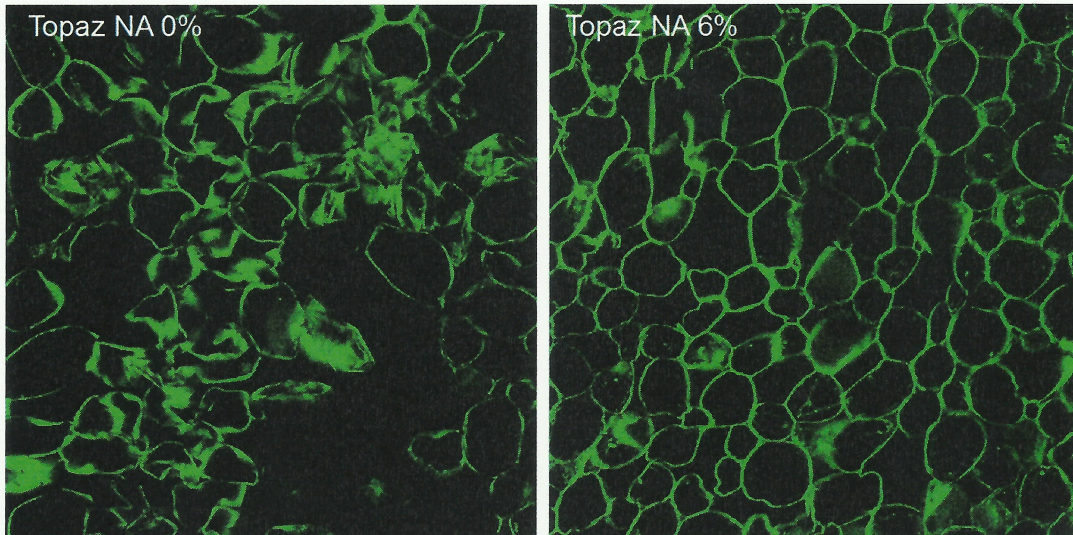
Wpływ traktowania mleczanem wapnia o różnych stężeniach (0-6%) oraz budowy komórkowej na parametry mechaniczne tkanki opisano w pracy H1. Eksperyment został przeprowadzony na pięciu odmianach jabłek przechowywanych przez dziewięć miesięcy w normalnej i kontrolowanej atmosferze. Po tym okresie z jabłek pobrano jednakowe próbki tkanki i umieszczano w roztworach mleczanu wapnia, a następnie wykonywano test mechaniczny przebicia z rejestracją emisji akustycznej. Mikrostruktura tkanki była charakteryzowana ilościowo jako wynik analizy obrazów rejestrowanych za pomocą konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego (CLSM – *confocal laser scanning microscope*). Do charakterystyki mikrostruktury użyto takich parametrów jak średnia powierzchnia oraz obwód obiektów, będących komórkami bądź przestrzeniami międzykomórkowymi, oraz oszacowana zawartość ścian komórkowych. Traktowanie roztworami wapnia o wzrastającym stężeniu próbek parenchymy jabłek powodowało istotny wzrost jędrności oraz ilości zdarzeń emisji akustycznej. Zmiany były wyraźniejsze w przypadku emisji akustycznej, która lepiej oddawała wzrost kruchości tkanki jabłek niż mechaniczny test jędrności. Ten efekt był szczególnie korzystny w przypadku bardzo miękkich jabłek z powodu ich mniejszego stopnia deestryfikacji (Rys. 9). Wapń istotnie zmienił sposób uszkodzania tkanek, z międzykomórkowego odklejania na pęknięcie ścian komórkowych. Jędrność i ogólna liczba zliczeń emisji akustycznej były ujemnie powiązane z rozmiarami obiektów i dodatnio z oszacowaną zawartością ścian komórkowych. Przybliżona ilość rozerwanych komórek korespondowała z całkowitą ilością zliczeń emisji akustycznej, co pokazało, że ta metoda może być z powodzeniem stosowana do charakterystyki parametrów związanych z procesem pęknięcia, takich jak chrupkość, twardość czy soczystość.



Rys. 9. Zmiana jędrności (a) oraz ilości zliczeń emisji akustycznej (b) dla próbek jabłek odmiany Topaz przechowywanych w atmosferze normalnej (NA) lub kontrolowanej (KA) pod wpływem traktowania roztworami mleczanu wapnia. Na podstawie H9.

Wykazano związek pomiędzy strukturą komórkową parenchymy a jej właściwościami mechanicznymi. Tkanki posiadające większe komórki (tkanki z mniejszym udziałem ścian

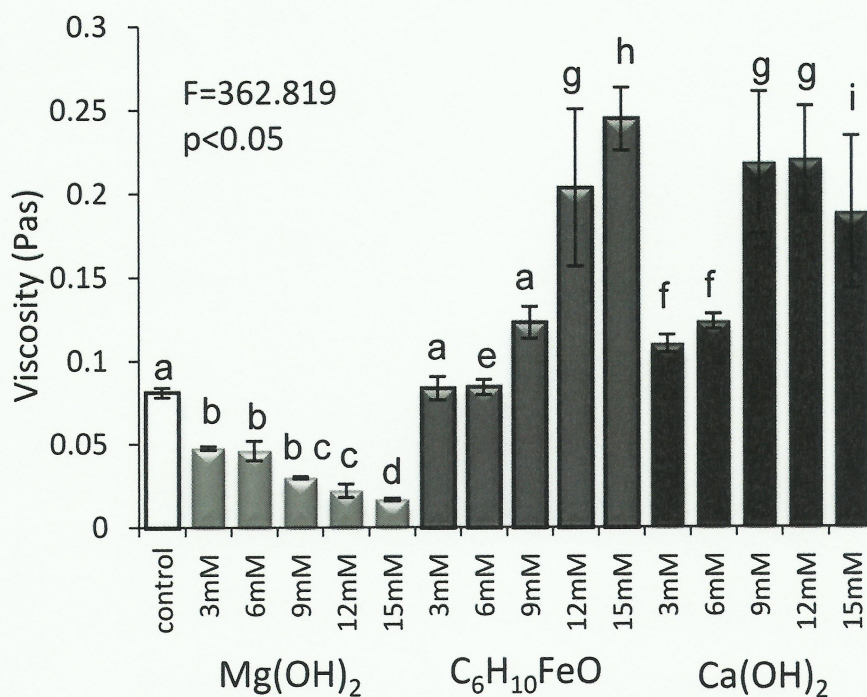
komórkowych) charakteryzowała mniejsza ilość rejestrowanych zliczeń emisji akustycznej podczas testu przebicia oraz niższa jędrność. Zagęszczenie mikrostruktury powodowało wzrost zliczeń emisji akustycznej i wzrost jędrności. Rys. 10 pokazuje zmiany mikrostruktury pod wpływem Ca^{2+} odmiany Topaz przechowywanej w normalnej atmosferze przez dziewięć miesięcy.



