

Warszawa, 25.08.2017

Dr hab. Ewa Jakubczyk, prof. SGGW
Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji
Wydział Nauk o Żywności
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

RECENZJA

pracy doktorskiej **mgr Arkadiusza Koziola**

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

Pracę wykonano pod kierunkiem prof. dr hab. Artura Zdunka –promotora rozprawy i dr hab. Justyny Cybulskiej- promotora pomocniczego w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie

Przedłożona do recenzji praca doktorska obejmuje szeroki zakres badań charakteryzujących zmiany zachodzące w ścianach komórkowych parenchymy owoców gruszy podczas ich dojrzewania i przechowywania. Istotnym czynnikiem wpływającym na zmiany jędrności i właściwości mechanicznych tkanki mięksiszowej oraz sztywności ścian komórkowych jest aktywność enzymów tkanki roślinnej. Stopień i rodzaj degradacji polisacharydów, które są istotnym budulcowym składnikiem tkanki owoców determinują właściwości strukturalne i teksturalne owoców. Jędrność to kluczowy wyróżnik w ocenie jakości owoców, zarówno przez konsumentów, jak i przetwórców w przemyśle rolno-spożywczym. W pracy doktorskiej mgr Arkadiusza Koziola podjęto innowacyjne badania zmierzające do określenia relacji pomiędzy zmianami w strukturze ściany komórkowej a mięknięciem tkanki owoców w czasie. Analiza zmian struktury ścian komórkowych oraz ich sztywności została przeprowadzona przy wykorzystaniu precyzyjnej techniki mikroskopii sił atomowych AFM, która jest metodą powszechnie stosowaną w ocenie struktury surowców roślinnych. W recenzowanej pracy doktorskiej obserwowano nanostruktury polisacharydów ścian komórkowych, które pobrano z różnych faz dojrzałości

owoców gruszy, co jest nowym podejściem w wykorzystaniu AFM. Tak więc, podjęcie przez mgr Arkadiusza Koziola tematu analizy działania enzymów pektynolitycznych i ich wpływu na właściwości mechaniczne, biochemiczne i strukturalne ściany komórkowej parenchymy owoców gruszy, tak z punktu widzenia naukowego jak i praktycznego, jest uzasadnione, ważne i aktualne.

Przedstawiona do recenzji dysertacja zawarta jest na 110 stronach maszynopisu wraz z 70 rysunkami oraz 11 tabelami. Zamieszczone w pracy tabele i rysunki prawidłowo prezentują wyniki badań i stanowią materiał do dyskusji. W pracy cytowanych jest 198 pozycji literatury głównie anglojęzycznej. Opracowanie ma charakter rozprawy naukowej, zredagowanej w formie typowej dla prac eksperymentalnych i obejmuje wstęp, przegląd literatury, cel pracy, metodykę badań, omówienie i dyskusję wyników, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię. W pracy zamieszczono również streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz najważniejszych skrótów i oznaczeń. Z formalnego punktu widzenia struktura pracy – tj. podział materiału na rozdziały, ich sekwencja i wzajemne proporcje nie budzą zastrzeżeń. Prezentacja wyników, a także ich dyskusja są przedstawione w sposób przejrzysty a uzyskane dane opisano poprawnym językiem, stosując słownictwo charakterystyczne do tego typu opracowań naukowych.

Dysertację otwiera krótkie wprowadzenie podkreślające istotność badań ścian komórkowych pod względem ich właściwości mechanicznych i strukturalnych oraz czynników wpływających na te cechy w odniesieniu do właściwości funkcjonalnych roślin. W tym rozdziale Autor prezentuje przyczyny, które skłoniły Go do sformułowania i podjęcia tego tematu badań.

