

Autoreferat

w języku polskim

dotyczący działalności naukowo-badawczej

dr Moniki Szymańskiej – Chargot

*Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego
Polska Akademia Nauk*

Lublin, 2015

1. Imię i Nazwisko

Monika Szymańska-Chargot

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne

- **magister fizyki**: Uniwersytet Marii Curie – Skłodowskiej, Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki, Instytut Fizyki, czerwiec 2004 r.

tytuł pracy: „**Algorytmy i logiki kwantowe**”
pod kierunkiem prof. dr. hab. Andrzeja Góździa

- **doktor nauk fizycznych w dyscyplinie fizyka**: Uniwersytet Marii Curie – Skłodowskiej, Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki, Instytut Fizyki, marzec 2010 r.

tytuł rozprawy: „**Metody wytwarzania i detekcji nanostruktur srebra**”
promotor: dr. hab. Krzysztof Bederski
recenzenci: prof. dr hab. Juliusz Sielanko
prof. dr hab. inż. Jerzy Zdanowski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

czerwiec 2011 - obecnie	- adiunkt Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polska Akademia Nauk
styczeń 2011 - czerwiec 2011	- pracownik badawczo – techniczny (fizyk) Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polska Akademia Nauk
lipiec 2010 - grudzień 2010	- pracownik inżynierijno – techniczny (fizyk) Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polska Akademia Nauk
październik 2005 - marzec 2010	- doktorant (Studium Doktoranckie Fizyki) Instytut Fizyki, Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki, Uniwersytet Marii Curie – Skłodowskiej
październik 2004 - wrzesień 2005	- asystent Instytut Fizyki Politechnika Lubelska

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.):

A) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Moim osiągnięciem, będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest cykl pięciu publikacji naukowych powiązanych tematycznie oraz ujętych pod wspólnym tytułem:

Zastosowanie metod spektroskopii oscylacyjnej w badaniach polisacharydów ściany komórkowej roślin

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

H1. Szymańska-Chargot M., Cybulska J., Zdunek A., „Sensing the structural differences of cellulose from apple and bacterial cell wall materials by Raman and FT-IR spectroscopy”, *Sensors* 11(6) (2011) 5543-5560.

IF_{5-letni}= 2.457

IF₂₀₁₁ = 1,739

MNiSW = 25

H2. Szymańska-Chargot M., Zdunek A. „Use of FT-IR spectra and PCA to the bulk characterization of cell wall residues of fruits and vegetables along a fraction process.” *Food Biophysics*, 8 (2013) 29-42.

IF_{5-letni}= 1.551

IF₂₀₁₃ = 1,551

MNiSW = 30

H3. Chylińska M., Szymańska-Chargot M., Zdunek A., 2014. „Imaging of polysaccharides in the tomato cell wall with Raman microspectroscopy.” *Plant Methods*, 10:14 (2014) 1-9.

IF_{5-letni}= 3.360

IF₂₀₁₄ = 3,102

MNiSW = 35

H4. Szymanska-Chargot M., Chylinska M., Kruk B., Zdunek A. „Combining FT-IR spectroscopy and multivariate analysis for qualitative and quantitative analysis of the cell wall composition changes during apples development.” *Carbohydrate Polymers*, 115 (2015) 93–103.

IF_{5-letni}= 4.330

IF₂₀₁₄ = 4,074

MNiSW = 40

H5. Chylinska M., Szymanska-Chargot M., Kruk B., Zdunek A. „Study on dietary fibre by Fourier transform-infrared spectroscopy and chemometric methods.” *Food Chemistry*, 194 (2016) 86–94.

IF_{5-letni}= 3.901

IF₂₀₁₄ = 3,391

MNiSW = 40

Wkład wnioskodawcy w wyżej wymienione prace przedstawiono w załączniku 3, natomiast oświadczenia współautorów w załączniku 7.

Summaryczny *impact factor* prac stanowiących najważniejsze osiągnięcie w dorobku naukowym według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania wynosi: **13.857**, punkty MNiSW = **170**.

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

W latach 2010 – 2015 realizowałam prace badawcze i wnikliwe studia literaturowe odnośnie wykorzystania spektroskopii wibracyjnej, w szczególności podczerwieni oraz Ramana, do badań zmian zawartości i struktury polisacharydów ścian komórkowych indukowanych zmianami fizjologicznymi owoców oraz warzyw. Uzyskane rezultaty opublikowałam w postaci cyklu prac powiązanych tematycznie (H1-H5), które uważam za swoje największe osiągnięcie w dotychczasowej działalności naukowej i przedkładałam jako podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Wprowadzenie

Właściwości mechaniczne ścian komórkowych kształtują szereg teksturalnych parametrów owoców i warzyw, które są głównym wyznacznikiem ich jakości konsumenckiej. Zarówno podczas procesów metabolicznych, takich jak dojrzewanie, jak i podczas przechowywania i przetwarzania, tkanki roślinne ulegają zmianom prowadzącym między innymi do niepożądanego mięknięcia owocu. Z tego względu struktura fizyko-chemiczna, jak i procesy kształtujące właściwości ścian komórkowych owoców i warzyw stanowią przedmiot licznych badań naukowych.

U roślin rozróżniamy pierwotną oraz wtórną ścianę komórkową. Pierwotna jest zbudowana z celulozy oraz pektyn i hemiceluloz, natomiast wtórna głównie z celulozy oraz ligniny. W roślinach dwuliściennych wyróżnia się ściany komórkowe typu I (Carpita i Gibeaut 1993). Model strukturalny tego typu ściany zakłada, że mikrofibryle celulozowe są otoczone i powiązane przez hemicelulozy, z których najbardziej powszechnym w owocach jest ksyloglukan. Tak utworzona sieć celulozowo-ksyloglukanowa jest zanurzona w przestrzennej sieci utworzonej przez wysoce uwodnione pektyny. Celuloza jest polimerem liniowym glukozy. Pęczki celulozy tworzą bardziej skomplikowane struktury zwane mikrofibrylami, które stanowią rusztowanie ściany komórkowej u roślin. Pektyny to także wielocukry, które zapewniają ścianie komórkowej odpowiednią gęstość, porowatość, odpowiadają za adhezję komórkową oraz dystrybucję enzymów i innych białek. Wyróżniamy trzy główne rodzaje pektyn w ścianie komórkowej roślin: homogalakturonan oraz ramnogalakturonan typu I i II. Homogalakturonan jest zbudowany z merów kwasu galakturonowego, ramnogalakturonan I jest złożony z dimerów ramnozy i kwasu galakturonowego, natomiast ramnogalakturonan II jest rozgałęzionym polisacharydem. Wśród licznej grupy związków tworzących hemicelulozy w owocach najbardziej powszechny jest ksyloglukan. Ksyloglukan, tak jak celuloza jest polimerem glukozy, odróżniającym się od niej tym, że zawiera dodatkowe grupy boczne składające się głównie z ksylozy. Pierwotna ściana komórkowa formuje się w trakcie wzrostu komórki. Na ogół pierwotna ściana komórkowa rośliny składa się w 25% z celulozy, 25 % z ksyloglukanu, 35 % pektyn, 1-8 % białek strukturalnych, 1-5 % jonowo lub kowalentnie związanych minerałów i 2 % związków fenolowych (% suchej masy) (Taiz & Zeiger 2002). Oprócz tych składników w ścianie komórkowej znajdują się również: białka, lipidy oraz woda. Oczywiście ilość poszczególnych składników jest zróżnicowana ze względu na gatunek, a także na odmianę danej rośliny. Lignina natomiast jest substancją fenolową, która odpowiada za nadanie sztywności wtórnej ścianie komórkowej oraz ma za zadanie chronić komórkę przed chorobami.

W zależności od gatunku owoców polisacharydy mogą wykazywać liczne modyfikacje podczas procesu ich dojrzewania (Wakabayashi 2000; Goulao i Oliveira 2008). Zmiany struktury ścian komórkowych są związane ze zmianami w samej strukturze pektyn, hemiceluloz i celulozy, a więc depolimeryzacją, rozpuszczaniem, ale także ze zmianami w ich układzie przestrzennym. Wszystkie te zmiany prowadzą do degradacji wymienionych polimerów, co powoduje spadek integralności ściany komórkowej i w konsekwencji coraz mniejszą jędrność owocu. Na przykład podczas dojrzewania owoców zawartość ksyloglukanu może ulec spadkowi wynoszącemu nawet do 30% (Wakabayashi 2000). Ze względu na nierozpuszczalność ksyloglukanu w wodzie, spadek ten tłumaczony jest depolimeryzacją tego związku. W przeciwieństwie do ksyloglukanu, degradacja pektyn może być rezultatem dwóch procesów - zarówno rozpuszczania, jak i depolimeryzacji. Procesy depolimeryzacji polisacharydów mogą być bądź enzymatyczne (enzymy produkowane przez komórkę roślinną, które powodują hydrolizę polisacharydów), bądź spowodowane występowaniem kwasu askorbinowego, który powoduje przerywanie wiązań ksyloglukan/celuloza czy pektyna/celuloza (Goulao i Oliveira 2008). Oba te procesy prowadzą do zmian właściwości mechanicznych ściany komórkowej, a w konsekwencji do zmian jędrności a także teksturalnych parametrów tkanki owoców. Jeżeli zaś chodzi o zmiany w strukturze mikrofibryli celulozowych podczas dojrzewania owocu, to obserwuje się wzrost ilości obszarów amorficznych, przez co same fibryle tracą spójność i ulegają coraz skuteczniejszemu działaniu enzymów (O'Donoghue i in. 1994). Tak więc, roślinne ściany komórkowe są wyjątkowo złożoną oraz dynamiczną strukturą i stanowią najbardziej obfite źródło ziemskiej biomasy i energii odnawialnej. Ponadto mają ogromne znaczenie w żywieniu ludzi i zwierząt, jak również są źródłem naturalnych włókien do wyrobu tkanin, materiałów oraz produktów papierowych. Poznanie budowy, jak i procesów zachodzących w ścianach komórkowych roślin cieszy się, więc dużym zainteresowaniem ze względu na ich zastosowania praktyczne, zarówno z punktu widzenia naukowego, jak i przemysłowego.

Budowa i właściwości ścian komórkowych różnią się w zależności od funkcji tkanek, w jakich występują dane komórki. Ściana komórkowa z jednej strony ma być na tyle wytrzymała aby utrzymać turgor komórki oraz na tyle elastyczna aby zapewnić jej prawidłowy wzrost. Na elastyczność ścian komórkowych ma wpływ zawartość wody, która jest wiązana w amorficznych obszarach ściany komórkowej, a także zawartość i stopień estryfikacji pektyn mówiące o ich możliwości tworzenia żeli. Stopień krystaliczności celulozy (obszary krystaliczne są sztywniejsze na rozciąganie) oraz uporządkowanie fibryli, są kolejnymi prawdopodobnymi czynnikami kształtującymi właściwości mechaniczne ścian komórkowych, mającymi bezpośrednie przełożenie na makroskalowe parametry teksturalne, które są istotne dla jakości konsumenckiej owoców i warzyw. Pierwotna ściana komórkowa dzięki substancjom matrycy polisacharydowej (pektyny i hemicelulozy) rozpiętej pomiędzy swoistym rusztowaniem składającym się z mikrofibryli celulozowych jest strukturą wyjątkowo elastyczną. Wtórne ściany komórkowe powstają, gdy komórka przestaje się powiększać; nadają stabilność mechaniczną wyspecjalizowanym typom komórek, takim jak ksylem i sklerenchyma. Ściany te stanowią kompozyt składający się z celulozy i hemiceluloz, oraz na ogół są impregnowane ligninami.