Rys. 10. Mikrostruktura parenchymy jabłek odmiany Topaz przechowywanych przez dziewięć miesięcy w normalnej atmosferze (NA), próbka kontrolna (0%) oraz próbka traktowana 6% roztworem mleczanu wapnia. Wyniki niepublikowane, towarzyszące pracy H9.

W pracach H8 i H9 przedstawiano wpływ jonów dwuwartościowych na matryce polisacharydowe MPS i MPSN otrzymane ze ścian komórkowych. Matryce polisacharydowe powstały z wytlóków jabłkowych przetworzonych poprzez zastosowanie takich procesów jak suszenie fluidalne w niskich temperaturach, odcukwienie i suszenie rozpyłowe. Matryca MPSN zawierała też, w odróżnieniu od matrycy MPS, komponent składający się z pektyn o obniżonym stopniu estryfikacji poprzez traktowanie węglanem potasu. Matryce to opracowałam w ramach projektu, którym kierowałam i są przedmiotem zgłoszeń patentowych ZP.2 i ZP.3. Celem opracowania tych matryc było zagospodarowanie odpadowych materiałów przemysłu rolno-spożywczego i przekształcenie ich w dodatek do żywności o właściwościach stabilizujących teksturę produktów spożywczych. Jony metali dwuwartościowych wprowadzano do matryc poprzez zawieszanie ich w roztworach wodorotlenku wapnia, wodorotlenku magnezu i mleczanu żelaza (II) o stężeniach 3, 6, 9, 12 i 15 mM. Badania wykonywano na 5% roztworach matryc polisacharydowych. Dodatek każdego czynnika sieciującego powodował wzrost lepkości pozornej roztworów matryc MPS i MPSN. Dla matrycy MPSN największy wzrost lepkości był wywołany dodatkiem jonów wapnia. Było to związane z obecnością niskometylowanych pektyn w matrycy, których stopień metylacji wynosił 37,9%. Zaobserwowano także efekt sieciowania matryc polisacharydowych wywołany jonami żelaza II, dotychczas nie przedstawiany w dostępnej literaturze. Lepkość pozorna 5% zawiesiny MPSN w wodzie wynosiła 0,076 Pa·s, a w 15mM roztworze mleczanu żelaza – 0,121 Pa·s, co świadczyło o sieciowaniu polisacharydów matrycy również przez jony Fe^{2+} . Wpływ wodorotlenku magnezu na lepkość pozorną zawiesiny MPSN był mniejszy, ale również statystycznie istotny. Analiza krzywych płynięcia pokazała, że formują one pętlę histerezy, charakterystyczną dla płynów tiksotropowych.

W przypadku matrycy MPS podobnie zauważono wzrost lepkości pozornej oraz modułów zachowawczego (G') i stratności (G'') pod wpływem jonów wapnia i żelaza, natomiast w przypadku jonów magnezu nastąpiło rozrzedzenie próbki. Moduł zachowawczy określany dla próbek zawierających jony wapnia i żelaza (II) był większy niż moduł stratności, co oznaczało, że otrzymane mieszaniny mają charakter żeli. Dopasowanie modelu Herschela-Bulkleya do krzywych płynięcia pokazało, że jony wapnia i żelaza powodowały wzrost pseudoplastyczności i lepkości w sposób proporcjonalny do ich stężenia (Rys. 11). Każdy jon dwuwartościowy powodował wzrost efektu tiksotropowego. Temperatura punktu żelowania wzrastała ze wzrostem stężenia kationów do 9 mM, a następnie następował jej spadek. Opierając się na podobnych efektach reologicznych w przypadku dodatku jonów wapnia i żelaza wysunięto wniosek, że jony żelaza (II) mogą sieciować pektyny w podobny sposób do jonów wapnia, czyli zgodnie z modelem *egg-box*. Wykonane badania pokazały, że opracowana matryca polisacharydowa może być efektywnym modyfikatorem tekstury różnorodnych produktów dzięki możliwości kontroli lepkości przez dodatek jonów wapnia, żelaza czy nawet magnezu. Ze względu na wymianę jonową zachodzącą w układzie żołądkowo-jelitowym matryca może być także wykorzystana jako potencjalny system dostarczania tych deficytowych substancji dla organizmu człowieka.



Rys. 11. Lepkość 5% roztworu matrycy polisacharydowej MPS w roztworach Ca(OH)₂, C₆H₁₀FeO₆, Mg(OH)₂. Średnie wartości przedstawiono z odchyleniami standardowymi. Symbole literowa oznaczają różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$).

Opublikowano w H9. Mierczyńska J., Cybulska J., Sołowiej B., Zdunek A. 2015. Effect of Ca²⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺ on rheological properties of new food matrix made of modified cell wall polysaccharides from apple. Carbohydrate Polymers 133, 547-555.

Podsumowanie

Analiza nanostruktury polisacharydów ścian komórkowych i powiązanie jej z teksturalnymi, mechanicznymi i reologicznymi właściwościami materiałowymi stanowi główny nurt badań przedstawionych jako *Osiągnięcie* w pracach H1-H10. Prezentowane podejście łączy w sobie badania o charakterze podstawowym, do których należy charakterystyka nanostruktury polisacharydów oraz rozważania teoretyczne na temat właściwości mechanicznych pojedynczych molekuł, z badaniami, które można zakwalifikować do aplikacyjnych, obejmujących właściwości reologiczne i mechaniczne. Badania te zostały wykonane na rzeczywistym materiale roślinnym, samodzielnie izolowanym (poza ksyloglukanem, praca H7) z parenchymy owoców i warzyw. Niewiele grup na świecie podejmuje taką szeroką tematykę, która w prezentowanym podejściu wypełnia lukę istniejącą w dziedzinie badań rolniczych pomiędzy molekularną charakterystyką biopolimerów a ich właściwościami w skali makro, oznaczanymi na tych samych obiektach. Do najbardziej istotnych uzyskanych przeze mnie wyników należy:

- charakterystyka nanostruktury polisacharydów ścian komórkowych: pektyn trzech frakcji, ksyloglukanu i celulozy na podstawie obrazowania AFM,
- wykazanie zróżnicowania właściwości reologicznych frakcji pektyn i powiązania go z ich budową molekularną,
- opis zmian konformacyjnych homogalakturonianów pod wpływem sił zewnętrznych działających na pojedyncze molekuly na podstawie symulacji kwantowochemicznych,
- opis nanostruktury i właściwości samoorganizującej się frakcji pektyn ekstrahowanych węglanem sodu,
- wykazanie, że sieciowanie pektyn, poza tworzeniem kompleksów z jonami Ca^{2+} , następuje także poprzez jony Fe^{2+} ,
- wykazanie, że przemiany fizjologiczne podczas pozbiornego dojrzewania wybranych roślin powodują zmiany nanostruktury związków pektynowych.

