



Poznań, 21 sierpnia 2017 r.

dr hab. Arkadiusz Ptak
Instytut Fizyki
e-mail: arkadiusz.ptak@put.poznan.pl
tel. +48 61 665-3233

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr. Arkadiusza Koziola

pt. „Analiza zmian struktury polisacharydów oraz właściwości mechanicznych ścian komórkowych owoców pod wpływem enzymów pektynolitycznych”

Niniejsza recenzja sporządzona została na zlecenie Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie. Promotorem rozprawy doktorskiej jest prof. dr hab. Artur Zdunek, Kierownik Zakładu Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów, Instytutu Agrofizyki PAN, natomiast promotorem pomocniczym – dr hab. inż. Justyna Cybulska.

Rozprawa doktorska mgr. Arkadiusza Koziola poświęcona jest zagadnieniom wpływu enzymów pektynolitycznych na właściwości strukturalne i mechaniczne ścian komórkowych owoców dwóch odmian gruszy: „Konferencja” i „Xenia”. Zmiany, zarówno strukturalne jak i mechaniczne, mierzone były głównie za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM). Pomiary wykonywano dla owoców w czasie ich fizjologicznego dojrzewania, a następnie przechowywania w warunkach chłodniczych (2°C) oraz symulowanych warunkach obrotu handlowego (20°C). Przeprowadzono również badania degradacji enzymatycznej w warunkach *in vitro*. Chociaż podobne pomiary zmian strukturalnych i mechanicznych były wykonywane za pomocą AFM dla komórek roślinnych, w tym miąższu owoców, np. truskawek, brzoskwiń czy jabłek, niewątpliwą zaletą pracy jest wykonanie systematycznych pomiarów zmian w czasie dojrzewania owoców oraz ich przechowywania, a następnie szczegółowa analiza korelacji pomiędzy wyznaczonymi parametrami strukturalnymi

zalety – rzeczywiście, jak dotąd, jest najczęściej używanym trybem pomiarowym AFM do badania materiałów pochodzenia biologicznego. Choć, w tym miejscu warto wspomnieć, że w ostatnich latach pojawił się opracowany przez firmę Bruker tzw. PeakForce Tapping, oferujący znacznie więcej możliwości niż klasyczny „tapping”, czyli tryb przerywanego kontaktu. Z lektury dalszej części rozprawy wynika, że Doktorant częściowo wykorzystywał również ten tryb obrazowania. W kolejnym podrozdziale (1.6) Autor przeglądowo opisuje zastosowanie AFM w badaniach polisacharydów i ścian komórkowych roślin, przytaczając odpowiednie źródła literaturowe.

Rozdział drugi przedstawia cel główny pracy oraz cele „częstkowe” stanowiąc najkrótszy ze wszystkich rozdziałów. Zwięzłe sformułowanie celu i jego wyeksponowanie jest niezwykle istotne, jednak, czy rzeczywiście konieczne było wyodrębnienie niespełna jednostronicowego tekstu jako osobnego rozdziału? Może lepiej byłoby umieścić opis celu w ramach Wstępu?

W rozdziale trzecim opisana została metodyka badań, obejmująca opis preparatyki, metodologii pomiarów za pomocą AFM oraz analizy statystycznej wyników. W pierwszym z podrozdziałów umieszczony został wykaz terminów pobierania próbek owoców dla obu odmian gruszy. Wspomniane zostało, że każda partia gruszek składała się z co najmniej dziesięciu owoców. Niestety nie znalazłem informacji, ile konkretnie próbek było badanych; czy z każdego owocu jedna, czy więcej? Czy taka sama liczba próbek była wykorzystana do oznaczania kwasu D-galakturonowego, aktywności enzymatycznej oraz pomiarów za pomocą AFM?

Podrozdział 3.8 zawierający opis pomiarów AFM jest szczególnie istotny z metodologicznego punktu widzenia. W ilościowych pomiarach tzw. spektroskopii sił, prawidłowe określenie wartości siły jest kluczowe. W tym celu należy precyzyjnie wyznaczyć współczynnik sprężystości mikrobełki. Metoda, którą wybrał Doktorant jest prosta, ale obarczona dużą niepewnością, gdyż opiera się na dyskusyjnym założeniu o równości masy nominalnej z rzeczywistą masą mikrobełki. Znacznie precyzyjniejszą metodą wyznaczania współczynnika sprężystości mikrobełki jest tzw. metoda belki referencyjnej. Kwestię tę można przedyskutować szerzej podczas publicznej obrony.

W opisie obrazowania topograficznego znajduje się informacja o użytej w pomiarach sondzie SCANASYST-AIR. Czy nie doszło tu do pomyłki? Sonda ta bowiem, wykorzystywana jest głównie do pomiarów w technice spektroskopii sił lub w PeakForce Tapping, a nie

XY bez uwzględnienia wielkości ostrza skanującego. Jeśli intencją Autora był pomiar całkowitej szerokości molekuł z uwzględnieniem łańcuchów bocznych (czego nie można wywnioskować z pomiaru wysokości), to należało: po pierwsze, uwzględnić wielkość ostrza, a po drugie, rozróżnić i zdefiniować dwie szerokości, tj. łańcucha głównego i całkowitą z łańcuchami bocznymi. O trzeciej nieścisłości wspomniałem już wcześniej, dotyczy określenia niepewności pomiaru. W przypadku wysokości struktur podawane jest odchylenie standardowe, natomiast w przypadku długości – błąd standardowy.