Skład ścian komórkowych, a także struktura tworzących je polisacharydów dotychczas badane były za pomocą licznych metod eksperymentalnych. Wśród nich wymienić można zarówno metody analizy chemicznej, jak i zaawansowane metody instrumentalne (NMR, MS, XRD, SEM, AFM). Pośród tych metod wybrane w moich badaniach zostały dwie: spektroskopia Ramana oraz spektroskopia w podczerwieni. Spektroskopia Ramana i spektroskopia w podczerwieni są metodami umożliwiającymi badanie drgań cząsteczek związków chemicznych. Dostarczają one informacji o ich budowie chemicznej poprzez identyfikację grup funkcyjnych i analizę widm. Pozwalają także ilościowo lub

półościowo oznaczyć ilość badanej substancji w próbce. Oba rodzaje spektroskopii są wykorzystywane na przykład przy kontroli przebiegu reakcji, przez analizę widm produktów lub ich mieszanin, a także przy badaniu oddziaływań zachodzących pomiędzy składnikami roztworów. Główną zaletą spektroskopii podczerwieni jest jej duża czułość. Dodatkowo, połączenie z transformatą Fouriera (FT-IR) powoduje, że uzyskuje się bardzo szybko wszechstronną informację o badanej próbce, co jest bardzo istotne w identyfikacji związków chemicznych. Obszar środkowy (liczb falowych od 4000 do 400 cm^{-1}) promieniowania podczerwonego jest najczęściej stosowany w badaniach obiektów biologicznych (Kačurakova i Wilson, 2001; Fellah i in. 2009; Černa i in. 2003). Dla każdego związku widmo absorpcji w podczerwieni w zakresie od 1400 do 400 cm^{-1} ma swój własny niepowtarzalny wzór, często nazywany regionem „*fingerprint*” (Alonso-Simon i in. 2004). Ponadto, analiza w regionie liczb falowych od 1800 do 1400 cm^{-1} może dostarczać informacji na temat grup funkcyjnych występujących w badanych cząsteczkach (Kačurakova i Wilson, 2001; Alonso-Simon i in. 2004). Spektroskopia Ramana, podobnie jak spektroskopia podczerwieni dostarcza informacji o budowie cząsteczki, wiązaniach międzyatomowych, które ją tworzą. Jednakże, o ile spektroskopia podczerwieni jest techniką absorpcyjną, o tyle spektroskopia Ramana opiera się na zjawisku nieelastycznego rozproszenia promieniowania przez próbkę. Jako źródło promieniowania wykorzystuje się lasery emitujące długość fali od zakresu ultrafioletu aż do podczerwieni. W badaniach roślinnej ściany komórkowej i jej polisacharydów najczęściej wykorzystuje się lasery o długości fali 532 nm lub 1064 nm.

Cel naukowy

Wspólnym celem naukowym wymienionych prac stanowiących moje osiągnięcie naukowo-badawcze było opracowanie szybkich metod identyfikacji i lokalizacji zmian w zawartości oraz strukturze polisacharydów ścian komórkowych w owocach.

Dodatkowo zostały określone następujące cele szczegółowe:

- określenie charakteru zmian w strukturze celulozy pod wpływem nie-celulozowych polisacharydów ścian komórkowych (pektyn i ksyloglukanu) – **praca H1**;
- opracowanie szybkiej metody identyfikacji zmian zawartości polisacharydów ścian komórkowych z zastosowaniem analizy widm podczerwieni – **prace H2, H4 oraz H5**;
- połączenie identyfikacji poszczególnych polisacharydów z ich przestrzenną lokalizacją w ścianie komórkowej – **praca H3**.

Omówienie wyników badań

Spektroskopowe badania struktury celulozy pochodzącej z różnych źródeł (H1)

Celuloza jest najbardziej rozpowszechnionym, występującym naturalnie polimerem na Ziemi. Jest głównym składnikiem budulcowym ścian komórkowych roślin, gdzie łańcuchy celulozy powiązane są w mikrofibryle. Każda molekula celulozy jest liniowym polimerem składającym się od tysiąca do miliona jednostek cukru, D-glukozy, połączonych ze sobą wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Z punktu widzenia składu chemicznego celuloza pochodząca z różnych źródeł składa się z tych samych pierwiastków, jednakże biorąc pod uwagę jej budowę w skali mikro może ona przejawiać różną strukturę krystaliczną. Czysta forma celulozy istnieje w kilku odmiennych rodzajach uporządkowania krystalicznego, takiego jak celuloza I, II, III czy IV. Najbardziej rozpowszechnioną w naturze formą celulozy jest celuloza I. Celuloza II jest wytwarzana przez niektóre bakterie lub algi, ale w większości

jest wytwarzana, podobnie jak celuloza III i IV, metodami chemicznymi z celulozy I (Brett i Waldron 1990; Saxena i Brown 2005).

Celuloza I wykazuje dwa rodzaje uporządkowania: $I\alpha$ oraz $I\beta$. Obie fazy krystaliczne wykazują te same konformacje, ale różnią się strukturą kryształu elementarnego: trójskośną w przypadku celulozy $I\alpha$ oraz jednoskośną w przypadku celulozy $I\beta$. Celulozy $I\alpha$ i $I\beta$ występują w przyrodzie w różnych proporcjach: rośliny wyższe bogate są w celulozę rodzaju $I\beta$, natomiast celuloza $I\alpha$ występuje głównie w ścianach komórkowych niektórych glonów i bakterii (Atalla 1999; Saxena i Brown 2005; Šturcová i in. 2004). Dodatkowo celulozy $I\alpha$ oraz $I\beta$ mają tę samą budowę molekularną oraz wykazują identyczne wiązanie wodorowe wewnątrz łańcucha polimeru (O3-H – O5), ale różnią się wiązaniem wodorowym pomiędzy dwoma łańcuchami celulozy (O3-H – O6). Komórka elementarna celulozy $I\beta$ zawiera dwa łańcuchy, natomiast celuloza $I\alpha$ zawiera jeden łańcuch (Festucci-Buselli i in. 2007; Gümüşkaya i in. 2003). Celuloza $I\alpha$ może być konwertowana poprzez zginanie w celulozę $I\beta$ podczas tworzenia fibryli (Jarvis, 2000).

Założeniem badań prezentowanych w publikacji **H1** było zbadanie struktury polimorficznej (stopień uporządkowania, stopień krystaliczności) oraz alomorficznej ($I\alpha$ i $I\beta$) celulozy różnego pochodzenia: natywnej celulozy wyizolowanej z miększu jabłka (*Malus domestica* cv Ligol) oraz celulozy produkowanej w postaci biofilmu przez bakterie *Gluconacetobacter xylinus* ze szczepu ATCC 10245 (NRRL B-759, NCIB 8034, USDA National Center of Agricultural Research).

Celami szczegółowymi było zbadanie:

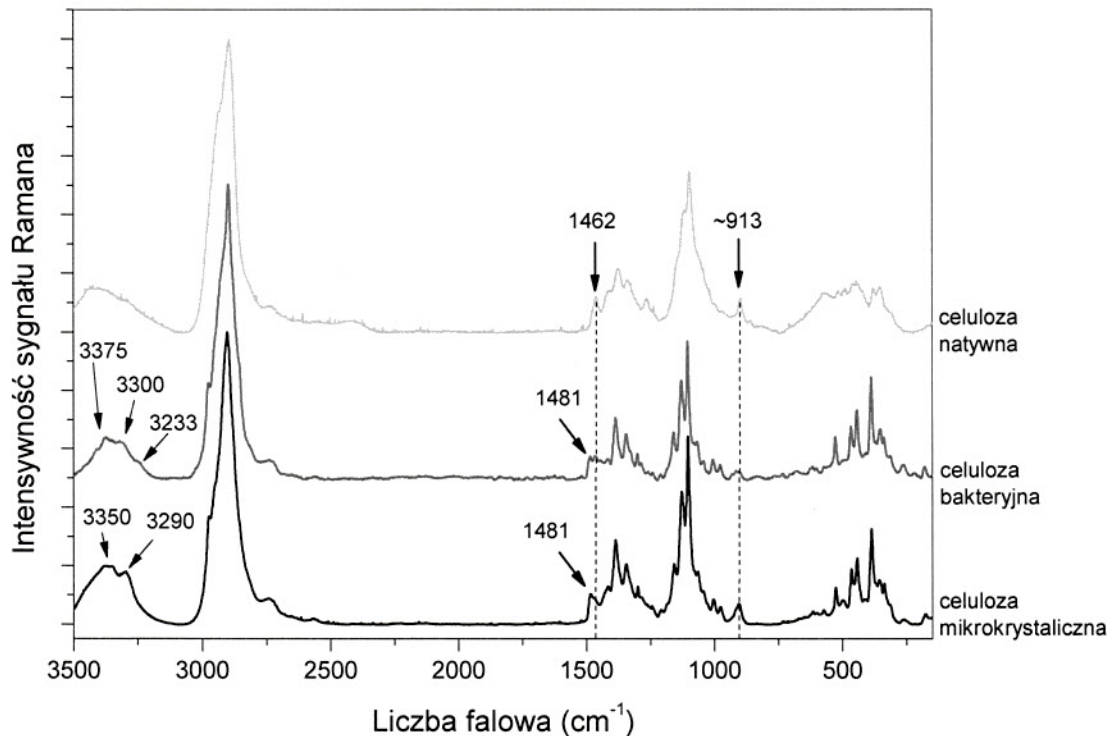
- czy struktura celulozy natywnej różni się od celulozy produkowanej przez bakterie,
- czy ksyloglukanu oraz pektyny, jako polisacharydy matrycy ściany komórkowej mają wpływ na strukturę celulozy.

Celuloza bakteryjna oprócz wielu zastosowań w medycynie oraz przemyśle w przypadku badań podstawowych może służyć jako materiał modelowy symulujący zachowanie ściany komórkowej. W związku z tym w powyższej pracy zostały użyte następujące kompozyty celulozy bakteryjnej oraz ksyloglukanu i pektyn:

- BC: celuloza bakteryjna,
- BCX: celuloza bakteryjna inkubowane w obecności ksyloglukanu (0,5 %),
- BCP: celuloza bakteryjna inkubowane w obecności pektyn (0,5 %),
- BCPX: celuloza bakteryjna inkubowane w obecności ksyloglukanu (0,25 %) i pektyn (0,25 %).

Wszystkie materiały były oczyszczane metodami chemicznymi w celu uzyskania czystej celulozy.