Literatura

1. Agoda-Tandjawa G., Durand S., Berot S., Blassel C., Gaillard C., Garnier C., Doublier J.-L. 2010. Rheological characterization of microfibrillated cellulose suspensions after freezing. *Carbohydrate Polymers* 80, 677–686.
2. Aguilera, J. M. 2005. Why food microstructure? *Journal of Food Engineering* 67, 3–11.
3. Alonso-Mongán M., Meijide F., Jover A., Rodríguez-Núñez E., Vázquez-Tato J. 2002. Rheological behavior of an amide pectin. *Journal of Food Engineering* 55, 123–129.
4. Arancibia R.A., Motsenbocker C.E. 2006. Pectin methylesterase activity in vivo differs from activity in vitro and enhances polygalacturonase-mediated pectin degradation in tabasco pepper. *Journal of Plant Physiology* 163, 488–496.
5. Bach Knudsen K.E. 2001. The nutritional significance of “dietary fibre” analysis. *Animal Feed Science and Technology* 90, 3–20.
6. Brownlee J.A. 2011. The physiological roles of dietary fibre. *Food Hydrocolloids* 25, 238–250.
7. Brummell D.A., Harpster, M.H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47, 311–340.
8. Brummell D.A., Dal Cin V., Crisosto C.H., Labavitch J.M. 2004. Cell wall metabolism during maturation ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany* 55, 2029–2039.
9. Burton R.A., Gidley M.J., Fincher G.B. 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology* 6, 724–732.
10. Caffall K.H., Mohnen D. 2009. The structure, function and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 344, 1879–1900.

11. Carpita N., McCann M. 2000. The cell wall. In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, 52–108.
12. Chen F., Zhang L., An H., Yang H., Sun X., Liu H., Yao Y., Li L. 2009. The nanostructure of hemicellulose of crisp and soft Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* L.) cultivars at different stages of ripeness. *LWT - Food Science and Technology* 42, 125–130.
13. Chen F., Liu H., Yang H., Lai S., Cheng X., Xin Y., Yang B., Hou H., Yao Y., Zhang S., Bu G., Deng Y. 2011. Quality attributes and cell wall properties of strawberries (*Fragaria annanassa* Duch.) under calcium chloride treatment. *Food Chemistry*, 126, 450–459.
14. Coenen G.J., Bakx E.J., Verhoef R.P., Schols H.A., Voragen A. 2007. Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydrate Polymers* 70, 224–235.
15. Coimbra M.A., Barros A., Barros M., Rutledge D.N., Delgadillo I. 1998. Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* 37, 241–248.
16. Colin-Henrion M., Mehinagic E., Renard C.M.G.C., Richomme P., Jourjon F. 2009. From apple to applesauce: Processing effects on dietary fibres and cellwall polysaccharides. *Food Chemistry* 117, 254–260.
17. Comino P., Collins H., Lahnstein J., Beahan C., Gidley M.J. 2014. Characterisation of soluble and insoluble cell wall fractions from rye, wheat and hull-less barley endosperm flours. *Food Hydrocolloids* 41, 219–226.
18. Cosgrove D.J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 850–861.
19. Davies L.M., Harris P. J. 2003. Atomic force microscopy of microfibrils in primary cell walls. *Planta* 217, 283–289.
20. De Belie N., Hallett I.C., Harker F.R., De Baerdemaeker J. 2000. Influence of ripening and turgor on the tensile properties of pears: A microscopic study of cellular and tissue changes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125, 350–356.
21. Ding S.-Y., Himmel, M E. 2006. The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 597–606.
22. Eichhorn S.J., Dufresne A., Aranguren M., Marcovich N.E., Capadona J.R., Rowan S.J., Weder C., Thielemans W., Roman M., Renneckar S., Gindl W., Veigel S., Keckes J., Yano H., Abe K., Nogi M., Nakagaito A.N., Mangalam A., Simonsen J., Benight A.S., Bismarck A., Berglund L.A., Peijs, T. 2010. Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. *Journal of Materials Science* 45, 1–33.
23. Espinosa-Muñoz L., Renard C.M.G.C., Symoneaux R., Biau N., Cuvelier G. 2013. Structural parameters that determine the rheological properties of apple puree. *Journal of Food Engineering* 119, 619–626.
24. Fanta S.W., Abera M.K., Aregawi W.A., Ho Q.T., Verboven P., Carmeliet J., Nicolai B.M. 2014. Microscale modeling of coupled water transport and mechanical deformation of fruit tissue during dehydration. *Journal of Food Engineering* 124, 86–96.
25. Fischer T.E., Marszałek P.E., Fernandez J.M. 2000. Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope. *Nature Structural Biology* 7(9): 719–724.
26. Fishman M.L., Cooke P.H., Coffin D.R. 2006. Nanostructure of native pectin sugar acid gels visualized by atomic force microscopy. *Biomacromolecules* 5, 334–341.
27. Geitmann A. 2010. Mechanical modeling and structural analysis of the primary plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 693–699.
28. Gibson L.J. 2012. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of the Royal Society Interface* 9, 2749–2766.
29. Grant G.T., Morris E.R., Rees D.A., Smith P.J.C., Thom D. 1973. Biological interaction between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters* 32, 195–198.
30. Goulao L.F., Oliveira C.M. 2008. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology* 19, 4–25.
31. Goulao L.F., Santos J., De Sousa I., Oliveira C.M. 2007. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Postharvest Biology and Technology* 43 (3), 307–318.
32. Harker F.R., Stec M.G.H., Hallett I.C., Bennett C.L. 1997. Texture of parenchymatous plant tissue: A comparison between tensile and other instrumental and sensory measurements of tissue strength and juiciness. *Postharvest Biology and Technology* 11, 63–72.
33. Iwamoto S., Kai W., Isogai A., Iwata T. 2009. Elastic modulus of single cellulose microfibrils from tunicate measured by atomic force microscopy. *Biomacromolecules* 10(9), 2571–2576.
34. Jarvis M.C. 2011. Plant cell walls: supramolecular assemblies. *Food Hydrocolloids* 25, 257–262.
35. Jarvis M.C., Briggs S.P.H., Knox J.P. 2003. Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell and Environment* 26, 977–989.
36. Jayani R.S., Saxena S., Gupta R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry* 40, 2931–2944.