W podrozdziale 4.2 opisane zostały zmiany aktywności enzymatycznej poligalakturonazy i pektynometyloesterazy oraz zawartości kwasu D-galakturonowego w ścianach komórkowych owoców podczas ich dojrzewania i przechowywania pozbiornego. Doktorant szczegółowo opisuje zarejestrowane zmiany i wyjaśnia je w kontekście aktualnej wiedzy na ten temat. Szczególnie intrygujący jest jeden z wyników, który akurat nie został bezpośrednio wyjaśniony; a mianowicie, dlaczego aktywność poligalakturonazy w przypadku obu odmian gruszy (rys. 27) jest większa dla owoców przechowywanych w warunkach chłodniczych (2°C) niż w warunkach obrotu handlowego (20°C)? Biorąc pod uwagę tylko czynnik temperaturowy powinno być odwrotnie.

W podrozdziale 4.3 Doktorant przedstawił zmiany sztywności ścian komórkowych oraz zmiany jędrności owoców podczas ich dojrzewania i przechowywania pozbiornego. Omówienie korelacji występującej pomiędzy obu wielkościami ma miejsce w podrozdziale 4.5, w którym przedstawiona została macierz korelacji wszystkich wyznaczonych wielkości (tabela 7). Co ciekawe, uzyskane korelacje pomiędzy modułem Younga ścian komórkowych a jędrnością owoców są zupełnie różne dla obu odmian gruszy. Dla odmiany „Xenia” uzyskano istotną dodatnią korelację (0,52), natomiast dla odmiany „Konferencja” – nieistotną statystycznie korelację ujemną (-0,23). Autor dopatruje się przyczyn różnicy w makroskopowym charakterze jędrności – parametru związanego z właściwościami wielu grup strukturalnych owocu i tym samym wieloma procesami zachodzącymi w tych strukturach. Słusznie zauważa, że sztywność ścian komórkowych mierzona jest dla małych odkształceń w teście indentacji (100 nm), co nie odzwierciedla dużych nieliniowych odkształceń w teście przebiccia mierzącym jędrność. W kolejnym podrozdziale Doktorant opisuje relacje między naturalnymi zmianami biochemicznymi i mechanicznymi w ścianie komórkowej, często odnosząc się do danych literaturowych, co jest niewątpliwą zaletą tej części rozprawy. Czy jednak Doktorant nie zastanawiał się, by podzielić obliczane korelacje

usprawiedliwienie ostatniego przypadku można podać fakt, że jest to wynik bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego, a terminologia nie jest jednoznacznie ustalona nawet wśród osób od lat zajmujących się techniką AFM.

Przydarzyły się również techniczne błędy redakcyjne, których kilka najważniejszych, z obowiązku recenzenta, przytaczam:

- na rys. 30 nie ma rysunków c i d, które są opisane w podpisie tego rysunku (prawdopodobnie chodziło o rys. 31 a, b);

- na wielu rysunkach (np. rys. 47, 54, 70) pojawiają się oznaczenia literowe od „a” do „h”, ale nie można znaleźć ich objaśnień ani w podpisie rysunków, ani w tekście rozprawy;

- na str. 70 inna jest wartość korelacji dla odmiany „Xenia” w tekście (-0,23), a inna w tabeli (0,52).

Przytoczone nieścisłości oraz usterki, a także zawarte, podczas omawiania poszczególnych rozdziałów rozprawy, krytyczne uwagi i komentarze, nie umniejszają znacząco wartości rozprawy, którą oceniam wysoko. O dużym znaczeniu uzyskanych wyników świadczy również fakt ich opublikowania w postaci trzech artykułów (w jednym Doktorant był pierwszym autorem) w uznanych międzynarodowych czasopismach specjalistycznych. Ponadto w rozprawie pojawiają się odwołania do dwóch innych prac z udziałem Doktoranta.

Podsumowując, Doktorant jasno przedstawił problem naukowy i sformułował cel badawczy, który potrafił z sukcesem zrealizować, wykazując się przy tym dobrym opanowaniem warsztatu badawczego oraz interdyscyplinarną wiedzą teoretyczną. Poprawnie zastosował metody eksperymentalne, w szczególności oparte na technice AFM, uzyskując obszerny zestaw wyników pomiarowych. Następnie starannie je przeanalizował stosując typowe metody analizy statystycznej. W opisach poruszanych zagadnień oraz dyskusji wyników odnosił się do szeroko i trafnie wybranych źródeł literaturowych. Ostatecznie, poprawnie sformułował wnioski mające uzasadnienie w wynikach eksperymentalnych.

Biorąc pod uwagę powyższą ocenę stwierdzam, że rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim przez „Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym” i wnoszę o dopuszczenie mgr. Arkadiusza Kozioła do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Arkadiusz Płot