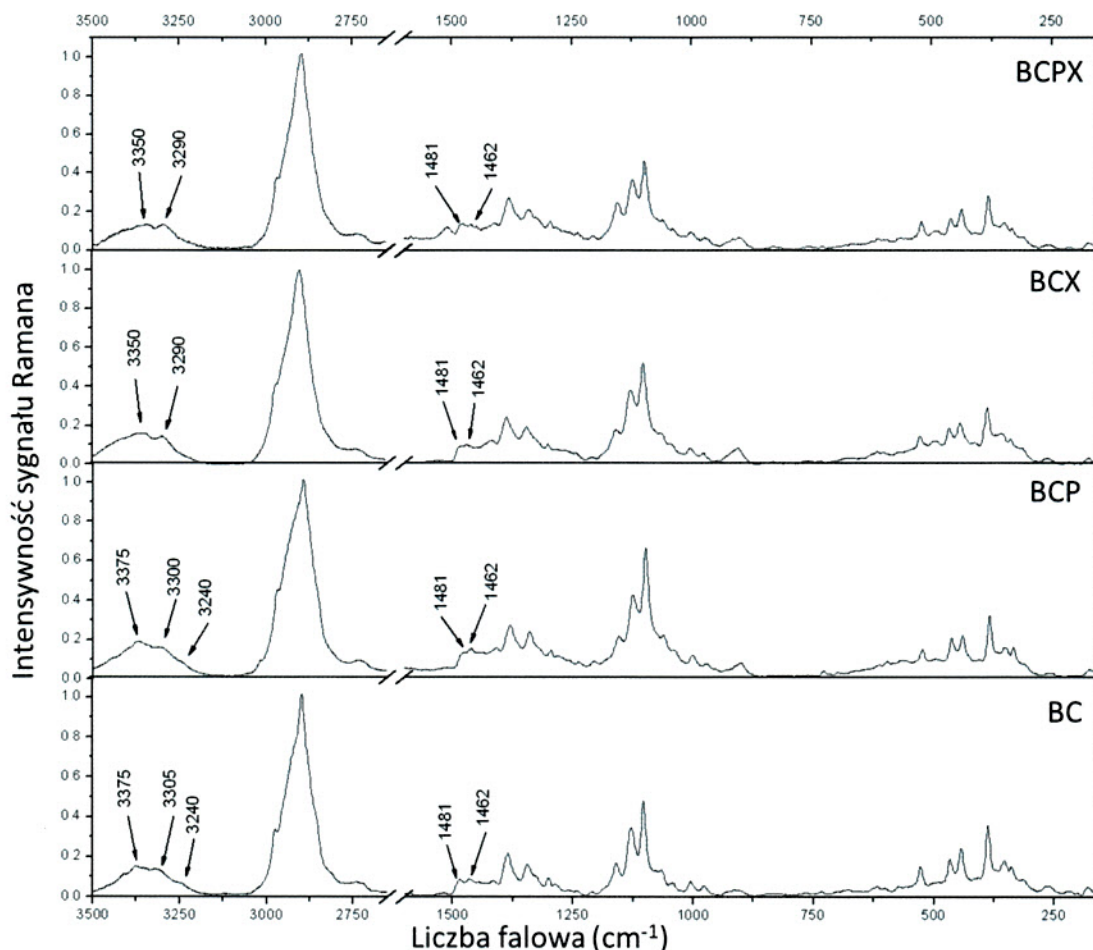
Widma Ramana oraz podczerwieni zostały uzyskane dla wysuszonego i rozdrobnionego materiału, zarówno celulozy natywnej wyizolowanej z miększu owocu jabłoni, jak i celulozy bakteryjnej BC, BCP, BCX oraz BCPX. Dodatkowo uzyskano widma próbek referencyjnych – celulozy mikrokryształicznej Avicel PH 101 i PH 302 (pochodzenie pulpa drzewna, PMC Biopolymer, Belgia) o wielkości kryształów odpowiednio: 50 μm oraz 100 μm , a także wyizolowanej z bawełny o wielkości kryształów celulozy wynoszącej 20 μm (Sigma Aldrich).



Rys.1. Widma Ramana uzyskane dla celulozy natywnej (wyzolowanej z mięszu owocu jabłoni), bakteryjnej oraz mikrokrystalicznej z zaznaczonymi charakterystycznymi pasmami użytecznymi w badaniach struktury celulozy.

Rysunek 1. przedstawia widmo Ramana uzyskane dla celulozy natywnej, celulozy bakteryjnej BC oraz celulozy mikrokrystalicznej Aldrich. Zidentyfikowano pasma charakterystyczne dla tych rodzajów celulozy, na przykład świadczące o ich stopniu krystaliczności. Na podstawie tych widm wyciągnięto następujące wnioski:

- 1) Celuloza natywna ma mniejszy stopień uporządkowania niż celuloza mikrokrystaliczna czy celuloza bakteryjna, o czym świadczą nakładające się pasma, a także brak niektórych z pasm. Najbardziej charakterystycznymi pasmami były pasma identyfikowane dla drgań nożycowych H-C-H z maksimum około 1462 cm^{-1} (celuloza amorficzna) oraz 1481 cm^{-1} (celuloza krystaliczna). Różne proporcje intensywności tych pasm świadczą o różnym stopniu krystaliczności celulozy.
- 2) Celuloza natywna oraz mikrokrystaliczna posiadają przewagę form alomorficznych I β , w stosunku do celulozy bakteryjnej. Świadczy o tym układ pasm w obszarze $3100 - 3400\text{ cm}^{-1}$ odpowiadający drganiom rozciągającym O-H. Charakterystycznymi cechami widma dla celulozy o strukturze alomorficznej I α jest pojawienie się w obszarze tego pasma dodatkowego wierzchołka około 3240 cm^{-1} oraz przesunięcie pozostałych wierzchołków w kierunku większych liczb falowych o około 20 cm^{-1} .
- 3) Widma Ramana (rysunek 2) celulozy bakteryjnej inkubowanej z dodatkiem ksyloglukanu i pektyn wskazują na różnice zarówno w stopniu krystaliczności (układ pasm 1462 cm^{-1} oraz 1481 cm^{-1}), jak i we wpływie nie-celulozowych polisacharydów na strukturę alomorficzną celulozy I α i I β .



Rys.2. Widma Ramana uzyskane dla celulozy bakteryjnej inkubowanej w obecności nie-celulozowych polisacharydów ścian komórkowych (BCP, BCX, BCPX) lub bez (BC) z zaznaczonymi charakterystycznymi pasmami użytecznymi w badaniach struktury celulozy. Wyjaśnienie skrótów w tekście.

Zaobserwowano również różnice w szerokości oraz intensywności pasma występującego około 913 cm^{-1} . Pasma to jest związane zarówno ze stopniem krystaliczności celulozy, jak i wielkością kryształitów. Jego poszerzenie i spadek intensywności w przypadku celulozy bakteryjnej może świadczyć o zmianie wielkości kryształitów pod wpływem dodatku pektyn i ksyloglukanu, a także wskazywać na zmiany w stopniu ich uporządkowania (stopniu krystaliczności). Atalla i Wiley (1987) wykazali, że intensywność tego pasma może korelować ze stopniem krystaliczności badanej celulozy.

Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki o różnicach w strukturze celulozy, dokonano obliczeń stopnia krystaliczności badanych celuloz $\%X_C^{\text{RAMAN}}$ w oparciu o zebrane widma Ramana. Stopień krystaliczności zdefiniowany został wg następującego wzoru (Schenzel i in. 2005):

$$\%X_C^{\text{RAMAN}} = \frac{I_{1481}}{I_{1481} + I_{1462}} \times 100\%. \quad (1)$$

gdzie I_{1462} and I_{1481} są intensywnością pasm Ramana z maksimum przy odpowiednio 1462 i 1481 cm^{-1} .

Różnice w strukturze alomorficznej badane były na podstawie uzyskanych widm podczerwieni. Na ich bazie udało się wykazać, że dwa pasma z maksimum około 750 i 710 cm^{-1} są charakterystyczne dla struktury alomorficznej odpowiednio I_α i I_β . Stosunek względny alomorfów celulozy I_α i I_β może

więc być policzony jako stosunek pól tychże pasm. Procentowy udział struktury I_{β} wyznaczany był według następującego wzoru (Gümüşkaya i in. 2003):

$$\%I_{\beta} = \frac{A_{710}}{A_{710} + A_{750}} \quad (2)$$

gdzie A_{710} i A_{750} są polem powierzchni pasm z maksimum około 710 i 750 cm^{-1} .

Otrzymane wyniki zostały zebrane w tabeli 1.

Tabela 1. Policzone wartości stopnia krystaliczności celulozy, procentowej zawartości celulozy I_{β} , FWHM (full width at half maximum – szerokość połówkowa) oraz intensywność pasma Ramana około 913 cm^{-1} dla różnych typów celulozy. W nawiasach umieszczono wartość odchylenia standardowego.

PRÓBKİ		$\%X_c^{\text{RAMAN}}$	$\%I_{\beta}$	FWHM $\sim 913 \text{ cm}^{-1}$	INT $\sim 913 \text{ cm}^{-1}$
CELULOZA BAKTERYJNA	BC	49.5 (3.2)	66.6 (2.6)	36.9 (3.4)	0.042 (0.012)
	BCP	44.1 (5.1)	50.8 (6.4)	27.9 (9.0)	0.072 (0.045)
	BCX	47.6 (2.7)	85.2 (5.5)	33.5 (2.8)	0.081 (0.025)
	BCPX	50.2 (1.4)	87.4 (9.4)	45.9 (9.9)	0.071 (0.018)
CELULOZA MIKROKRISTALICZNA	PH101	53.8 (1.4)	96.0 (3.1)	28.4 (2.9)	0.068 (0.015)
	PH302	51.8 (2.4)	84.6 (4.5)	28.2 (2.2)	0.064 (0.010)
	Aldrich	53.8 (1.4)	94.2 (5.3)	29.0 (2.5)	0.063 (0.012)
celuloza natywna		25.3 (1.8)	62.3 (4.6)	14.8 (0.8)	0.067 (0.007)

Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto następujące wnioski:

- 1) Celuloza natywna ma postać praktycznie amorficzną o przewadze struktur I_{α} .
- 2) Obecność ksyloglukanu powoduje zmianę struktury celulozy bakteryjnej z I_{α} na I_{β} , a struktura alomorficzna BCX i BCPX jest podobna do struktury alomorficznej celulozy natywnej. W przypadku obecności pektyn celuloza BCP wykazuje, podobnie jak BC, strukturę I_{α} .
- 3) Najwyższy stopień krystaliczności został otrzymany dla trzech rodzajów celulozy mikrokrystalicznej (51-53%). Natomiast bardzo ciekawe wnioski można wysnuć na podstawie wyników otrzymanych dla celulozy bakteryjnej: dodatek pektyn (BCP) lub ksyloglukanu (BCX) powodował nieznaczne obniżenie stopnia krystaliczności w stosunku do celulozy bakteryjnej inkubowanej bez dodatku tego polisacharydu (BC). Jednakże już dodanie mieszaniny ksyloglukanu i pektyn (BCPX) powodowało wzrost wartości $\%X_c^{\text{RAMAN}}$ badanej celulozy do poziomu porównywalnego z wartościami otrzymanymi dla celulozy mikrokrystalicznej.
- 4) Analiza szerokości połówkowej pasma $\sim 913 \text{ cm}^{-1}$ oraz korelacja tej wielkości z wartością stopnia krystaliczności wskazuje na przydatność tego pasma w monitorowaniu stopnia uporządkowania badanej celulozy. Należy tu dodać, że nie uzyskano satysfakcjonujących wyników jeżeli chodzi o korelację intensywności tego pasma i stopnia krystaliczności.

Wyniki przedstawione w H1 wskazują na przydatność zarówno analizy widm podczerwieni, jak i w szczególności widm Ramana do badań zmian strukturalnych celulozy. Dodatkowo pokazano, że dodatek nie-celulozowych polisacharydów, naturalnie występujących w ścianie komórkowej owoców i warzyw, w nietrywialny sposób wpływa na strukturę celulozy bakteryjnej. Obserwacje te pozwalają w dalszej kolejności wnioskować, że zarówno zmiany zawartości nie-celulozowych polisacharydów, a także ich wpływ na strukturę celulozy mogą mieć wpływ na właściwości mechaniczne i fizyko-chemiczne ściany komórkowej owoców i warzyw.