37. Juszczak L., Witczak M., Zięba T., Fortuna T. 2012. Rheological behavior of heated potato starch dispersions. *International Agrophysics* 26, 381–386.
38. Kacuráková M., Capek P., Sasinková V., Wellner N., Ebringerová A. 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers* 43, 195–203.
39. Kahlon T.S., Smith G.E. 2007. In vitro binding of bile acids by bananas, peaches, pineapple, grapes, pears, apricots and nectarines. *Food Chemistry* 101, 1046–1051.
40. Kendall C.W.C., Esfahani A., Jenkins D.J.A. 2010. The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocolloids* 24, 42–48.
41. Kirby A.R., Gunning A.P., Waldron K.W., Morris V.J., Ng A. 1996. Visualization of plant cell walls by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* 70, 1138–1143.
42. Kirby A.R., Gunning A.P., Morris V.J., Ridout M.J. 1995. Observation of the Helical Structure of the Bacterial Polysaccharide Acetan by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* 68, 360–363.
43. Kirby A.R., Gunning A.P., Morris V.J. 1995. Imaging Xanthan gum by Atomic Force Microscopy. *Carbohydrate Research* 267, 161–166.
44. Kirby A.R., MacDougall A.J., Morris, V.J. 2008. Atomic force microscopy of tomato and sugar beet pectin molecules. *Carbohydrate Polymers*, 71, 640–647.
45. Kurland N.E., Drira Z., Yadavall N.K. 2012. Measurement of nanomechanical properties of biomolecules using atomic force microscopy. *Micron* 43, 116–128
46. Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhik S.A., Zhdanov R.I. 2007. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron* 38, 824–833.
47. Lekka M. 2012. Atomic force microscopy: a tip for diagnosing cancer. *Nature Nanotechnology* 7, 691–692.
48. Lekka M., Laidler P. 2009. Applicability of AFM in cancer detection. *Nature Nanotechnology* 4, 72–73.
49. Levy S., York W.S., Stuike-Prill R., Meyer B., Staehelin L.A. 1999. Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan. The role of the fucosylated sidechain in surface specific sidechain folding. *Plant Journal* 1, 195–215.
50. Lima D.U., Loh W., Buckeridge M.S. 2004. Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 389–394.
51. Liu H., Chen F., Yang H., Yao Y., Gong X., Xin Y., Ding C. 2009. Effect of calcium treatment on nanostructure of chelate-soluble pectin and physicochemical and textural properties of apricot fruits. *Food Research International* 42, 1131–1140.
52. Liu H., Fu S., Zhu J.Y., Li H., Zhan H. 2009. Visualization of enzymatic hydrolysis of cellulose using AFM phase imaging. *Enzyme and Microbial Technology* 45, 274–281.
53. Ma J., Lin Y., Chen X., Zhao B., Zhang J. 2014. Flow behavior, thixotropy and dynamical viscoelasticity of sodiumalginate aqueous solutions. *Food Hydrocolloids* 38, 119–128.
54. Malecki I., Opilski A. 1994. Characteristics and classification of acoustic emission signals. In I. Malecki, & J. Ranachowski (Eds.), *Acoustic emission: Sources, methods and applications* (pp. 18–33). Warszawa: Wyd. Biuro PASCAL.
55. Marga F., Grandbois M., Cosgrove D.J., Baskin T.I. 2005. Cell wall extension results in the coordinate separation of parallel microfibrils: Evidence from scanning electron microscopy and atomic force microscopy. *Plant Journal* 43, 181–190.
56. Marszałek P.E., Oberhauser A.F., Pang Y.P., Fernandez J.M. 1998. Polysaccharide elasticity governed by chair-boat transitions of the glucopyranose ring. *Nature* 396, 661–664.
57. Massiot P., Rouau X., Thibault J.-F. 1987. Characterization of cell-wall polysaccharides of carrot. *Food Hydrocolloids* 1 (5–6), 541–544.
58. Mohnen D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 266–277.
59. McCann M.C., Bush M., Milioni D., Sado P., Stacey N.J., Catchpole G., Defernez M., Carpita N.C., Hofte H., Ulvskov P., Wilson R.H., Roberts K., 2001. Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall. *Phytochemistry* 57, 811–821.
60. McCann M.C., Wells B., Roberts K. 1990. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *Journal of Cell Science* 96, 323–334.
61. McCann T.H., Fabre F., Day L. 2011. Microstructure, rheology and storage stability of low-fat yoghurt structured by carrot cell wall particles. *Food Research International* 44, 884–892.
62. Mesbahi G., Jamaljan J., Farahnaky A. 2005. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. *Food Hydrocolloids* 19, 731–738.
63. Mohnen D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 266–277.
64. Morris V.J., Gromer A., Kirby A.R., Bongaerts R.J.M., Gunning A.P. 2011. Using AFM and force spectroscopy to determine pectin structure and (bio) functionality. *Food Hydrocolloids* 25, 230–237.

65. Morris V.J., Guning A.P., Kirby A.R., Round A., Waldron K., Ng A. 1997. Atomic force microscopy of plant cell walls, plant cell wall polysaccharides and gels. *International Journal of Biological Macromolecules* 21, 61–66.
66. Pagán J., Ibarz A. 1999. Extraction and rheological properties of pectin from peach pomace. *Journal of Food Engineering* 39, 193–201.
67. Pose S., Kirby A.R., Mercado J.A., Morris V.J., Quesada M.A. 2012. Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. *Carbohydrate Polymers* 88, 882–890.
68. Redgwell R.J., Curti D., Gehin-Delval C. 2008. Role of pectic polysaccharides in structural integrity of apple cell wall material. *European Food Research and Technology* 227, 1025–1033.
69. Redgwell R.J., Melton L.D., Brasch D.J. 1992. Cell wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidiadelicosa*): solubilization of the pectic polymers. *Plant Physiology* 98, 71–81.
70. Redgwell R.J., Hansen C.E. 2000. Isolation and characterisation of cell wall polysaccharides from cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *Planta* 210 (5), 823–30.
71. Ridley B.L., O'Neill M.A., Mohnen D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929–967.
72. Round A.N., Rigby N.M., MacDougall A.J., Ring S.G., Morris V.J. 2001. Investigating the nature of branching in pectin by atomic force microscopy and carbohydrate analysis. *Carbohydrate Research* 331, 337–342.
73. Round A.N., Rigby N.M., MacDougall A.J., Morris V.J. 2010. A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydrate Research* 345, 487–497.
74. Round A.N., MacDougall A.J., Ring S.G., Morris V.J. 1997. Unexpected Branching in Pectin Observed by Atomic Force Microscopy. *Carbohydrate Research* 303, 251–253.
75. Scheller H.V., Ulvskov P. 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61, 263–289.
76. Schols H.A., Voragen A.G.J. 1994. Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by RGase. *Carbohydrate Research* 256, 83–95
77. Schmelter T., Wientjes R., Vreeker R., Klaffke W. 2002. Enzymatic modifications of pectins and the impact on their rheological properties. *Carbohydrate Polymers* 47, 99–108.
78. Selvendran R.R., O'Neill M.A. 1987. Isolation and analysis of cell walls from plant material. *Methods of Biochemical Analysis* 32, 25–153.
79. Sila D.N., Duvetter T., De Roeck A., Verlent I., Smout C., Moates G.K., Hills B.P., Waldron K.K., Hendrickx M., Van Loey A. 2008. Texture changes of processed fruits and vegetables: potential use of high-pressure processing. *Trends in Food Science and Technology* 19, 309–319.
80. Sneddon I.N. 1965. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Sciences* 3, 47–57.
81. Söderqvist L.M., Albertsson A.C., Ranucci E., Laus M., Giani E. 2005. Biodegradable polymers from renewable sources: rheological characterization of hemicellulose-based hydrogels. *Biomacromolecules* 6(2), 684–90.
82. Pauly M., Albersheim P., Darvill A., York W.S. 1999. Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *Plant Journal* 20, 629–639.
83. Pose S., Kirby A.R., Mercado J.A., Morris V.J., & Quesada, M.A. (2012). Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. *Carbohydrate Polymers*, 88, 882–890.
84. Radmacher M., Cleveland J.P., Fritz M., Hansma H.G., Hansma P.K. 1994. Mapping interaction forces with the atomic force microscope. *Biophysical Journal* 66, 2159–2165.
85. Radmacher M., Fritz M., Hansma P.K. 1995. Imaging soft samples with the atomic force microscope: gelatin in water and propanol. *Biophysical Journal* 69, 264–270.
86. Ridley B.L., O'Neill M.A., Mohnen D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929–967.
87. Redgwell R.J., Hansen C.E. 2000. Isolation and characterisation of cell wall polysaccharides from cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *Planta* 5, 210, 823 – 830.
88. Redgwell R.J., Melton L.D., Brasch D.J. 1992. Cell wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidiadelicosa*): solubilization of the pectic polymers. *Plant Physiology* 98, 71–81.
89. Round A.N., Rigby N.M., MacDougall A.J., Morris V. J. 2010. A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydrate Research* 345, 487–497.
90. Round A.N., Rigby N.M., MacDougall A.J., Ring S.G., Morris V.J. 2001. Investigating the nature of branching in pectin by atomic force microscopy and carbohydrate analysis. *Carbohydrate Research* 331, 337–342.
91. Tabilo-Munizaga G., Barbosa-Cánovas G.V. 2005 Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering* 67, 147–156.
92. Thimm J.C., Burritt D.J., Ducker W.A., Melton L.D. 2000. Celery (*Opium graveolens* L.) parenchyma cell walls by atomic force microscopy: Effect of dehydration on cellulose microfibrils. *Planta* 212, 25–32.

