

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr Adrianny Kaczmarska-Król**

**pt. „Mechaniczna rola ramnozy w pektynach ekstrahowanych za pomocą słabych
alkaliów (DASP) z roślinnych ścian komórkowych”**

wykonanej w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego

Polskiej Akademii Nauk

pod kierunkiem prof. dr. hab. Artura Zdunka

Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Oceniana rozprawa doktorska dotyczy problematyki związanej z analizą i modyfikacją struktury pektyn rozpuszczalnych w słabych alkaliach (DASP) bogatą w ramnogalakturnon I (RG-I) pozyskanych z surowca roślinnego w aspekcie właściwości fizykochemicznych i mechanicznych. Poruszane w rozprawie zagadnienia posiadając charakter interdyscyplinarny mieszczą się w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo. Mimo, że prace eksperymentalne zostały ograniczone do stosunkowo wąskiego obszaru dotyczącego pektyn materiału pochodzącego z jabłek i marchwi, to wnioski o charakterze poznawczym i użytkowym mogą być wykorzystane w zrozumieniu zjawisk zachodzących w tkankach owoców i warzyw w czasie ich wegetacji i przechowywania, przy optymalizacji procesów technologicznych w przetwórstwie owocowo-warzywnym, a także w projektowaniu naturalnych kompozytów o określonych właściwościach mechanicznych.

Rozprawa doktorska Pani mgr Adrianny Kaczmarskiej-Król została przygotowana w oparciu o cykl 4 spójnych tematycznie publikacji oraz badania uzupełniające, których wyniki nie zostały opublikowane. Przedstawione do oceny opracowanie zostało podzielone na 13 rozdziałów uwzględniających wstęp, hipotezę badawczą i cele rozprawy, materiał i metody, omówienie wyników przedstawionych w publikacjach stanowiących spójny tematycznie cykl, omówienie wyników przedstawionych w badaniach uzupełniających, podsumowanie i wnioski, teksty 4 spójnych tematycznie publikacji z materiałami uzupełniającymi odnoszącymi się do dwóch z tych publikacji, bibliografię, oświadczenie współautorów i

życiorys naukowy Doktorantki. Należy przy tym zauważyć, że rozdział 5, będący omówieniem wyników badań uzupełniających, został utworzony z dwóch autonomicznych podrozdziałów zawierających elementy charakterystyczne dla publikacji naukowych, czyli wstęp, metodykę, wyniki i podsumowanie.

Rozdziały są ze sobą właściwie powiązane i występują w odpowiedniej kolejności. Całość opracowania zawarta jest na 149 ponumerowanych stronach maszynopisu. Doktorantka powołała się na 152 pozycje bibliografii, głównie anglojęzyczne, dobrane adekwatnie do zakresu rozprawy. Około 20% cytowanych prac stanowią pochodzące z ostatnich pięciu lat publikacje naukowe dotyczące problematyki poruszanej w ocenianej rozprawie, co świadczy o bardzo gruntownym prześledzeniu stanu wiedzy z uwzględnieniem szeregu najnowszych osiągnięć, aby zapewnić nowatorski charakter opracowania, które jest napisane zrozumiałym i poprawnym językiem naukowym z prawidłowym umieszczeniem odnośników do literatury.

Suma punktów MNiSW wynosząca 680 przy łącznej wartości wskaźnika $IF=33,4$ potwierdza bardzo dużą wartość naukową ocenianego cyklu publikacji, które ukazały się w ciągu ostatnich dwóch lat, co świadczy o aktualności osiągnięć naukowych przedstawionych w rozprawie doktorskiej i znacznym dorobku Kandydatki mimo krótkiego stażu naukowego.

Ocena merytoryczna

We wstępie Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat znaczenia pektyn w roślinach i wytwarzanych biomateriałach oraz ich budowy i klasyfikacji z uwzględnieniem złożonych mechanizmów o podłożu fizyko-chemicznym, które decydują o ich właściwościach ulegających zmianie w trakcie wegetacji oraz przetwarzania materiału roślinnego. Wykorzystała przy tym aktualne doniesienia naukowe, aby nie tylko dokonać wprowadzenia w zagadnienia związane z rozprawą doktorską, ale przede wszystkim, aby uzasadnić potrzebę wykazania, że właściwości mechaniczne materiałów zawierających pektyny rozpuszczalne w słabych alkaliach można kształtować poprzez zmianę zawartości kluczowego składnika podstawowej frakcji strukturotwórczej. Przedstawiony w ten sposób problem badawczy pozwolił prawidłowo sformułować hipotezę bezpośrednio nawiązującą do głównego celu pracy, czyli „oceny wpływu ramnozy oraz składu monosacharydowego pektyn rozpuszczalnych w słabych alkaliach (DASP) na właściwości sieciujące tej frakcji, a tym samym na właściwości mechaniczne materiałów, w których są obecne”. Realizacja tego celu odbyła się w ramach 4 zadań badawczych stanowiących cele szczegółowe, które zostały

osiągnięte w rezultacie badań opisanych w 4 pozycjach tworzących jednotematyczny cykl publikacji oraz dwóch niezależnych badań uzupełniających.