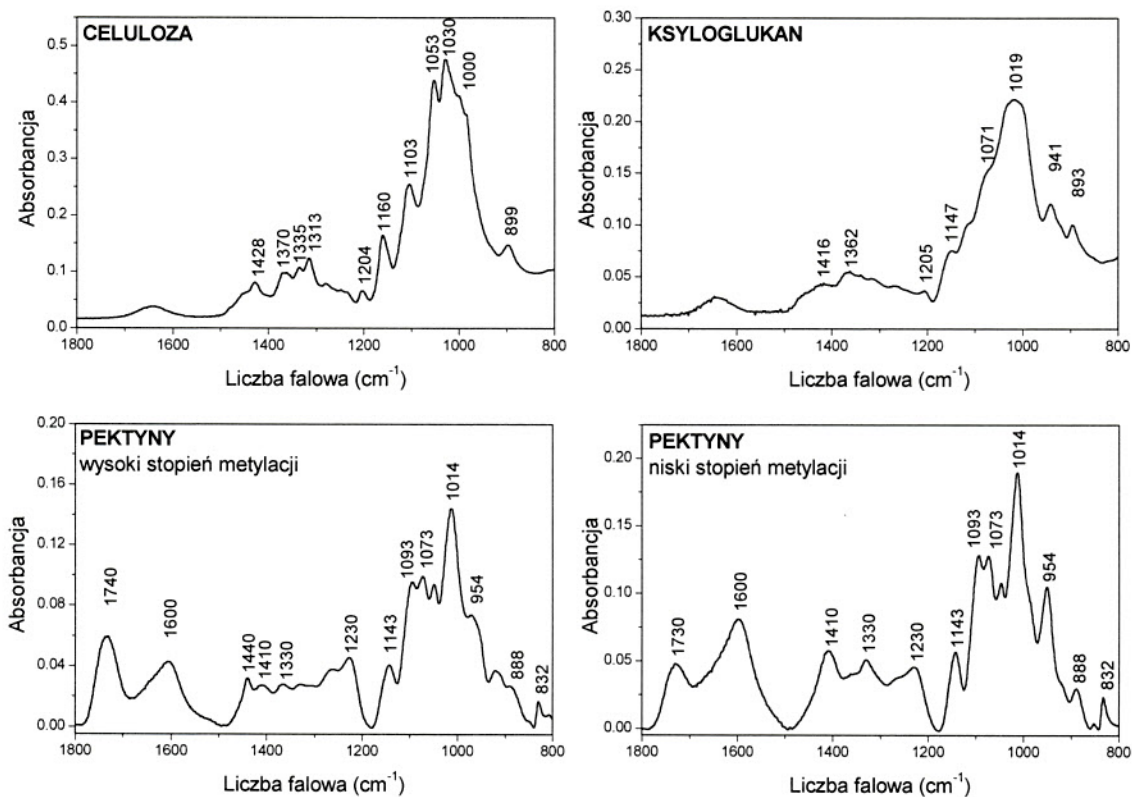
Charakterystyka ścian komórkowych owoców i warzyw za pomocą spektroskopii podczerwieni oraz analiz wielowymiarowych (H2, H4 i H5)

Konsekwencją wyników badań opisanych w pracy **H1** była próba odpowiedzi na pytanie, czy i jak obecność nie-celulozowe polisacharydów (pektyn i hemiceluloz) wpływa na naturalnie występującą celulozę oraz jaki wpływ ma ona na właściwości mechaniczne (jędrność) badanych owoców i warzyw. Praktyczna realizacja tego zagadnienia wymagała opracowania metodycznych podstaw szybkiej identyfikacji i oceny składu ścianach komórkowych.

Prace badawcze przeprowadzone zostały na bazie analizy widm podczerwieni materiału ścian komórkowych. Zakłada się, że ściana komórkowa jako swoistego rodzaju mieszanina różnych polisacharydów, posiadać będzie charakterystyczne widmo w podczerwieni, w zależności od proporcji występujących polisacharydów. Jest to wynikiem unikalnego układu pasm w widmie poszczególnych polisacharydów, co jest odzwierciedleniem ich budowy chemicznej.

Polimery wchodzące w skład ścian komórkowych roślin posiadają unikalny skład cząsteczkowy oraz w szczególny sposób oddziałują ze sobą. Złożoność budowy ścian komórkowych jest widoczna w widmach podczerwieni: objawia się ona w postaci zróżnicowania intensywności pasm oraz braku lub przesunięciu niektórych z pasm. Stąd analiza widm podczerwieni daje przybliżony obraz budowy ścian komórkowych. Dodatkowo wykorzystane jest tutaj prawo Lamberta-Beera mówiące, że absorbancja jest wprost proporcjonalna do stężenia danej substancji oraz grubości analizowanej warstwy. Absorbancja uzyskana dla poszczególnych pasm jest proporcjonalna do ilości drgających wiązań i można ją odnieść do ilości danej substancji w próbce.

Widma podczerwieni (FT IR) wybranych polisacharydów: celulozy, ksyloglukanu oraz pektyn o wysokim i niskim stopniu metylacji zostały przedstawione na rysunku 3. Nakładanie się widm podczerwieni dla celulozy i ksyloglukanu, jest odzwierciedleniem ich podobnej budowy molekularnej: szkielet ksyloglukanu, tak jak i celulozy składa się z połączonych ze sobą wiązań β -glikozydowym jednostek D-glukozy. Jednakże w przeciwieństwie do celulozy, która jest liniowym polimerem, w przypadku ksyloglukanu dodatkowo dołączone są podstawniki w postaci cukrów prostych, takich jak ksyloza. Mimo tego, można wyróżnić pasma różniące oba polisacharydy, takie jak 941 cm^{-1} charakterystyczne dla drgań pierścienia dla ksyloglukanu, czy 1428 oraz 1313 cm^{-1} – symetryczne drganie zginające CH_2 , czy 899 cm^{-1} – drganie zginające C1-H charakterystyczne dla celulozy. Pektyny są rozgałęzionym polimerem (1,4)- α -D-galakturonanu z podstawnikami w postaci α -D-galaktopiranozy, α -L-arabinofuranozy oraz (1,2)- α -ramnopiranozy. Najbardziej charakterystyczne i wyróżniające spośród innych polisacharydów, dla pektyn są pasma: 1330 i 832 cm^{-1} – charakterystyczne dla drgań pierścienia oraz 954 cm^{-1} – charakterystyczne dla drgań zginających C-O. W przypadku pektyn w roślinach mamy do czynienia z ich różnym stopniem metylacji. W widmach podczerwieni widoczne są pasma $1740 - 1730\text{ cm}^{-1}$ charakterystyczne dla drgania rozciągającego C=O, w obrębie estrów karbonylowych oraz pasmo $1630 - 1600\text{ cm}^{-1}$ charakterystyczne dla drgania rozciągającego COO^- jonów karboksylowych. Ze stosunku tych pasm można obliczyć stopień metylacji pektyn znajdujących się w próbce badanych ścian komórkowych.



Rys. 3. Widma podczerwieni polisacharydów ścian komórkowych tkanki miększej owoców i warzyw (celuloza, ksyloglucanu, pektyny wysoko- i niskometylowane).

Metody chemometryczne, jakie zostały użyte do analizy widm podczerwieni to przede wszystkim analiza głównych składowych (PCA – principal component analysis) oraz analiza regresji częściowych najmniejszych kwadratów (PLS – partial least squares), ale także analiza skupień – metodą hierarchiczną (HCA – hierarchical cluster analysis) oraz k-średnich.

PCA jest techniką redukcji danych, w której jako wynik otrzymujemy najczęściej dwa typy parametrów: ładunki czynnikowe oraz wektory ładunków. Wektory ładunków to współczynniki pokazujące wkład poszczególnych zmiennych bazowych w tworzeniu składowych głównych. Im wartość bezwzględna z ładunku większa tym zmienna ma większy wkład w budowę składowej głównej. Ładunki czynnikowe są współrzędnymi obserwacji w nowym układzie współrzędnych utworzonym przez składowe główne, to one najczęściej podlegają wizualizacji na wykresie typu biplot. Metoda użyta w celu znalezienia różnic pomiędzy próbkami oraz stwierdzenia, które wielkości widmowe służą do najlepszej ich identyfikacji.

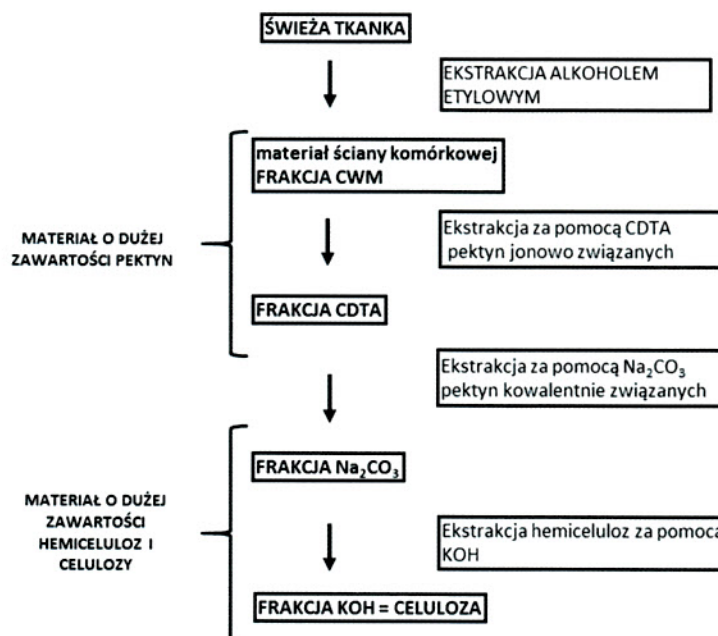
PLS jest techniką tworzenia modelu kalibracyjnego w oparciu o kilka ukrytych zmiennych (latent variables), które są wzajemnie ortogonalne. Otrzymujemy dwie macierze zmiennych: macierz X predyktorów (widma podczerwieni) oraz macierz Y deskryptorów (referencyjne analizy chemiczne). Ładunki pokazują, które zmienne mają największy wpływ na budowę modelu. Wielkości, które charakteryzują jakość modelu PLS to:

- średni błąd kwadratowy zbioru modelowego RMSEC (root-mean-square-error of calibration);
- średni błąd kwadratowy walidacji krzyżowej RMSECV (root-mean-square error of cross-validation);

- R^2 jest miarą jakości dopasowania modelu oraz Q^2 jest miarą jakości przewidywania dla przyszłych modeli; R^2 i Q^2 przyjmują wartości od 0 do 1, ale model z wartościami R^2 oraz Q^2 równymi 0.9 uważany jest za bardzo dobry.

Metody HCA oraz k-średnich są metodami analizy skupień, czyli narzędziem do eksploracyjnej analizy danych, której celem jest ułożenie obiektów w grupy w taki sposób, aby stopień powiązania obiektów z obiektami należącymi do tej samej grupy był jak największy, a z obiektami z pozostałych grup jak najmniejszy. Analiza skupień może być wykorzystywana do wykrywania struktur wśród danych.

Do badań wstępnych zostały wybrane następujące owoce i warzywa: bulwa ziemniaka jadalnego (*Solanum tuberosum* cv. Irga), owoc pomidora (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Plomien), korzeń marchwi (*Daucus carota* L. cv. Finezja), korzeń selera (*Apium graveolens* L. var. rapaceum Mill. cv. Edward) oraz owoc dyni (*Curcubita* L. cv. Bambino) (**praca H2**). Następnie została przeprowadzona sekwencyjna ekstrakcja według schematu przedstawionego na rysunku 4. Kolejnym krokiem było otrzymanie widm podczerwieni frakcji CWM, frakcji CDTA, frakcji Na_2CO_3 oraz frakcji KOH. Otrzymane widma były analizowane przy pomocy analizy głównych składowych (PCA, Principal Component Analysis), aby zidentyfikować liczby falowe pozwalające na dyskryminację próbek ze względu na zawartość poszczególnych polisacharydów w ścianie komórkowej (**praca H2**).



Rys.4. Schemat przygotowania próbki oraz sekwencyjnej ekstrakcji polisacharydów.

Widma podczerwieni uzyskane dla frakcji CWM oraz CDTA każdej z próbek zawierały bardzo podobny zestaw pasm, które zostały przypisane, jako charakterystyczne odpowiednio dla pektyn: 1740, 1600, 1230, 1019 cm^{-1} , ksyloglukanu: 1370, 1147 cm^{-1} oraz celulozy: 895 cm^{-1} . Co charakterystyczne, dla każdej z badanych próbek układ tych pasm był inny, co może sugerować różny skład i strukturę polisacharydów dla badanych próbek. Na przykład, różny stosunek intensywności oraz kształtu pasm z maksimum około 1740 i 1600 cm^{-1} może wskazywać na różny stopień metylacji pektyn zawartych w ścianach komórkowych badanych owoców i warzyw. Natomiast w przypadku widm podczerwieni frakcji Na_2CO_3 występują pasma charakterystyczne dla ksyloglukanu (1147 cm^{-1}) oraz celulozy (1030 cm^{-1}). Pasma te były niewidoczne na widmach podczerwieni frakcji CWM oraz CDTA w wyniku przestąpienia ich przez pasma pochodzące od pektyn. Zgodnie z procedurą ekstrakcji

sekwencyjnej frakcja KOH powinna składać się celulozy, jednakże w widmie podczerwieni tej frakcji widoczne są pasma charakterystyczne dla innych, nie-celulozowych polisacharydów. Może to być spowodowane pozostałościami rozgałęzionych pektyn i hemiceluloz, których usunięcie wymaga silniejszych metod ekstrakcji.