93. Toivonen P.M.A., Brummell D.A. 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 48, 1–14.
94. Umemura M., Yuguchi Y. 2005. Conformational folding of xyloglucan side chains in aqueous solution from molecular dynamics simulation. *Carbohydrate Research* 340, 2520–2532.
95. Waldron K.W., Smith A.C., Parr A.J., Ng A., Parker M.L. 1997. New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends in Food Science and Technology* 8, 213–221.
96. Woliński K., Baker J. 2009. Theoretical predictions of enforced structural changes in molecules. *Molecular Physics* 107(22), 2403–2417.
97. Wei J., Ma F., Shi S., Qi X., Zhu X., Yuan J. 2010. Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 56, 147–154.
98. Willats W.G.T., Knox J.P., Mikkelsen J.D. 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* 17, 97–104.
99. Xin Y., Chen F., Yang H., Zhang P., Deng Y., Yang B. 2010. Morphology, profile and role of chelate-soluble pectin on tomato properties during ripening. *Food Chemistry* 121, 372–380.
100. Yang H., Chen F., An H., Lai S. 2009. Comparative studies on nanostructures of three kinds of pectins in two peach cultivars using atomic force microscopy. *Postharvest Biology and Technology* 51, 391–398.
101. Yang H., Feng G., An H., Li Y. 2006. Microstructure changes of sodium carbonate-soluble pectin of peach by AFM during controlled atmosphere storage. *Food Chemistry* 94, 179–192.
102. Yang H., An H., Feng G., Li Y., Lai S. 2005. Atomic force microscopy of the water-soluble pectin of peaches during storage. *European Food Research and Technology* 220, 587–591.
103. Zdunek A. 2008. Instrumentalna metoda oceny wybranych cech tekstury jabłek na podstawie emisji akustycznej. *Acta Agrophysica*, 155.
104. Zhang L., Chen F., Yang H., Sun X., Liu H., Gong X., Jiang C., Ding C. 2010. Changes in firmness, pectin content and nanostructure of two crisp peach cultivars after storage. *LWT - Food Science and Technology* 43, 26–32.
105. Zhang L., Chen F., Yang H., Ye X., Sun X., Liu D., Yang B., An H., Deng Y. 2012. Effects of temperature and cultivar on nanostructural changes of water-soluble pectin and chelate-soluble pectin in peaches. *Carbohydrate Polymers* 87, 816–821.
106. Zhu F., Du B., Zheng L., Li J. 2015. Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. *Food Chemistry* 207–212., 186, 207–212.
107. Zykwińska A., Thibault J.-F., Ralet M.-C. 2008. Competitive binding of pectin and xyloglucan with primary cell wall cellulose. *Carbohydrate Polymers* 74, 957–961.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Pracę naukową rozpoczęłam w 2004 r. kiedy to wstąpiłam na Studia Doktoranckie w Instytucie Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN w Lublinie. Zostałam włączona w prace badawcze zespołu kierowanego przez prof. dr hab. Krystynę Konstankiewicz. Początkowo zajmowałam się badaniami mikrostruktury tkanek roślinnych z wykorzystaniem metod mikroskopowych, m. in. konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej (CLSM). Jako pracownik IA PAN kontynuowałam również współpracę z macierzystą uczelnią, SGGW, w wyniku której opublikowałam dwie prace dotyczące problematyki opakowań żywności (I.D.1 i I.D.2). Początkowo pracowałam w IA PAN na stanowisku technologa będąc zatrudniona w projekcie Centrum Doskonałości Fizyki Stosowanej w Zrównoważonym Rolnictwie „AGROPHYSICS” w ramach 5 Programu Ramowego UE. Podczas studiów Doktoranckich byłam stypendystką EFS w ramach projektu „Stypendia dla młodych naukowców szansą agrorozwoju Lubelszczyzny”. Od początku pracy naukowej współpracowałam z dr hab. Arturem Zdunkiem, prof. IA PAN, realizując badania w ramach działalności statutowej pt. *Zmiany mikrostruktury materiałów rolniczych podczas deformacji*. W ramach tego tematu opublikowane zostały prace na temat wpływu turgoru na emisję akustyczną tkanek roślinnych (11), automatycznej

analizy obrazów mikroskopowych (I.D.5), wpływu deformacji na strukturę komórkową tkanek jabłka (I.D.7), wpływu turgoru i temperatury na właściwości mechaniczne tkanek ziemniaka (I.D.8) oraz metod badań właściwości teksturalnych owoców i warzyw (I.D.6). Byłam współautorem i wykonawcą w dwóch projektach międzynarodowych dotyczących współpracy przygranicznej pomiędzy Polską, Ukrainą i Białorusią w ramach programu Programu Sąsiedztwa Polska-Białoruś-Ukraina Interreg IIIA/TACIS CBC 2004-2006, w których nawiązaliśmy współpracę i przeprowadziliśmy badania naukowe z naukowcami z tych krajów. Jako asystent w projekcie „*Interregionalne Centrum Badawczo-Edukacyjne w Instytucie Agrofizyki PAN w Lublinie*” zajmowałam się m.in. organizacją staży długoterminowych dla stypendystów zagranicznych i konferencji, a także realizacją badań naukowych dotyczących mikrostruktury tkanek roślinnych, czego wynikiem jest publikacja I.D.7. W projekcie „*Szkolenia i adaptacja laboratoriów w Instytucie Agrofizyki dla podniesienia jakości żywności na terenach przygranicznych PL-BY-UA*” pełniłam funkcję auditora wewnętrznego, a do moich obowiązków należał m.in. nadzór nad modernizacją Laboratorium Mikroskopii i Laboratorium Analizy Sensorycznej i Właściwości Mechanicznych. Poza tymi projektami uczestniczyłam jako wykonawca w projekcie naukowym NCBR pt. „*Prototyp urządzenia opartego na metodzie emisji akustycznej do oceny kruchości i tekstury jabłek*”, gdzie zajmowałam się analizą biochemiczną i sensoryczną jabłek o różnych właściwościach teksturalnych.