Część teoretyczna rozprawy zawiera 6 podrozdziałów, w których omówiono najważniejsze zagadnienia dotyczące problematyki pracy. Autor w pierwszym z podrozdziałów krótko przedstawił budowę komórki roślinnej oraz funkcje jakie pełnią poszczególne jej elementy. W kolejnym rozdziale Doktorant szczegółowo omówił budowę i funkcje pierwotnej ściany komórkowej ze szczególnym uwzględnieniem polisacharydowych składników ścian: celulozy, hemicelulozy oraz pektyn. Następnie scharakteryzowano funkcje strukturalne i mechaniczne jakie pełnią w ścianie komórkowej polisacharydy. Szczególną uwagę zwrócono na budowę i funkcję enzymów wstępujących w ścianie komórkowej. Ostatnim poruszonym zagadnieniem w przeglądzie literatury była mikroskopia sił atomowych z opisem metody oraz jej zastosowaniem w badaniach polisacharydów i ścian

komórkowych roślin. W tej części pracy Autor przekrojowo przedstawił zakres prac naukowych poświęconych wykorzystaniu AFM w badaniach tkanki roślinnej, uwzględniając wyniki własnych badań strukturalnych dotyczących nasion tamaryndowca i tkanki marchwi. Zagadnienie to zostało opisane w interesujący sposób, wskazując na szeroką znajomość piśmiennictwa oraz stanowi dobrą narrację do zaplanowanych eksperymentów w pracy doktorskiej.

Zasadniczy cel pracy został określony czytelnie jako analiza zmian nanostruktury pektyn oraz zmian właściwości mechanicznych ścian komórkowych wywołanych przez enzymy pektynolityczne. Natomiast wymienione w tej części cele szczegółowe są raczej punktami odnoszącymi się do zakresu pracy.

Materiał badawczy, metody eksperymentalne, analityczne stosowane w pracy zostały opisane w rozdziale Metodyka badań. Układ rozdziału jest przejrzysty i w przeważającej części zawiera wszystkie niezbędne informacje. Szczegółowe uwagi zamieszczono w oddzielnej sekcji recenzji.

Rozdział 4 przedstawia wyniki uzyskanych eksperymentów, których część została opublikowana w uznanych czasopismach listy JCR: Food and Bioprocess Technology, Planta oraz Carbohydrate Polymers. W tych trzech artykułach, Doktorant jest pierwszym autorem w jednym z nich a dwóch pozostałych publikacjach jest drugim autorem.

W pierwszej części omówienia wyników scharakteryzowano nanostrukturę różnych frakcji polisacharydów wyekstrahowanych ze ścian komórkowych owoców gruszy odmiany „Konferencja” i „Xenia” bezpośrednio po zbiorze. Przeprowadzono analizę obrazów uzyskanych za pomocą mikroskopu sił atomowych. Podczas badań stwierdzono istotne różnice w kształcie i wymiarach oraz rozgałęzieniu molekuł różnych frakcji polisacharydów. W przypadku pektyn rozpuszczalnych w wodzie (WSP) dominowały molekuły owalne, często zagregowane, natomiast pektyny rozpuszczalne w chelatorze wapnia (CSP) charakteryzowały długimi rozgałęzionymi łańcuchami. W pracy uzyskano charakterystyczne obrazy molekuł frakcji pektyn rozpuszczalnych w węglanie sodu (DASP), strukturę taką obserwowano w przypadku innych surowców roślinnych. Warty podkreślenia jest fakt, że w publikacji, której Doktorant był współautorem taką usieciowaną strukturę molekuł frakcji DASP zlokalizowano po raz pierwszy w materiale pochodzącym ze ściany komórkowej tkanki marchwi. W dalszej części pracy określono wymiary molekuł frakcji polisacharydów pochodzących z obu odmian owoców gruszy. Zauważono różnice w wysokości molekuł, nie

tylko pomiędzy poszczególnymi frakcjami polisacharydów ale również pomiędzy odmianami. W mojej opinii wyliczanie średniej wartości poszczególnych wielkości geometrycznych, w przypadku gdy rozkłady tych wielkości mają charakter raczej logarytmiczny z przesunięciem maximum w lewo jest obarczone dużym błędem ze względu na zróżnicowanie wielkości molekuł w rozkładzie. Właściwszym podejściem, które zaprezentował również Doktorant jest podanie wartości danego parametru dla maksimum takiego rozkładu.