W wyniku analiz technikami spektralnymi uzyskiwana jest duża ilość danych, których analiza w postaci surowej jest wyjątkowo trudna. Z tego względu do analizy danych z widm podczerwieni, użyto wielowymiarowej techniki eksploracji danych, jaką jest analiza głównych składowych (PCA). Celem analizy PCA było znalezienie na podstawie widm podczerwieni:

- 1) różnic pomiędzy poszczególnymi frakcjami ścian komórkowych pod kątem zawartości polisacharydów,
- 2) różnic pomiędzy kompozycją ścian komórkowych poszczególnych owoców i warzyw.

Widma analizowane były w dwóch zakresach: $1800 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ oraz $1200 - 800 \text{ cm}^{-1}$. Do wyjaśnienia wszystkich różnic wybrane zostały trzy pierwsze główne składowe (PC1, PC2 i PC3).

W przypadku analizy różnic między próbkami ze względu na frakcje polisacharydów najlepsze wyniki zostały otrzymane dla zakresu $1800 - 1200 \text{ cm}^{-1}$. Główna składowa PC1 odzwierciedlała wariancję występującą pomiędzy widmami otrzymanymi dla danej próbki i frakcji. Natomiast wyraźne grupowanie wyników zostało otrzymane wzdłuż osi PC2: frakcje zawierające pektyny (CWM i CDTA) znajdowały się po dodatniej stronie osi PC2, natomiast próbki nie zawierające pektyn (Na_2CO_3 i KOH) po ujemnej stronie osi PC2. Analiza wektorów ładunków otrzymanych dla tych składowych pozwoliła na określenie liczb falowych, które są najbardziej charakterystyczne dla poszczególnych frakcji: mające dodatni wpływ na ładunki głównej składowej PC2: $1740, 1610$ i 1317 cm^{-1} (charakterystyczne dla pektyn) oraz mające ujemny wpływ: 1370 i 1317 cm^{-1} (charakterystyczne dla ksyloglukanu i celulozy).

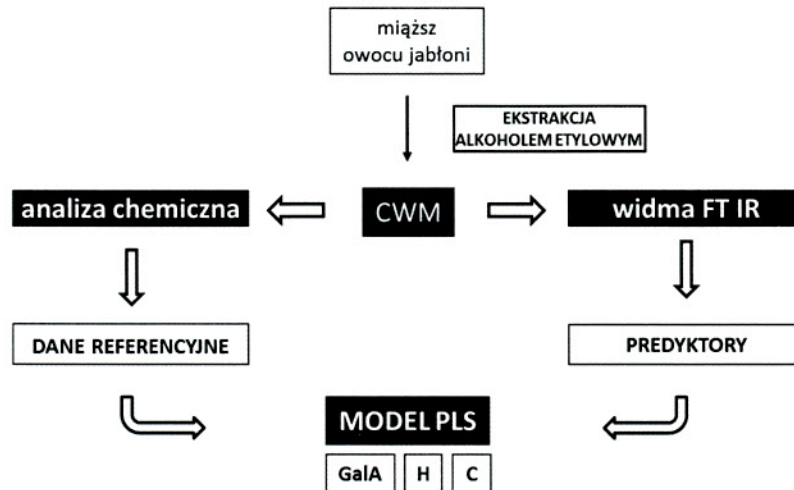
W przypadku analizy widm w obrębie tej samej frakcji, ale różnych owoców i warzyw (rozdzielenie ze względu na rodzaj owoców i warzyw) najlepsze grupowanie zostało otrzymane dla składowych PC2 oraz PC3 (dla obu wybranych zakresów widmowych). Analizując wektory ładunków mające wpływ na ich grupowanie można wyróżnić następujące liczby falowe charakterystyczne dla pektyn: $1740, 1600, 1410, 1240, 970$ i 951 cm^{-1} , celulozy: $1360, 1100$ i 1040 cm^{-1} oraz ksyloglukanu: 1070 i 1020 cm^{-1} . Stąd wywnioskowano, że największy wpływ na rozdzielenie próbek ma zawartość pektyn. Potwierdzone to zostało na drodze laboratoryjnych oznaczeń zawartości pektyn (jako zawartości kwasu galakturonowego w mg/g ściany komórkowej) w otrzymanych próbkach. Najniższa zawartość pektyn została zmierzona dla próbki ściany komórkowej ziemniaka, który tworzy najlepiej odseparowaną grupę punktów na wykresach PC2xPC3. Próbki, które wykazywały podobną zawartość pektyn, na wykresie PC2xPC3 tworzą grupy położone blisko siebie.

Badania te pokazały (**praca H2**), że możliwa jest dyskryminacja próbek ścian komórkowych różnych owoców i warzyw jedynie na podstawie ich widm podczerwieni. Dodatkowo wykazano, że analizując widma podczerwieni poszczególnych frakcji pozostałych po ekstrakcji sekwencyjnej możliwe jest dokonanie ilościowej charakterystyki próbek ze względu na zawartość polisacharydów.

Kolejnym krokiem było sprawdzenie, czy możliwa jest jakościowa i ilościowa analiza widm podczerwieni pod kątem zawartości polisacharydów w ścianie komórkowej owocu jabłoni, podczas jego fizjologicznego rozwoju (**praca H4**).

W tym celu zostały zebrane owoce jabłoni dwóch odmian Ligol i Szampion (*Malus domestica* Borkh. cv Ligol, Szampion) w terminie od początku lipca aż do początku października w odstępach początkowo dwu-, a następnie jednodniowych. Uzyskano w ten sposób osiem terminów próbkowania (LT1 – LT8, SZT1 – SZT8), w czasie których izolowano materiał ścian komórkowych (CWM). Równolegle wykonywane były analizy chemiczne (oznaczenie zawartości kwasu galakturonowego,

hemiceluloz oraz celulozy) oraz rejestrowane widma podczerwieni ścian komórkowych. Widma podczerwieni zostały użyte jako predyktory, natomiast wyniki analiz chemicznych jako dane referencyjne do budowy modelu PLS zawartości kwasu galakturonowego (GalA), hemiceluloz (H) oraz celulozy (C) (rysunek 5). Do wstępnej analizy widm wykorzystano analizę głównych składowych (PCA) oraz analizę k-średnich. Aby uwypuklić różnice widmowe pomiędzy próbkami wykonano operację różniczkowania (pierwsza pochodna) widm.



Rys.5. Schemat otrzymania próbki oraz analizy danych spektralnych metodą PLS.

W wyniku analizy PCA został otrzymany wykres PC1xPC2 wyjaśniający 89% zmienności widm. Ładunki czynnikowe otrzymane dla każdej próbki (LT1 – LT8, SZT1 – SZT8) zostały pogrupowane wzdłuż osi PC2 wg odmiany (L lub SZ), natomiast wg terminu zbioru (T1 – T8) wzdłuż PC1. Przy czym ładunki czynnikowe odpowiadające LT1 oraz SZT1 leżą blisko siebie, co może wskazywać na podobieństwa w składzie polisacharydów obu próbek, podobny wniosek może być wysunięty dla SZT3 i LT2. Wykonano również wykresy ładunków czynnikowych PC1 w funkcji zawartości kwasu galakturonowego oraz celulozy, które wykazywały ujemną korelację, co wskazuje na największy wpływ na rozrzut wyników wzdłuż osi PC1 właśnie zawartości tych polisacharydów. Analiza wektorów ładunków otrzymanych dla ładunków PC1 oraz PC2 ujawnia liczby falowe, które mają największy wpływ na ich położenie. Wpływ dodatni mają głównie liczby falowe charakterystyczne dla pektyn (830, 888, 1230 and 1440 cm^{-1}), ale także dla celulozy (1319 and 1340 cm^{-1}) i hemiceluloz (1374 and 1417 cm^{-1}). Natomiast wpływ ujemny mają te charakterystyczne dla hemiceluloz (870 i 941 cm^{-1}) i celulozy (1000, 1030 1205, 1360 i 1427 cm^{-1}). Dzięki analizie skupień k-średnich otrzymano dwie grupy: grupa 1 zawierająca LT1, LT2, LT3, SZT1, SZT2, SZT3 i SZT7, oraz grupa 2 - LT4, LT5, LT6, LT7, LT8, SZT4, SZT5, SZT6 i SZT8.

Na końcu na podstawie widm podczerwieni i przy użyciu regresji metodą najmniejszych kwadratów (PLS) zostały stworzone modele kalibracyjne. Modele te z dużą zgodnością opisywały zmiany zawartości kwasu galakturonowego oraz celulozy w składzie ścian komórkowych tkanki miękkiszej owoców jabłoni. W obu przypadkach została osiągnięta bardzo dobra zgodność modelu w porównaniu z wynikami referencyjnymi ($R^2 > 0.9$). Wysoka wartość Q^2 wskazywała na przydatność obu modeli dla przyszłych predykcji zarówno kwasu galakturonowego, jak i celulozy. Jedynie w przypadku modelu kalibracyjnego opisującego zmiany w zawartości hemiceluloz, pomimo dobrej zgodności modelu w porównaniu z wynikami referencyjnymi ($R^2 > 0.9$), nie otrzymano wysokiej wartości Q^2 ($Q^2 = 0.35$) co wskazuje niestety na brak przydatności modelu w przyszłości. Natomiast średni błąd kwadratowy walidacji krzyżowej RMESCV otrzymany odpowiednio dla modeli

kalibracyjnych kwasu galakturonowego, hemiceluloz oraz celulozy był na poziomie: 8.30 mg/g, 4.08 % oraz 1.74 %.

Podsumowując, osiągnięciem **pracy H4** było pokazanie, że na podstawie widm podczerwieni wyizolowanych ścian komórkowych możliwe jest opracowanie modelu kalibracyjnego, który z powodzeniem może być zastosowany w badaniach nad zawartością poszczególnych polisacharydów ścian komórkowych.

Celem **pracy H5** było zastosowanie i uogólnienie metod opracowanych w **pracy H4** do określenia zawartości i składu błonnika pokarmowego w różnych owocach. A w szczególności odpowiedź na pytanie czy na podstawie widm podczerwieni możliwa jest:

- klasyfikacja różnych frakcji błonnika;
- określenie źródła błonnika (rodzaju owocu);
- przewidzenie ilości poszczególnych frakcji błonnika/polisacharydów?

Błonnik pokarmowy jest zdefiniowany jako ogół substancji znajdujących się w roślinnej ścianie komórkowej. Można je podzielić na rozpuszczalne w wodzie: pektyny i część mniej rozgałęzionych hemiceluloz oraz nierozpuszczalne w wodzie: celuloza, hemicelulozy ekstrahowane przez roztwory o odczynie kwasowym, a także lignina i inne składniki towarzyszące (kutyna, suberyna, krzemionka). Drugim podziałem jest rozróżnienie błonnika pokarmowego jako substancji o charakterze polisacharydowym (celuloza, hemicelulozy, pektyny) i niepolisacharydowym (ligniny, kutyny). Jak powszechnie wiadomo jednym z największych źródeł błonnika są owoce i warzywa.