W latach 2005 i 2006 zdobyłam kwalifikacje auditora wewnętrznego i eksperta technicznego oceniającego laboratorium zgodnie z normą PN EN ISO/IEC 17025, nadane na podstawie zdanego egzaminu przez Polskie Centrum Badań i Akredytacji w Warszawie. Te kompetencje dały mi podstawy do organizacji Laboratorium Biochemicznego, którego jestem obecnie opiekunem.

Okres studiów doktoranckich był dla mnie czasem zdobywania doświadczenia w pracy naukowej w laboratoriach zagranicznych. Pierwszy staż zagraniczny odbyłam w 2003 r. będąc studentką SGGW, kiedy spędziłam trzy miesiące w przedsiębiorstwach przemysłu spożywczego w Niemczech poznając zasady pracy w zawodzie technologa żywności. W 2006 r. odbyłam półroczny staż na Katolickim Uniwersytecie Leuven w Belgii, gdzie pod kierownictwem prof. Barta Nicolai i dr Els Vanstreels rozpoczęłam badania nad modelowymi ścianami komórkowymi opartymi na celulozie bakteryjnej w projekcie pt. „*Physics of fruit and vegetable tissue in postharvest handling*”. Staż w KU Leuven odbyłam jako stypendysta programu Marie Curie Fellowship w ramach 6 Programu Ramowego UE. Opracowałam wówczas metodę otrzymywania modelowych ścian komórkowych na bazie celulozy bakteryjnej wzbogacanej o inne polisacharydowe komponenty ścian: pektyny i hemicelulozę. Wykorzystując mikrotester do badania właściwości mechanicznych wykonałam serię pomiarów wytrzymałości modelowych materiałów w różnych warunkach wilgotności. Wykonałam także charakterystykę chemiczną tych materiałów metodą chromatografii gazowej oraz analizę przepuszczalności gazów za pomocą autorskiej aparatury wytworzonej w KU Leuven. Ta tematyka stała się przedmiotem mojej pracy doktorskiej i rozpoczęła nowy zakres badań w Zakładzie Mechaniki Materiałów Rolniczych (obecnie Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów). Opublikowałam wówczas prace pokazujące znaczenie ścian komórkowych dla tekstury i jakości żywności roślinnej (I.D.3 i I.D.4). W roku 2006 r. rozpoczęłam badania we współpracy z Laboratorium Analitycznym UMCS w Lublinie nad zastosowaniem mikroskopu sił atomowych do analizy nanostruktury modelowych ścian komórkowych. Opracowałam również protokoły automatycznej analizy obrazów

AFM przy wykorzystaniu oprogramowania do analizy obrazów topograficznych. Dnia 10.11.2006 r. nastąpiło otwarcie przewodu doktorskiego przez Radę Naukową IA PAN. W dniu 01.07.2007 r. otrzymałam stanowisko asystenta w Instytucie Agrofizyki. W celu rozwinięcia badań nad ścianami komórkowymi w 2007 r. odbyłam trzymiesięczny staż naukowy w INRA Nantes we Francji w ramach projektu pt. "*Cellular structure, mechanical properties and acoustic emission of plant tissues*", gdzie we współpracy z dr. Marcem Lahaye i dr. Marie-Francoise Devaux prowadziłam analizy biochemiczne naturalnych ścian komórkowych izolowanych z tkanki miękkowej jabłka wykorzystując metody chromatograficzne i enzymatyczne. Odbycie tego stażu było możliwe dzięki uzyskaniu na drodze konkursowej stypendium rządu francuskiego. Staż został przedłużony dzięki przyznaniu mi dodatkowego stypendium INRA. Badania te kontynuowałam po powrocie do IA PAN, będąc wykonawcą projektu promotorskiego pt. *Wybrane fizyczne i chemiczne właściwości modelowych roślinnych ścian komórkowych*.

Przed obroną pracy doktorskiej opublikowałam łącznie 9 recenzowanych prac, z czego jedną w czasopiśmie indeksowanym na liście JCR. Sumaryczny *Impact Factor* prac opublikowanych przed doktoratem wynosi 1,308, a sumaryczna liczba punktów MNiSW - 51.

Podczas studiów doktoranckich brałam udział w wielu konferencjach krajowych i międzynarodowych, wygłosiłam na nich 9 referatów. Ponadto przygotowałam w tym okresie 10 seminariów dla pracowników naukowych, przedstawionych w jednostkach krajowych i zagranicznych. Brałam wówczas aktywny udział w organizacji 5 międzynarodowych konferencji naukowych dla młodych naukowców.

Rezultaty moich badań nad modelowymi ścianami komórkowymi przedstawiłam w pracy doktorskiej pt. „*Wybrane fizyczne i chemiczne właściwości modelowych roślinnych ścian komórkowych*”. Do największych osiągnięć mojej pracy doktorskiej należy wykazanie, że skład chemiczny modelowych ścian komórkowych ma istotny wpływ na właściwości mechaniczne oraz parametry topograficzne. Promotorem pracy była prof. dr. hab. Krystyna Konstankiewicz, a jej recenzentami dr hab. Małgorzata Brzezińska, prof. IA PAN oraz prof. dr hab. Piotr P. Lewicki. Na podstawie publicznej obrony pracy doktorskiej, która odbyła się dn. 17.12.2008 r. Rada Naukowa Instytutu Agrofizyki PAN nadała mi tytuł doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii/agrofizyki dn. 30.01.2009 r. Decyzją Rady Naukowej praca doktorska otrzymała wyróżnienie.

Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

W roku 2009 rozpoczęłam pracę jako zastępca kierownika projektu ds. organizacyjno-naukowych w projekcie strukturalnym pt. *Rozbudowa i doposażenie laboratoriów Centrum Doskonałości AGROPHYSICS*, w którym zajmowałam się organizacją zakupów nowoczesnej aparatury naukowo-badawczej dla IA PAN. W tym projekcie zakupiono m.in. mikroskop sił atomowych, jedno z moich głównych narzędzi pracy. Byłam także koordynatorem ds. merytorycznych w projekcie pt. *Środowiskowe Laboratorium Energii Odnawialnej*, w ramach którego powstało Laboratorium Biochemiczne, którego jestem opiekunem.

