

Streszczenie

Słowa kluczowe: ściana komórkowa, pektyny, pektynazy, mikroskopia sił atomowych, struktura polisacharydów, właściwości mechaniczne.

Ściana komórkowa jest najbardziej zewnętrzną warstwą komórki roślinnej. Pektyny, obok celulozy i hemiceluloz, są główną grupą związków polisacharydowych tworzących tą strukturę. Pektyny są odpowiedzialne za utrzymanie i regulację parametrów mechanicznych wewnątrz ściany komórkowej. Modyfikacje pektyn powodowane przez enzymy podczas rozwoju owocu są jednymi z najważniejszych procesów prowadzących do zmiany jędrności i tekstury tkanki mięksiszowej oraz sztywności ściany komórkowej.

Celem tej pracy była analiza zmian strukturalnych, mechanicznych i biochemicznych, jakie zachodzą w ścianach komórkowych owoców gruszy (odmian „Konferencja” i „Xenia”), w wyniku działania naturalnych enzymów podczas fizjologicznego dojrzewania i następnie przechowywania w warunkach chłodniczych (2°C) oraz symulowanych warunkach obrotu handlowego (20°C). Wykonano także analizę powyższych parametrów dla przypadku modelowej degradacji enzymatycznej na wyizolowanym materiale ścian komórkowych w warunkach *in vitro*, w celu porównania indukowanych sztucznie zmian z procesami zachodzącymi naturalnie.

Mikroskop sił atomowych (AFM) posłużył do rejestracji obrazów topograficznych frakcji polisacharydów oraz krzywych siłowych materiału ścian komórkowych do wyznaczenia modułu Younga. Wykonano także test przebicia w celu wyznaczenia jędrności owoców. Wyniki te zestawiono z oznaczeniami wielkości biochemicznych, takimi jak zawartość kwasu galakturonowego (GalA) oraz aktywność enzymatyczna poligalakturonazy (PG) i pektynometyloesterazy (PME).

Molekuły polisacharydów z kolejno ekstrahowanych frakcji wykazują pewne charakterystyczne struktury. Frakcja pektyn rozpuszczalnych w wodzie (WSP) charakteryzuje się występowaniem małych i owalnych molekuł, często licznie zagregowanych. Pektyny rozpuszczalne w chelatorze wapnia (CSP) tworzą długie i rozgałęzione łańcuchy. Molekuły frakcji pektyn rozpuszczalnych w alkaliach (DASP) wykazują zdolność do samoorganizacji, sieciowania i regularnego ułożenia na powierzchni miki.

W przypadku wymuszonej degradacji enzymatycznej *in vitro* z użyciem pektynaz, cząsteczki pektyn ekstrahowanych za pomocą czynnika chelatującego wykazały strukturę podobną do frakcji DASP z natywnych ścian komórkowych. Podobne jakościowo zmiany powodowane były przez endo-poligalakturonazę (endo-PG) i liazę pektynową (PL). W pracy pokazano również wynik działania enzymu egzo-glukanazy (ExGase), który powodował degradację ksyloglukanu (XG) we frakcji hemicelulozy.

Moduł Younga ścian komórkowych obu odmian owoców zmniejszył się w ciągu 30 dni okresu dojrzewania przedzbiorczego z $3,2 \pm 1,8$ MPa do $1,1 \pm 0,7$ MPa dla „Konferencji” oraz z $1,9 \pm 1,2$ MPa do $0,2 \pm 0,13$ MPa dla „Xeni”. Podczas pozbiorczego przechowywania w chłodni przez 130 dni moduł Younga wzrósł dla ścian komórkowych obu odmian gruszek. Wynik ten pokazał brak prostej korelacji modułu Younga ścian komórkowych z jędrnością owoców, która w sposób ciągły maleje w czasie trwania eksperymentu. Sekwencyjne usuwanie frakcji pektyn ze ścian komórkowych zdegradowanych przez enzymy pektynolityczne w warunkach *in vitro* spowodowało zmniejszenie ich sztywności w porównaniu do próbek kontrolnych.

Abstract

Keywords: cell wall of plant, pectins, pectinases, atomic force microscopy, polysaccharide structure, mechanical properties.

The most outer layer of a plant cells is a primary cell wall. Pectins, beside cellulose and hemicellulose are general compound of polysaccharides forming the primary cell wall. Pectins' role is maintaining and regulation of mechanical parameters within cell wall. Metabolism of this polysaccharides group during ripening and general development of fruit is one of the most important processes which reduce firmness and change a texture of fruit parenchyma and stiffness of cell wall as well.

Aim of this thesis was analysis of structural, mechanical and biochemical changes, which occur in cell wall of pear (cvs. "Conference" and "Xenia"), as a result of fruit development and postharvest storage in cold room (2°C) and shelf-life conditions (20°C). The same analysis was used in case of specific pectinolytic enzymes treatment of cell wall material under *in vitro* condition to comparison of natural and imposed enzymatic modification.

The atomic force microscope (AFM) was used to record topographical images of each polysaccharides fraction and force curves from cell wall material to obtaining Young's modulus. Puncture test was made as well to record firmness of fruit. These results were combined with biochemical values as galacturonic acid (GalA) content and polygalacturonase (PG) and pectin methylesterase (PME) activity.

Polysaccharide molecules from fractions of sequential extraction were arranged in some characteristic structures. Water pectin soluble fraction (WSP) is characterized by small and oval-shaped molecules also numerously aggregated. Pectins dissolved in chelating agent (CSP) form long and branched chains. Molecules from fraction of diluted alkali soluble pectin (DASP) have ability of self-organizing, crosslinking and forming regular arrangement on the mica surface.

Pectinases, in case of imposed *in vitro* enzymatic degradation, caused reorganization of CSP molecules into DASP-like arrangement from native condition cell walls. Modifications in each fraction were apparent also after treatment by specific enzymes: endo-polygalacturonase (endo-PG) and pectate lyase (PL). In this study, also the result of exo-glucanase (ExGase) action on the xyloglucan (XG) from hemicellulose fraction was shown.

Young's modulus of cell wall in case of both fruit cultivars was reduced in period of 30 days of fruit development from 3.2 ± 1.8 MPa to 1.1 ± 0.7 MPa for cv. "Conference" and from 1.9 ± 1.2 MPa to 0.2 ± 0.13 MPa for cv. "Xenia". The Young's modulus was increasing during postharvest storage in cold room for 130 days for cell walls in case of both pear cultivars. This result indicated the lack of straightforward correlation of Young's modulus and fruit firmness, which was steadily decreasing during experiment period. Sequential removing of pectin fractions from cell walls treated by pectinolytic enzymes *in vitro* conditions caused the stiffness reduction in comparison to control samples.