Do badań wybrano 16 owoców (cytrusy, owoce jagodowe, jabłka, pestkowe, awokado), a eksperyment przebiegał wg schematu przedstawionego na rysunku 5. Dodatkowo oprócz uzyskania widm frakcji CWM uzyskano dodatkowo widma frakcji NDF (neutral detergent fibre) oraz frakcji ADF (acidic detergent fibre). NDF powstaje po wyflukaniu z materiału ściany komórkowej wszystkich polisacharydów rozpuszczalnych w detergencie neutralnym. Natomiast ADF uzyskuje się przez wyflukanie substancji rozpuszczalnych w detergencie kwasowym z frakcji NDF.

Analizy zawartości poszczególnych polisacharydów pokazały duże zróżnicowanie:

- zawartość kwasu galakturonowego wahała się od $113 \pm 1,81$ mg/g wagi ściany komórkowej w przypadku jabłka aż do powyżej 300 mg/g wagi ściany komórkowej w przypadku owoców cytrusowych;
- zawartość hemiceluloz oscylowała pomiędzy 10 g/100g i 16 g/100g wagi ściany komórkowej, jednakże dla jabłka osiągnęła wartość $33,52 \pm 1,33$ g/100g wagi ściany komórkowej, a dla truskawki jedynie $4,33 \pm 1,25$ g/100g wagi ściany komórkowej;
- zawartość celulozy wahała się od około 10 g/100g wagi ściany komórkowej (jabłko), aż do około 40 g/100g wagi ściany komórkowej (ogórek i melon).

Zarówno analiza HCA, jak i PCA widm podczerwieni trzech frakcji (CWM, NDF oraz ADF) dla wszystkich badanych próbek pokazała wyraźnie grupowanie wg frakcji błonnika, a w obu przypadkach otrzymane zostały trzy grupy: CWM, ADF, NDF. Dodatkowo na podstawie wektorów ładunków otrzymanych w analizie PCA możliwe było wykazanie, tak jak i w pracach H2 oraz H4, że największy wpływ na grupowanie przypadków mają liczby falowe charakterystyczne przede wszystkim dla pektyn: 1093, 1047, 1240, 951, 902 cm^{-1} oraz celulozy: 1160, 1106, 1030 cm^{-1} , a w mniejszym stopniu dla hemiceluloz: 1064 i 1041 cm^{-1} .

Natomiast biorąc pod uwagę jedynie dendrogram HCA otrzymany w wyniku analizy widm podczerwieni materiału ścian komórkowych (frakcja CWM) otrzymane zostały cztery główne grupy owoców. Po uwzględnieniu analiz chemicznych, można je podzielić na: grupę owoców o niskiej

zawartości pektyn, grupę owoców o wysokiej zawartości pektyn, grupę owoców o wysokiej zawartości frakcji hemiceluloz oraz takie, które zawierają porównywalne ilości każdego z tych polisacharydów.

Na końcu na podstawie widm podczerwieni i przy użyciu regresji metodą najmniejszych kwadratów (PLS) zostały stworzone modele kalibracyjne zawartości kwasu galakturonowego, hemiceluloz oraz celulozy. Modele te z dużą zgodnością opisywały zmiany zawartości kwasu galakturonowego oraz celulozy w składzie ścian komórkowych badanych owoców. We wszystkich przypadkach została osiągnięta bardzo dobra zgodność modelu w porównaniu z wynikami referencyjnymi ($R^2 > 0.9$), a także stosunkowo wysoka wartość $Q^2 \cong 0,70$, która wskazywała na przydatność otrzymanych modeli dla przyszłych predykcji zarówno kwas galakturonowego, jak i celulozy oraz hemiceluloz. Otrzymane zostały również niskie wartości zarówno średniego błędu kwadratowego RMSEC oraz średniego błędu kwadratowego walidacji krzyżowej RMESCV.

Metody determinacji składu ścian komórkowych można podzielić na metody chemiczne (analiza kolorymetryczna) oraz enzymatyczno-grawimetryczne. Jednakże metody te wymagają zarówno stosunkowo drogich odczynników, jak i również są obciążone dużym błędem. Dlatego, podsumowując osiągnięcia **prac H2, H4 oraz H5**, pokazane zostało, że na podstawie jedynie widm podczerwieni wyizolowanych ścian komórkowych możliwe jest opracowanie modelu kalibracyjnego, który z powodzeniem może być zastosowany w szacowaniu zawartości poszczególnych polisacharydów ścian komórkowych. Dodatkowo pokazane zostały możliwości tych metod w monitorowaniu zmian składu ścian komórkowych zarówno podczas zmian fizjologicznych, jak także do określenia zawartości i frakcji błonnika pokarmowego.

Przestrzenna analiza składu biochemicznego ścian komórkowych tkanek roślinnych metodą mikrospektroskopii Ramana (H3)

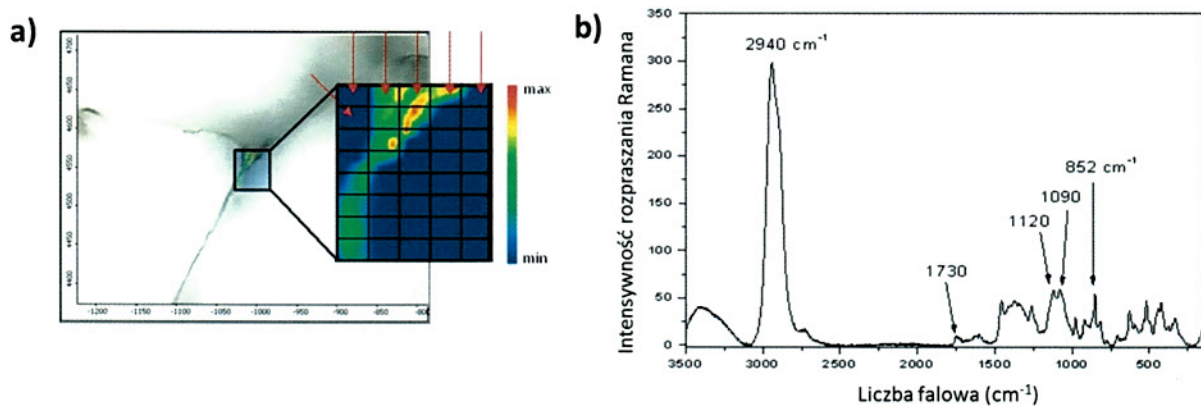
Dotychczas zostało rozwiniętych wiele metod chemicznych oraz mikroskopowych (immunocytochemia), które pozwalają na zbadanie składu ścian komórkowych, a tym samym obserwacje dynamicznych procesów w niej zachodzących. Większość tradycyjnych metod analizy budowy ścian komórkowych to analizy chemiczne, które wymagają degradacji tkanki roślinnej. Metody te mogą powodować zmiany struktury i konformacji makrocząsteczek. Dodatkowo, żadna z tych metod nie daje jednoznacznych informacji na temat rozmieszczenia, ilości oraz strukturalnego uporządkowania substancji budujących pierwotne oraz wtórne ściany komórkowe w skali mikrometrowej. Lukę tę może wypełnić użycie konfokalnego mikrospektroskopu ramanowskiego, który dostarcza informacji o składzie chemicznym oraz rozmieszczeniu poszczególnych substancji w sposób niedestrukcyjny i niewymagający dość kłopotliwego barwienia. Dotychczas techniki obrazowania ramanowskiego z powodzeniem zostały wykorzystane do obserwacji różnic pomiędzy tkankami występującymi w drewnie, czy obserwacji zmian w rozkładzie substancji aktywnych w innych roślinach (Gierlinger i in. 2010; Qin i in. 2011; Richter i in. 2011; Schmidt i in. 2009; Schmidt i in. 2010). Mapowanie ramanowskie jest jedną z najbardziej rozwijanych w ostatnich latach technik spektroskopii Ramana. Jednakże dotychczas nie obserwowano tą techniką zmian w składzie i rozmieszczeniu substancji budulcowych ścian komórkowych parenchymy owoców i warzyw.

Dlatego też, równocześnie z badaniami, które zostały opisane w pracach H1, H2, H4 i H5, rozwijane były przeze mnie zagadnienia związane z identyfikacją i lokalizacją polisacharydów w ścianach komórkowych owoców i warzyw przy pomocy mikroskopu Ramana (**praca H3**).

Metoda ta polega na zbieraniu widma Ramana w wielu, przestrzennie rozdzielnych punktach na powierzchni próbki. W wyniku, czego otrzymujemy tzw. obraz chemiczny, a jego analizę możemy przeprowadzić poprzez wybór odpowiednich pasm odpowiedzialnych za określone drgania. Dzięki

czemu otrzymujemy informacje na temat rozmieszczenia związków chemicznych na powierzchni skanowanego materiału. Zastosowanie mikroskopii ramanowskiej w badaniach materiałów pozwala otrzymać informacje o ich strukturze molekularnej oraz składzie wraz z lokalizacją poszczególnych substancji (Agarwal 2006, Gierlinger i in. 2008, Qin i in. 2011, Richter i in. 2011, Schmidt i in. 2009, Schmidt i in. 2010). Zastosowano ją z dużym powodzeniem nie tylko do określania ogólnego stanu tkanki roślinnej, ale także do analizy zmian strukturalnych polisacharydów podczas deformacji mechanicznych (Gierlinger i in. 2010).

W **pracy H3** otrzymano mapy ramanowskie 2D, które obrazowały rozmieszczenie substancji budulcowych ścian komórkowych owocu pomidora jadalnego (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Conqueror). Na rysunku 6. przedstawiony jest obraz mikroskopowy tkanki pomidora oraz mapa intensywności pasma charakterystyczne dla drgania rozciągającego C-H z maksimum przy 2940 cm^{-1} . Pasma to jest charakterystyczne dla każdego z polisacharydów obecnych w ścianie komórkowej roślin, dlatego też otrzymany obraz chemiczny Ramana jest obrazem ścian komórkowej.



Rys. 6. Obraz mikroskopowy tkanki pomidora ($300 \times 400 \mu\text{m}$) oraz obraz Ramana z rozlokowaniem polisacharydów w ścianie komórkowej ($46 \mu\text{m} \times 54 \mu\text{m}$, 2940 cm^{-1} v(CH)) (a). Średnie widmo Ramana uzyskane dla ściany komórkowej owocu pomidora (b).

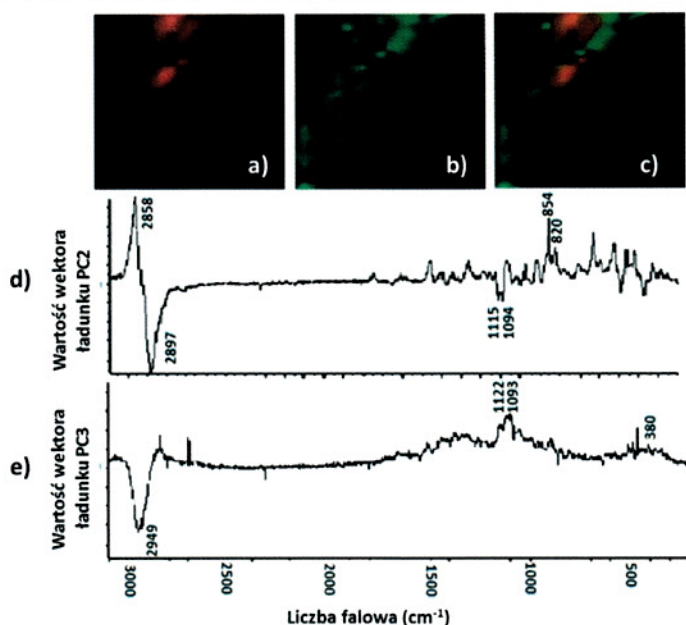
Wstępna analiza badanego materiału została wykonana metodą tzw. „single band imaging”, która polega na otrzymaniu mapy ramanowskiej dla wybranego pasma, które jest charakterystyczne dla danego polisacharydu. Pasma charakterystyczne są wybierane na podstawie widm Ramana uzyskanych dla ścian komórkowych lub poszczególnych polisacharydów. Na tej podstawie wybrano poszczególne pasma wykorzystane w dalszej identyfikacji i obrazowaniu rozlokowania poszczególnych polisacharydów:

- 2940 cm^{-1} – drganie rozciągające C-H charakterystyczne dla wszystkich polisacharydów;
- 1742 cm^{-1} – drganie rozciągające C=H w grupach estrowych pektyn i hemiceluloz;
- 1121 i 1098 cm^{-1} – symetryczne i asymetryczne drganie rozciągające wiązania glikozydowego w celulozie;
- 854 cm^{-1} – drganie C-O-C drgania szkieletowe α – anomerów w pektynach;
- 380 cm^{-1} – drganie deformujące wiązanie C-C-C w szkieletie celulozy.