Przez początkowy okres po uzyskaniu stopnia doktora skupiłam się na publikacji wyników uzyskanych w ramach pracy doktorskiej. Wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej dotyczące modelowych ścian komórkowych opartych na celulozie bakteryjnej zostały opublikowane w czterech

publikacjach w czasopismach indeksowanych w JCR (I.A.2, I.A.3, I.A.4, I.A.7), których łączny *Impact Factor* wyniósł 6,789 (102 pkt. MNiSW). Prace te spotkały się z zainteresowaniem czytelników, dotychczas cytowano je 78 razy.

Aby pogłębić swoje umiejętności obsługi mikroskopu sił atomowych oraz analizy obrazów AFM nawiązałam kontakt z prof. Bjornem T. Stokke z The Norwegian University of Science and Technology (NTNU), którego grupa należy do najlepszych i najbardziej doświadczonych zespołów w zakresie badań AFM obiektów biomedycznych. Uzyskałam projekt finansowany przez The Research Council of Norway, w ramach którego odbyłam dwumiesięczny staż w laboratorium prof. Stokke. Podczas tego stażu wspólnie z dr Katarzyną M. Psonką-Antończyk z NTNU wykonałam badania AFM materiału ścian komórkowych oraz celulozy ekstrahowanych z jabłek sześciu odmian. Nasze wspólne badania zostały opublikowane w pracy H2.

W celu poszerzenia wiedzy chemicznej, niezbędnej do rozwoju moich badań, podjęłam studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, które ukończyłam w 2013 r. obroną pracy magisterskiej z zakresu chemii teoretycznej.

Po przerwie w pracy naukowej spowodowanej urlopem macierzyńskim, realizowałam jako kierownik dwa projekty badawcze finansowane w ramach programu Iuventus Plus: „*Spektroskopia mechaniczna AFM amorficznych i krystalicznych form celulozy w środowisku biopolimerów ścian komórkowych*” oraz „*Analiza procesu deestryfikacji związków pektynowych przy zastosowaniu obrazowania i spektroskopii sił AFM*”. Projekty te dotyczyły badań AFM polisacharydów ścian komórkowych i modelowania ich właściwości metodami chemii obliczeniowej. Badania teoretyczne realizowałam we współpracy z prof. Krzysztofem Wolińskim z UMCS oraz dr Agnieszką Brzyką z Instytutu Fizykochemii i Katalizy Powierzchni PAN. Wynikiem realizacji tych projektów były publikacje H3, H4 i H6. Do największych osiągnięć tych projektów należy powiązanie nanostruktury ścian komórkowych z właściwościami teksturalnymi jabłek, teoretyczny opis eksperymentu AFM i następujących w jego wyniku zmian konformacji jednostek wchodzących w skład homogalakturonianu, a także opis zmian nanostruktury pektyn w wyniku pozbiornego dojrzewania na podstawie obserwacji AFM. Na podstawie analizy nanostruktury związków pektynowych pokazałam, że poszczególne ich frakcje mają specyficzne właściwości w poszczególnych fazach fizjologicznego rozwoju roślin. W momencie dojrzałości zbiorczej rozmieszczona na mice dwuwymiarowa warstwa pektyn frakcji rozpuszczalnej w słabych zasadach posiada zdolności samoorganizacji w regularną, uporządkowaną sieć. Wówczas formuje przestrzenie o wymiarach około 50-70 nm pomiędzy usieciowanymi włóknami, które są wystarczające do pomieszczenia w nich włókien hemiceluloz i celulozy. Wykazana zdolność do systematycznej konfiguracji pektyn jest jednym z czynników kształtujących strukturę i mechanikę rzeczywistych ścian komórkowych (H2, H4, H6). Badania teoretyczne nad zmianami modelowych pektyn – fragmentu homogalakturonianu, pokazały, że określone siły przyłożone do łańcuchów kwasu poligalakturonowego powodują zmiany konformacyjne w poszczególnych pierścieniach tego związku. Podczas symulacji rozciągania pojedynczych biomolekuł przy użyciu AFM, wykazano, że cząsteczki kwasu poligalakturonowego przechodzą z konformacji krzesłowej 4C_1 do postaci odwróconego krzesła 1C_4 poprzez struktury skręconej tódkki (5S_1 i 2S_0). Określono wartość sił zewnętrznych, które są wymagane do wywołania takich nieodwracalnych przemian, a także do rozerwania wiązania glikozydowego. Modelowanie

kwantowochemiczne tych procesów pozwoliło na opis zjawisk obserwowanych doświadczalnie, a do tej pory nie zinterpretowanych. Ponadto, teoretycznie udowodniono zmniejszenie stopnia skręcenia helisy kwasu poligalakturonowego jako skutek przyłożenia sił zewnętrznych (H3).

W latach 2011-2014 realizowałam jako kierownik projekt finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu Lider pt. „Nowy teksturotwórczy dodatek do żywności na bazie odpadów przemysłu rolno – spożywczego”. Projekt ten zakończył się trzema zgłoszeniami patentowymi (ZP.1, ZP2, ZP.3) i kilkoma recenzowanymi publikacjami (H6, H8, H9, I.D.9, I.D.10, I.D.11). Jestem współautorem zgłoszenia patentowego na suszarkę laboratoryjną, która została skonstruowana i wykonana w ramach projektu. Suszarka łączy w sobie trzy rodzaje suszenia: suszenie w warstwie fluidalnej, suszenie rozpyłowe i suszenie fluidalne z natryskiem powierzchniowym umożliwiające enkapsulację. Dwa kolejne zgłoszenia patentowe dotyczą opracowanych technologii produkcji matrycy polisacharydowej MPS i MPSN, której nazwa i logo zostały zarejestrowane również jako znak towarowy TexAp® (ZT.1). W technologii produkcji matrycy wykorzystywane są takie procesy jak suszenie fluidalne wyłoków jabłkowych, ich odcukrzanie i mikronizacja, obniżanie stopnia metylacji komponentu pektynowego a także suszenie rozpyłowe. Pokazano, że właściwości reologiczne opracowanych matryc MPSN i MPS mogą być modyfikowane poprzez jony Fe^{2+} w sposób podobny do jonów Ca^{2+} . Stwierdzono, że dodatek teksturotwórczy powoduje znaczący wzrost lepkości m.in. soków owocowych i warzywnych, produktów mleczarskich, koncentratów spożywczych, pozytywnie wpływa na wartości odżywcze, parametry teksturalne i sensoryczne snacków ekstrudowanych, chleba oraz pieczywa cukierniczego oraz powoduje ograniczenie wycieku termicznego i obniżenie pH produktów mięsnych. Badania marketingowe wykonane w kilkudziesięciu przedsiębiorstwach spożywczych i farmaceutycznych pokazały znaczne zainteresowanie opracowanym dodatkiem zwłaszcza wśród technologów, którzy podkreślali potrzebę zastąpienia obecnie stosowanych zagęstników produktami pochodzenia naturalnego. Dzięki realizacji projektu miałam możliwość uczestnictwa w wielu konferencjach krajowych i międzynarodowych, co znacznie wzbogaciło mój warsztat naukowy. Wyniki podjętych badań nad funkcjonalizacją polisacharydów ścian komórkowych do celów żywnościowych uzyskały również nagrody na konferencjach międzynarodowych. Na sympozjum CIGR (International Commission of Agricultural and Biosystems Engineering) w Kantonie oraz konferencji ISEKI-Food Association w Atenach, prezentowane wyniki zdobyły wyróżnienie za najlepszy poster. Wyniki projektu były publikowane również w prasie oraz wydawnictwach o charakterze popularno-naukowym (Załącznik 4, str.26-27). Projekt umożliwił mi zorganizowanie własnego zespołu badawczego a także wymianę doświadczeń z przedstawicielami przemysłu rolno-spożywczego.