W pracy określono podstawowe wielkości biochemiczne w tym aktywność enzymatyczną, której wartości w przypadku poligalakturonazy w próbie kontrolnej były wyższe dla odmiany „Xenia”.

W kolejnej części dysertacji analizowano zmiany aktywności enzymatycznej (poligalakturonazy PG i pektynometyloesterazy PME) oraz zawartości kwasu galakturonowego w ścianach komórkowych owoców podczas ich dojrzewania i przechowywania pozbiornego. Wyniki wskazywały na różnice w aktywności dwóch analizowanych enzymów w okresie przechowywania chłodniczego, aktywność PME malała a PG rosła w czasie przechowywania owoców. Interesujące są zmiany aktywności PG w czasie przechowywania owoców odmiany „Xenia” w warunkach chłodniczych, do 85 dnia dochodzi do spadku aktywności enzymu, po dalsze przechowywanie powoduje wzrost aktywności, w czym można upatrywać przyczyn tak istotnych zmian aktywności PG w czasie. W przypadku wszystkich frakcji pektyn obserwowane zmiany zawartości kwasu galakturonowego w czasie przebiegały zgodnie z trendem obserwowanym przez innych autorów.

Ważnym etapem badań było określenie zmian sztywności i jędrności owoców podczas dojrzewania i przechowywania. W okresie przedzbiornym sztywność ścian malała do terminu zbioru po czym rosła w okresie przechowalniczym, natomiast jędrność w analizowanym przedziale czasu malała. Badanie korelacji wykazało brak zależności między jędrnością owoców a modułem Younga. Autor, ten brak korelacji tłumaczył zastosowaniem innej skali pomiarowej tych wielkości. Mierzono jędrność tkanki, a w przypadku sztywności pomiar obejmował małe odkształcenia jedynie ściany komórkowej. W mojej opinii w przypadku planowania kolejnych eksperymentów warto określić moduł Younga w teście mechanicznym odkształcając tkankę.

W trakcie dojrzewania i przechowywania owoców analizowano wymiary geometryczne molekuł różnych frakcji i pomiędzy nimi dostrzeżono różnice. Doktorant podjął próbę interpretacji zmian wysokości, długości molekuł poszczególnych frakcji w okresie przedzbiorczym i w czasie przechowywania. Ta część pracy jest w mojej opinii trudna do analizy ze względu na brak wyraźnego trendu zmian wielkości geometrycznych i ich skokowy charakter.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant opisał model przejścia owoców ze stanu wysokiej twardości i chrupkości do stanu miękkości w okresie przechowywania.

Ostatnia bardzo interesująca część pracy charakteryzuje wyniki uzyskane w eksperymencie *in vitro* degradacji enzymatycznej wyekstrahowanego materiału ścian komórkowych z wykorzystaniem czterech enzymów i różnych stężeń. Następnie porównano działanie enzymów w ścianie komórkowej w warunkach *in vitro* i *in vivo*. W tym tej części pracy Doktorant przeprowadził szczegółową analizę wyników i szeroką dyskusję w odniesieniu do danych literaturowych. W pracy wykazano, że w warunkach *in vitro* usuwanie poszczególnych frakcji pektyn ze ścian komórkowych powoduje spadek modułu Younga, natomiast podczas dojrzewania owoców (eksperyment *in vivo*) sztywność rośnie. To różne działanie enzymów Doktorant tłumaczył m.in. brakiem wpływu ciśnienia turgorowego w eksperymencie *in vitro*.

Warto podkreślić, że prezentacja wyników szerokiego spectrum eksperymentów jest przejrzysta a opis zwięzły i logiczny, zaś dyskusja skupia się na istotnych wynikach. Dysertację zamyka podsumowanie i czytelne wnioski odnoszące się do przeprowadzonych badań.