W wyniku analizy widm ściany komórkowej tkanki owocu pomidora wybrano pasma 1121 i 1098 cm^{-1} oraz 854 cm^{-1} do obrazowania rozlokowania odpowiednio celulozy i pektyn. W przypadku innych pasm otrzymane mapy charakteryzowały się zbyt niskim stosunkiem sygnału do szumu.

Należy jednak pamiętać, że każdy z polisacharydów jest reprezentowany nie przez pojedyncze pasma, ale przez cały ich zestaw. Aby więc zidentyfikować dany polisacharyd na podstawie całego bądź fragmentu zakresu widmowego konieczne jest wykorzystanie wielowymiarowych metod analizy statystycznej uzyskanych map, takich jak analiza głównych składowych (PCA), wieloczynnikowy rozkład krzywej (MCR - *Multivariate Curve Resolution*) lub metoda analizy skupień k-średnich.

W pracy **H3** zostały wykorzystane metody PCA oraz MCR. W wyniku analizy składowych głównych (PCA) otrzymane zostały wykresy wektorów ładunków i wynik analizy w postaci rozlokowania głównych składników PC na 2-wymiarowym obrazie. Na podstawie analizy wektorów ładunków można było określić, które pasma mają największy wpływ na zróżnicowanie polisacharydów w próbce. Zaobserwowano, że wektory ładunków mające dodatni wpływ na wyniki odpowiadają pasmom charakterystycznym dla pektyn, natomiast wektory ładunków mające wpływ ujemny - pasmom charakterystycznym dla celulozy. Na tej podstawie wywnioskowano, że otrzymany składnik PC2 to głównie pektyny, a składnik PC3 to głównie celuloza (rysunek 7.).



Rys. 7. Wyniki i ładunki analizy PCA a) PC2 reprezentuje głównie pektyny, b) PC3 reprezentuje głównie celulozę, c) Wyniki PC2 i PC3, d) Wykres ładunków PC2, e) Wykres ładunków PC3 (praca H3).

W przypadku analizy MCR nie otrzymuje się wykresu ładunków, a nowe widma, które konstruowane są na podstawie wszystkich widm składających się na mapę ramanowską. Są to widma nowych głównych składników próbki wynikających z modelu MCR. Na podstawie pasm z tych widm można zidentyfikować komponenty próbki. W przypadku analizowanej ściany komórkowej owocu pomidora uzyskano trzy nowe komponenty, z których widmo pierwszego komponentu zostało uznane za widmo pektyn, natomiast widm komponentów 2 i 3 nie udało się jednoznacznie określić ponieważ w obu zawarte są pasma charakterystyczne zarówno dla celulozy, jak i hemiceluloz.

Podsumowując, w **pracy H2** zostały opracowane metody dotyczące zarówno otrzymywania map Ramana, jak i ich analizy takie jak metodyka przygotowania materiału roślinnego do mikroskopii Ramana, analiza map Ramana metodą „*single band imaging*” oraz użycie analiz wielowymiarowych takich jak PCA oraz MCR.

Podsumowanie

Podsumowując całość omówionych powyżej badań opublikowanych w cyklu **prac H1 – H5** należy podkreślić, że zostały opracowane nowe metody analizy polisacharydów ścian komórkowych, ich zawartości oraz struktury na podstawie widm oscylacyjnych, podczerwieni i Ramana. Badania te mają charakter podstawowy, ale z powodzeniem mogą być zastosowane do badań aplikacyjnych, wszędzie tam, gdzie istotne jest poznanie struktury polisacharydów. Do najważniejszych osiągnięć można zaliczyć:

1. opracowanie metod analizy widm Ramana, na podstawie których określona została struktura celulozy różnego pochodzenia, a także wpływ jaki mają nie-celulozowe polisacharydy na strukturę polimorficzną i alomorficzną celulozy (**praca H1**);
2. określenie na podstawie widm podczerwieni i analiz wielowymiarowych zmiany w zawartości polisacharydów ścian komórkowych owoców jabłoni (*Malus domestica* Borkh.) podczas ich fizjologicznego rozwoju (**praca H4**);
3. wykorzystano metody analizy chemometrycznej do określenia składu błonnika pokarmowego w różnych owocach i warzywach na podstawie widm podczerwieni ścian komórkowych lub ich frakcji (**prace H2 i H5**);
4. opracowano metodę przygotowania próbek tkanek owoców i warzyw do mikroskopii Ramana, metodę otrzymywania map Ramana, a także metodę ich analizy na przykładzie tkanki owocu pomidora jadalnego (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Conqueror) (**praca H3**).

Piśmiennictwo uzupełniające

- Agarwal, U.P. (2006).** Raman imaging to investigate ultrastructure and composition of plant cell walls: distribution of lignin and cellulose in black spruce wood (*Picea mariana*). *Planta* 224, 1141-1153.
- Alonso-Simon, A., Encina, A.E., Garcia-Angulo, P., Alvarez, J. M., Acebes, J.L. (2004).** FT-IR spectroscopy monitoring of cell wall modifications during the habituation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) callus cultures to dichlobenil. *Plant Science* 167, 1273-1281.
- Atalla, R. H. & Wiley, J. H.** Raman spectra of celluloses, IPC Technical Paper Series Nr 226, The Institute Of Paper chemistry, Appleton, Wisconsin 1987.
- Atalla, R. H. (1999).** The individual structures of native celluloses, In: 10th international symposium on wood and pulping chemistry, TAPPI Press; Volume 1: pp. 608-614.
- Jarvis, M.C. (2000).** Interconversion of the $I\beta$ and $I\beta'$ crystalline forms of cellulose by bending. *Carbohydrate Research*, 325, 150-154.
- Carpita, N. C. & Gibeaut D. M. (1993).** Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1-30.
- Černa, M., Barros, A. S., Nunes, A., Rocha, S. M., Delgadillo, I., Čopikova, J., Coimbra, M.A. (2003).** Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives, *Carbohydrate Polymers* 51, 383-389.
- Fellah, A., Anjukandi, P., Waterland, M.R., Williams, M.A.K. (2009).** Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR/FT-IR: Methodology optimisation and comparison with theoretical calculations. *Carbohydrate Polymers* 78, 847- 853.
- Festucci-Buselli, R.A., Otoni, W.C. & Joshi, C.P. (2007).** Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 19, 1-13.
- Gierlinger, N., Sapei, L., Paris O. (2008).** Insights into the chemical composition of *Equisetum hyemale* by high resolution Raman imaging. *Planta* 227, 969 – 980.
- Gierlinger, N., Luss, S., Konig, Ch., Konnerth, J., Eder, M., Fratzl, P. (2010).** Cellulose microfibril orientation of *Picea abies* and its variability at the micron-level determined by Raman imaging. *Journal Experimental Botany* 61, 587 – 595.
- 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.
- Gümüşkaya, E., Usta, M. & Kirci, H. (2003).** The effects of various pulping conditions on crystalline structure of cellulose in cotton linters. *Polymer Degradation and Stability* 81, 559–564.
- Kačurakova, M. & Wilson, R.H., (2001).** Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates, *Carbohydrate Polymers* 44, 291-303.
- O'Donoghue, E. M., Huber, D. J., Timpa, J. D., Erdos, G. W., Becht, J. K. (1994).** Influence of avocado (*Persea americana*) Cx-cellulase on the structural features of avocado cellulose. *Planta*, 194, 573 – 584.
- Qin, J., Chao, K., Kim, M.S. (2011).** Investigation of Raman chemical imaging for detection of lycopene changes in tomatoes during postharvest ripening. *Journal of Food Engineering* 107, 277-288.

- Richter, S., Mussig, J., Gierlinger, N. (2011). Functional plant cell wall design revealed by the Raman imaging approach. *Planta* 233, 763 – 772.
- Saxena, I.M.; Brown, R.M. (2005). Cellulose biosynthesis: Current views and evolving concepts. *Annals of Botany*, 96, 9–21.
- Schenzel, K., Fischer, St. & Brendler, E. (2005). New method for determining the degree of cellulose I crystallinity by means of FT Raman spectroscopy. *Cellulose*, 12, 223–231.
- Schmidt, M., Schwartzberg, A.M., Perrera, P.N., Weber-Bargioni, A., Carroll, A., Sarkar, A., Bosneaga, E., Urban, J.J., Song, J., Balakshin, M.Y., Capanema, E.A., Auer, M., Adams, P.D., Chiang, V.L., Schuck, P.J. (2009). Label-free in situ imaging of lignification in the cell wall of low transgenic *Populus trichocarpa*. *Planta* 230, 589-597.
- Schmidt, M., Schwartzberg, A.M., Carroll, A., Chaibang, A., Adams, P.D., Schuck, P.J. (2010). Raman imaging of cell wall polymers in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 395, 521-523.
- Šturcová, A., His I., Apperley, D. C., Sugiyama, J. & Jarvis, M. C. (2004). Structural Details of Crystalline Cellulose from Higher Plants. *Biomacromolecules*, 5, 1333-1339.
- Taiz, L., Zeiger, E. *Plant Physiology*, third ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2002
- Wakabayashi, K. (2000). Changes in cell wall polysaccharides during fruit ripening. *Journal of Plant Research* 113, 231-237.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

a) przed uzyskaniem stopnia doktora

Jestem współautorem 9 oryginalnych prac w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (wykaz poz. IIA 1–9), które ukazały się przed obroną rozprawy doktorskiej, a których sumaryczny *impact factor* zgodnie z rokiem publikacji wynosi **11.748**, a liczba punktów MNiSW **176**.

Po studiach magisterskich na kierunku fizyka podjęłam pracę na Politechnice Lubelskiej, gdzie przez rok prowadziłam badania masowo-spektrometryczne grafitu mielonego w atmosferze wodorowej pod kątem możliwości jego wykorzystania jako komórki paliwowe w silnikach wodorowych (**praca II.A1**). A także brałam udział w badaniach przy pomocy spektroskopii Mössbauera stopów metali powstałych w wyniku mielenia mechanicznego (**praca II.A2**).

Następnie zostałam słuchaczką Studiów Doktoranckich w Instytucie Fizyki na Wydziale Matematyki, Fizyki i Informatyki, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Zakładzie Fizyki Molekularnej, gdzie badania prowadziłam początkowo pod kierunkiem prof. dr hab. Leszka Michalaka, a po jego śmierci pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Bederskiego. Tematem mojej pracy doktorskiej było opracowanie nowych metod tworzenia się klasterów srebra (tj elektrochemiczne, promieniowanie UV, chemiczne, ablacja laserowa) (**prace II.A4, II.A7**). Brałam również udział w badaniach wykorzystujących spektrometrię mas z pomiarem czasu przelotu jonów jako metody do badania powstawania klasterów srebra z różnych soli srebra oraz klasterów węgla przy użyciu laserowej desorpcji/ionizacji (LDI) i desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganą matrycą (MALDI) (**prace II.A3, II.A4, II.A5, II.A7**). Dodatkowo uczestniczyłam również w innych badaniach zespołu, takich jak badania klasterów insuliny, mieszanin gazów, czy jonów metastabilnych (**prace II.A6, II.A8 oraz II.A9**).