Znaczna część pracy badawczej realizowanej po doktoracie dotyczyła zagadnień związanych z oceną jakości owoców i warzyw, rozwijaniem metod oceny jakości, szczególnie tekstury oraz nowych urządzeń przemysłu rolno-spożywczego. Badania te były realizowane w ramach dwóch projektów rozwojowych kierowanych przez dr hab. Artura Zdunka, prof. IA PAN („Wytworzenie aparatury do niedestrukcyjnej oceny jakości warzyw i owoców na podstawie zjawiska biospeckli” oraz „Prototyp urządzenia opartego na metodzie emisji akustycznej do oceny kruchości i tekstury jabłek”) i jednego projektu PBS kierowanego przez dr hab. Dorotę Konopacką, prof. Instytutu Ogrodnictwa („Wykorzystanie ultradźwięków do wspomaganie procesów suszenia materiałów biologicznych

szczególnie wrażliwych na termiczne warunki suszenia"). Moja rola w tych projektach polegała na projektowaniu, wykonaniu i analizie badań biochemicznych, sensorycznych i mikroskopowych tkanek roślinnych. Wynikiem tych badań są cztery prace opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej (I.A.3, I.A.6, I.A.8, I.A.9). Pracowałam również w projekcie Sonata kierowanym przez dr Monikę Szymańską-Chargot pt. "The studies of cellulose microfibrils organization and structure and their influence on mechanical properties of cell wall during the development, ripening and storage of fruits", w którym przygotowywałam materiały kompozytowe oparte na celulozie bakteryjnej.

Obecnie jestem wykonawcą w projekcie Iuventus Plus kierowanym przez dr Andrzeja Kurendę pt. „Detekcja mechanicznych i chorobowych uszkodzeń jabłek za pomocą czasoprzestrzennej analizy biospecklowych obrazów interferencyjnych” w którym odpowiadam za mikrobiologiczną stronę eksperymentu.

W roku 2011 otrzymałam Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców na lata 2011-2014.

Od 2012 roku pełniłam funkcję opiekuna pomocniczego mgr inż. Joanny Mierczyńskiej i mgr Arkadiusza Koziola, stając się po otwarciu przewodów doktorskich w 2014 r. promotorem pomocniczym. Doktoranci pracowali jako wykonawcy w kierowanych przeze mnie projektach, a podjęta w ramach tych projektów tematyka stanowi znaczną część ich prac doktorskich. Od 2015 r. jestem opiekunem pomocniczym kolejnych doktorantów IAPAN: mgr Diany Ganczarenko i mgr Michała Schultza.

Jako opiekun Laboratorium Biochemicznego organizowałam praktyki studenckie oraz absolwenckie. Badania prowadzone w Laboratorium ciszą się dużym zainteresowaniem, dotychczas praktykowało pod moją opieką 14 osób. Oferta Laboratorium, którą staram się dostosowywać do bieżących potrzeb zlecniodawców, pozwoliła na wykonanie kilkunastu ekspertyz dla przemysłu i innych laboratoriów badawczych.

Od 2014 roku prowadzę współpracę z dr Peterem Capkiem z Instytutu Chemii Słowackiej Akademii Nauk dotyczącą analizy nanostruktury polisacharydów zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez mikroalgi. Dotychczas opublikowaliśmy wspólnie jedną pracę (I.A.13), w której opisałam nanostrukturę i budowę chemiczną na podstawie analizy widm FT-IR egzopolisacharydu wytwarzanego przez *Dictyosphaerium chlorelloides*. Współpraca z naukowcami z krajowych jednostek, m.in. Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, czy też Uniwersytetu Medycznego w Lublinie również zaowocowała kilkoma publikacjami z listy JCR. Prace te dotyczyły głównie analiz mikroskopowych, reologicznych oraz FT-IR różnych biomateriałów.

Od pięciu lat znaczącym elementem mojej pracy jest działalność w charakterze recenzenta. Dotychczas wykonałam 58 recenzji, głównie dla *Carbohydrate Polymers* (29 recenzji), *Journal of Food Engineering* (12) oraz *RSC Advances* (5). Od Edytorów *Journal of Food Engineering* otrzymałam "Certificate of Outstanding Contribution in Reviewing". Wykonuję również oceny projektów i raportów dla Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, dotychczas wykonałam 7 takich recenzji.

Po uzyskaniu stopnia doktora opublikowałam łącznie 27 recenzowanych prac, z których 23 w czasopismach z listy filadelfijskiej. Łączny *Impact Factor* prac opublikowanych po doktoracie, tj. od 2009 r., wynosi 53,628. Suma punktów MNiSW za prace opublikowane po doktoracie wynosi 688. W

tym okresie byłam kierownikiem 5 projektów naukowo-badawczych oraz pracowałam jako wykonawca w 6 projektach naukowych i 2 projektach strukturalnych.

Zestawienie dorobku naukowego przed i po uzyskaniu stopnia doktora

Dorobek naukowy	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Całkowity dorobek
Oryginalne opublikowane naukowe prace twórcze, w tym:	9	26	35
Oryginalne prace twórcze w czasopismach z IF stanowiące część osiągnięcia naukowego	nd	9	9
Oryginalne prace twórcze bez IF stanowiące część osiągnięcia naukowego	nd	1	1
Pozostałe oryginalne prace twórcze w czasopismach z IF	1	23	24
Pozostałe oryginalne prace twórcze bez IF	8	4	12
Sumaryczny IF	1.308	53.628	54.936
Punkty MNiSW za publikacje naukowe (z roku opublikowania)	51	688	739
Zgłoszenia patentowe i znaki towarowe	0	4	4
Kierowanie projektami badawczymi finansowanymi ze źródeł zewnętrznych	0	5	5
Wykonawca w projektach badawczych finansowanych ze źródeł zewnętrznych	5	6	11
Referaty wygłoszone na konferencjach międzynarodowych i krajowych	9	11	20
Komunikaty opublikowane w krajowych i międzynarodowych materiałach konferencyjnych	16	61	77
Recenzje publikacji	0	58	58
Recenzje projektów	0	6	6

21.12.2015 Justyna Cybulska