W czasie czytania pracy nasunęły mi się pewne uwagi, spostrzeżenia oraz pytania które podaję poniżej:

- Tabela 1 przedstawia etapy eksperymentu i terminy pobierania owoców, termin 0 scharakteryzowano jako optymalny termin dojrzałości fizjologicznej owoców gruszy, w jaki sposób go określano?
- Ile wykonano serii pomiarowych- czy badano owoce tylko z jednego sezonu zbioru?
- W metodyce przy opisie metod analitycznych, w większości przypadków nie podano liczby powtórzeń poszczególnych oznaczeń.
- We wzorach 5 i 6 nie podano jednostek parametrów.

- Ze względu na badania dwóch odmian owoców gruszy w mojej opinii w celu pełnej charakterystyki surowca właściwe byłoby również określenie zawartości wody, kwasowości ogólnej czy ekstraktu.
- Dlaczego w przypadku niektórych parametrów wartości średnie podawano z odchyleniem standardowym a inne z błędem standardowym np. średnią długość frakcji WSP podawano z odchyleniem standardowym a już jej długość z błędem standardowym (Tabela 5).
- W tabeli 5 błędnie wprowadzono indeksy oznaczeń, przy zaproponowanym zapisie nie wiadomo jaki parametr jest w nawiasach bez indeksu. Prawidłowy zapis jest zamieszczony w publikacji Doktoranta z 2017 w Carbohydrate Polymers.
- W rozdziale analiza statystyczna wyników podano, że przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji, co było tym czynnikiem. W publikacjach na które powołuje się Doktorant wynika, że analizowano wpływ czasu dojrzewania/przechowywania, czy tylko ten czynnik analizowano. Przy tym planie eksperymentu możliwe było zastosowanie dwuczynnikowej analizy wariancji przy czynnikach odmiana owoców oraz czas dojrzewania/przechowywania.
- Na rysunkach 30 i 31 umieszczono symbole określające grypy jednorodnie badanych parametrów, taki sposób prezentacji danych obrazuje różnice statystycznie istotne pomiędzy średnimi. Szkoda, że Autor nie zastosował tej formy prezentacji danych na innych rysunkach.
- Wnioski 1, 2 i 3 są stwierdzeniami i mają charakter informacyjny.

Podsumowanie

Oceniana dysertacja mgr Arkadiusza Koziola pt. „Analiza zmian struktury polisacharydów oraz właściwości mechanicznych ścian komórkowych owoców pod wpływem enzymów pektynolitycznych” jest kompleksowym, wyróżniającym się wysokim poziomem opracowaniem naukowym. Praca stanowi oryginalne opracowanie, które w mojej opinii przyczynia się do rozszerzenia stanu wiedzy z zakresu badań struktury ścian komórkowych materiałów roślinnych i umożliwia powiązanie wyników tych badań z właściwościami biochemicznymi i mechanicznymi. Uzyskane wyniki mają istotny potencjał aplikacyjny w tworzeniu wielkoskalowych modeli tkanki roślinnej czy w kontrolowaniu jakości owoców podczas przechowywania. Zaplanowanie eksperymentu, jego realizacja i umiejętna

interpretacja świadczą o dużym doświadczeniu badawczym mgr Arkadiusza Koziola i jego dojrzałości naukowej. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, publikacji części wyników badań przez Doktoranta w renomowanych czasopismach.

Zgłoszone do pracy uwagi i zastrzeżenia nie umniejszają jej wartości i mają w dużej mierze charakter dyskusyjny. W mojej opinii praca pt. „Analiza zmian struktury polisacharydów oraz właściwości mechanicznych ścian komórkowych owoców pod wpływem enzymów pektynolitycznych”, wykonana przez mgr Arkadiusza Koziola, spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim na stopień naukowy doktora zgodnie z *Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki*. Stawiam wniosek o dopuszczenie pana mgr Arkadiusza Koziola do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