Podczas studiów doktoranckich wzięłam udział w 4 konferencjach naukowych: ELTE 2007, ION 2008, ION 2010, IV Kongresie PTP oraz VIII Krajowa Konferencja Techniki Próżni, gdzie prezentowałam zarówno referaty, jak i brałam udział w sesjach posterowych.

W zakresie działalności dydaktycznej prowadziłam zajęcia z fizyki ogólnej i pracowni fizycznej dla kierunków inżynierskich (Politechnika Lubelska) oraz z podstaw fizyki na kierunkach przyrodniczych (Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki oraz Wydział Chemii, UMCS). Dodatkowo przygotowałam i brałam czynny udział w projektach popularyzatorskich w ramach Lubelskiego Festiwalu Nauki w 2006 i 2008, a także w Pokazach Fizyki organizowanych przez Polskie Towarzystwo Fizyczne (wrzesień 2006 i 2008).

b) po uzyskaniu stopnia doktora

Po obronieniu rozprawy doktorskiej w marcu 2010 roku, podjęłam pracę w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Zakładzie Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów w grupie dr hab. Artura Zdunka, prof. IAPAN.

Do chwili obecnej jestem współautorem w sumie **20** oryginalnych prac naukowych, w czasopiśmie znajdujących się w bazie *Journal Citation Report*, których sumaryczny *impact factor* zgodnie z rokiem publikacji wynosi **36.244**, a liczba punktów MNiSW – **511**, z czego po uzyskaniu stopnia doktora jest to **11** prac, dla których wartości te to odpowiednio IF = **24.496**, MNiSW = **335** (z wyłączeniem dorobku habilitacyjnego odpowiednio **10.884** oraz **165**). Liczba cytowań moich prac według bazy Web of Science wynosi **90** (bez autocytowań **81**), a indeks Hirscha **5**. Uczestniczyłam, bądź uczestniczę w realizacji **5** projektów finansowanych ze źródeł zewnętrznych, w tym **2** jako kierownik.

Oprócz badań opisanych w **pracach H1 – H5** brałam również udział w badaniach nad użyciem zjawiska biospeckli do monitorowania stopnia dojrzałości owoców jabłoni (**praca II.B5**) oraz badaniach nad zmianami konformacyjnymi glutenu pod wpływem błonnika pokarmowego metodami spektroskopii Ramana (**prace II.B1, II.B2, II.B3**). W tym czasie ukazały się jeszcze dwie prace związane z badaniami prowadzonymi przez mnie w czasie doktoratu (**prace II.B4 i II.B6**). W sumie jestem współautorem 6 publikacji naukowych w czasopiśmie znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (wykaz IIB 1-6), które ukazały się już po obronieniu rozprawy doktorskiej, a które nie wliczają się do osiągnięcia wymienionego w części I.

Uczestniczyłam także jako wykonawca w kilku projektach między innymi finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Iuventus Plus), czy Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (Lider). Moje zadanie w tych projektach polegało na charakterystyce spektroskopowej polisacharydów. A także w latach 2011-2015 kierowałam projektem SONATA uzyskanym z Narodowego Centrum Nauki zatytułowanym „Badania nad zmianami w strukturze mikrofibryli celulozowych i ich uporządkowania w roślinnej ścianie komórkowej oraz ich wpływ na właściwości mechaniczne ścian komórkowych w czasie rozwoju, dojrzewania i przechowywania owoców”. Podczas realizacji projektu osiągnięte zostały następujące między innymi rezultaty:

1. opracowano metodę określania zmiany zawartości polisacharydów ścian komórkowych owoców jabłoni (*Malus domestica* Borkh.) podczas ich rozwoju oraz dojrzewania (**praca H2 i H4**),
2. określono zmiany w teksturze owoców podczas ich rozwoju, a także wpływ zawartości polisacharydów ścian komórkowych na nie (**praca II.B5**),
3. określono strukturę i uporządkowanie mikrofibryli celulozowych oraz stopień krystaliczności celulozy podczas wzrostu, dojrzewania i przechowywania owoców jabłoni i jego wpływ na teksturę owoców,
4. określono wpływ nie-celulozowych polisacharydów ściany komórkowej na uporządkowanie oraz strukturę samych mikrofibryli celulozowych,
5. określono zmiany adsorpcji nie-celulozowych polisacharydów na mikrofibrylach celulozowych,
6. określono właściwości mechaniczne, a także wpływ na nie struktury i uporządkowania polisacharydów na przykładzie kompozytów celulozy bakteryjnej oraz ksyloglukanu i pektyn.

Badania prowadzone w projekcie miały charakter multidyscyplinarny i łączyły w sobie zarówno naukowe podstawy ogrodnictwa, jak i nauki o żywności, czy biologię. Celem projektu było stwierdzenie, czy struktura celulozy jest kształtowana w czasie rozwoju owocu, czy pozostaje niezmienna podczas przechowywania. Także nie bez znaczenia było określenie jaki wpływ mają właściwości mechaniczne ścian komórkowych na teksturę owoców, która jest głównym wyznacznikiem

jakości konsumenckiej owoców i warzyw. W projekcie tym podjęto się poznania zagadnienia czy struktura celulozy, jej budowa mikrokrystaliczna i jej ewentualne zmiany mają wpływ również na cechy makro, czyli mechanikę ścian komórkowych. W czasie realizacji projektu po raz pierwszy uzyskano tak kompleksowe dane, które określają wpływ zawartości oraz struktury polisacharydów ścian komórkowych na teksturę całego owocu, a także badają ich zmiany podczas rozwoju owocu. Pomędzy innymi stwierdzono największą zmienność w zawartości poszczególnych frakcji pektyn oraz samej celulozy, a niewielką zawartości hemiceluloz oraz ich wpływu na jędrność owoców, czy emisję akustyczną (jako wyznacznik właściwości sensorycznych).

Co więcej ze względu na to, że rośliny są wykorzystywane również w wielu gałęziach przemysłu stopień uporządkowania mikrofibryli celulozowych, ich stopień krystaliczności w ścianie komórkowej również mają ogromny wpływ na procesy przetwórcze i zarządzanie odpadami. Celuloza jest wyjątkowo mocnym polimerem, który ulega hydrolizie pod wpływem enzymu (celulazy) lub działania stężonych kwasów (siarkowego, azotowego). Opracowywanie optymalnych technologii hydrolizy celulozy ma na celu zwiększenie jej efektywności oraz zmniejszenie nakładanych kosztów. Dlatego też badania nad strukturą krystaliczną mikrofibryli celulozowych oraz ich uporządkowaniem w ścianach komórkowych są także istotne z punktu widzenia optymalizacji procesów przetwórczych, zagospodarowania odpadów i ich rafinacji. Podczas realizacji projektu opracowano metody ekstrakcji oraz analizy struktury celulozy, które z powodzeniem mogą być zastosowane również w skale przemysłowej np. w produkcji wypełniaczy nanocelulozowych stosowanych w kompozytach. Okazuje się, że krystaliczność celulozy jest znacznie wyższa niż początkowo się spodziewano, stąd istnieje przesłanka, że celuloza uzyskana z odpadów przetwórczych jabłek może być dalej wykorzystywana do tworzenia nanocelulozy.

W roku 2015 uzyskałam wsparcie finansowe w programie Lider (NCBR), którego realizacja rozpocznie się w styczniu 2016 r. Projekt ten zatytułowany jest „Opracowanie metody wytwarzania biodegradowalnego nanokompozytu na bazie nanocelulozy uzyskanej z odpadu owocowo-warzywnego”, a jego celem funkcjonalizacja celulozy uzyskanej z materiału odpadowego z zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego. Funkcjonalizacja celulozy nanocząsteczkami metalicznymi lub nanocząsteczkami tlenków metali ma na celu uzyskanie materiału antybakteryjnego. Następnie, tak zmodyfikowana celuloza będzie użyta jako wypełniacz w powszechnie stosowanych w opakowaniach biopolimerów, co pozwoli uzyskać bezpieczny dla zdrowia i środowiska nanokompozyt o właściwościach antybakteryjnych.

W roku 2014 odbyłam dwumiesięczny staż w Instytucie Chemii Fizycznej Uniwersytetu Friedricha Schillera w Jenie, w ramach stypendium badawczego z Niemieckiej Centrali Wymiany Akademickiej (DAAD). Przedmiotem moich badań była obserwacja przy pomocy mikroskopu Ramana zmian zachodzących w ścianie komórkowej tkanki owocu jabłoni podczas rozwoju i przechowywania. W grupie profesora Jurgena Poppa poszerzyłam swoje umiejętności, jeżeli chodzi o uzyskiwanie i analizę danych spektroskopowych: widm oraz map Ramana. Także w roku 2014 w ramach programu SIMS (Wsparcie zarządzania infrastrukturą badawczą, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju) odbyłam tygodniowe staże na Politechnice Drezdeńskiej, Fraunhofer MOEZ (Lipsk, Niemcy), Fraunhofer IZI (Instytut Terapii Komórkowej i Terapii, Lipsk, Niemcy), IBM T.J. Watson Research Center w Yorktown Heights oraz Research Center w Somers (USA), gdzie odbyłam szkolenie w zakresie zarządzania infrastrukturą badawczą.

W mojej działalności dydaktycznej i popularyzującej naukę w latach 2010-2015 pełniłam funkcję opiekuna studentów-stażystów oraz brałam udział w Lubelskim Festiwalu Nauki (LFN 2010 oraz LFN 2015). W roku 2015 projekt festiwalowy pt.: "Detektyw w kuchni" kierowany przeze mnie zdobył

nagrodę za Najciekawszy Projekt Współorganizatorów. Pełnię również funkcję pomocniczego opiekuna naukowego słuchacza Studiów Doktoranckich Instytutu Agrofizyki oraz promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim.

W latach 2010-2015 moje badania były prezentowane na łącznie **20** konferencjach głównie o zasięgu międzynarodowym, gdzie byłam autorem lub współautorem **15 wystąpień ustnych** i **15 prezentacji posterowych**. Na podkreślenie zwłaszcza zasługuje konferencja Polysaccharides-Glycoscience 2014, która odbyła się w Pradze, na której to poster prezentowany przez mgr Monikę Chylińską, a zatytułowany: *Hyperspectral imaging in identyfication the plant cell wall polysaccharides*, (autorzy: M. Chylińska, M. Szymańska-Chargot, A. Zdunek) zdobył pierwsze miejsce i został wyróżniony nagrodą ufundowaną przez Czeskie Towarzystwo Chemiczne.

Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Biofizycznego, w którym obecnie pełnię funkcję członka zarządu Oddziału Lubelskiego Polskiego Towarzystwa Biofizycznego.

Ponadto wykonałam w sumie 17 recenzji artykułów naukowych, wszystkie złożone do czasopism z listy *Journal Citation Report*, takich jak *Carbohydrate Polymers*, *Food Research International*, *Food and Bioprocess Technology*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *International Journal of Food Properties*, *Biotechnology for Biofuels*.

Zestawienie liczbowe mojego dorobku naukowego znajduje się w tabeli poniżej. Ponadto wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki dołączam do dokumentów.

Dorobek naukowy	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Razem
Oryginalne prace twórcze	9	11	20
Sumaryczny IF	11.748	24.496	36.244
Punkty MNIŚW	176	335	511
Komunikaty naukowe wygłoszone na konferencjach:			
- krajowych	2	15	17
- międzynarodowych	2	5	7
- międzynarodowych	0	10	10
Komunikaty naukowe prezentowane w formie posterów na konferencjach:			
- krajowych	7	15	22
- krajowych	1	3	4
- międzynarodowych	6	12	18
Zespoły badawcze:			
- kierowanie projektami badawczymi	0	5	5
- kierowanie projektami badawczymi	0	2	2
- wykonawstwo w projektach badawczych	0	3	3
Recenzje artykułów naukowych			
	0	17	17

Monika Szymańska-Chargot