Część metodyczna rozprawy została przedstawiona bardzo starannie z dokładnym opisem dotyczącym pochodzenia materiału roślinnego i dalszym postępowaniem w celu pozyskania próbek polegającym na izolacji ścian komórkowych, ekstrakcji sekwencyjnej pektyn zmierzającej do uzyskania frakcji pektyn rozpuszczalnych w słabych alkaliach (DASP) oraz ich enzymatycznej modyfikacji. Należy także docenić opanowanie przez Doktorantkę szerokiego spektrum metod pomiarowych umożliwiających wyznaczenie zawartości monosacharydów i kwasów uronowych, oznaczenie stopnia metylacji, analizę obrazów zarejestrowanych przy użyciu mikroskopu sił atomowych i widm uzyskanych dzięki spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera, a także właściwości reologiczne w oparciu o badania z wykorzystaniem reometru hybrydowego.

Przeprowadzenie przez Doktorantkę szeregu testów dotyczących właściwości fizykochemicznych surowca roślinnego świadczy nie tylko o dużej dociekliwości zmierzającej do wszechstronnego poznania jakości badanego materiału, ale także o opanowaniu bogatego warsztatu badawczego oraz wiedzy z zakresu fizyki, chemii i biologii, czyli tych nauk podstawowych, które są wykorzystywane przy dokonywaniu osiągnięć naukowych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

W rozdziale dotyczącym omówienia wyników Doktorantka przedstawiła obecny stan wiedzy na temat struktury chemicznej i konformacji cząsteczek oraz funkcji RG-I w roślinie i w warunkach *in vitro* opisany szczegółowo w pierwszej pozycji cyklu publikacji w postaci artykułu przeglądowego pt. „*Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review*” opublikowanego w *Carbohydrate Polymers*. Zwróciła przy tym uwagę na istotne aspekty z punktu widzenia realizacji celu rozprawy doktorskiej zauważając m. in. różnice w długości domen RG-I oraz w stopniu rozgałęzienia uwarunkowane nie tylko rodzajem surowca roślinnego, z którego pozyskano pektyny, ale także fazą dojrzałości i czasem przechowywania tego surowca. Uwzględnienie przy tym wpływu obecności RG-I na właściwości reologiczne pektyn w roztworze w powiązaniu z rolą cukrów obojętnych w tworzeniu sieci podczas żelowania pozwoliło prawidłowo ukierunkować prace eksperymentalne, aby wynikające z nich wnioski miały znaczenie poznawcze i użytkowe. Z kolei informacje zawarte w drugiej pozycji cyklu publikacji, także o charakterze przeglądowym, pt. „*A mini-review on the plant sources and methods for extraction of rhamnogalacturonan I*” opublikowanej w *Food Chemistry*, stanowią bazę wiedzy teoretycznej i praktycznej w zakresie warunków prowadzenia ekstrakcji zmierzającej

do efektywnego pozyskiwania RG-I nie tylko z owoców, ale także z wyłoków owocowych, sprzyjając wykorzystaniu odpadów pochodzących z przetwórstwa spożywczego zgodnie ze strategią „industrial symbiosis” rozwijaną w ramach koncepcji gospodarki o obiegu zamkniętym. W trzeciej pozycji cyklu publikacji, stanowiącej artykuł pt. „*Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot*” opublikowany w *Food Chemistry*, Doktorantka na podstawie własnych badań dokonała analizy składu chemicznego, struktury i właściwości reologicznych frakcji rozpuszczalnej w słabych alkaliach (DASP), ekstrahowanej z dwóch różnych surowców roślinnych w postaci jabłek i marchwi. Na uwagę zasługuje wyznaczenie udziałów procentowych składników tworzących frakcję DASP, opisanie wiązań tworzących złożoną strukturę molekularną z charakterystycznymi punktami zgięć i rozgałęzień oraz uzasadnienie braku metylestryfikacji prawdopodobną hydrolizą wiązań estrowych podczas ekstrakcji alkalicznej. Poznanie struktury molekularnej frakcji DASP pozwoliło uzasadnić różnice właściwości reologicznych odnoszące się do uzyskanych z tych frakcji żeli, które wykazywały silniejsze związanie w przypadku pochodzenia z jabłek i większą odporność na odkształcenia mechaniczne w przypadku pochodzenia z marchwi. Z drugiej strony pozyskana wiedza dotycząca struktury molekularnej frakcji DASP umożliwiła dokonanie w niej celowych zmian poprzez modyfikację enzymatyczną opisaną w czwartej pozycji cyklu publikacji w postaci artykułu pt. „*Effect of enzymatic modification on the structure and rheological properties of diluted alkali-soluble pectin fraction rich in RG I*” opublikowanego w *Scientific Reports*. Należy przy tym docenić stwierdzenie, że wyraźny efekt nastąpił w wyniku degradacji arabinozy przez zastosowanie Arabinofuranazydazy – ABF ($2,1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$), czyli enzymu odcinającego łańcuchy boczne zawierające arabinozę, przyłączoną głównie za pomocą wiązań α -1,2- oraz α 1,3. Nie mniej ważnym osiągnięciem było wykazanie, że jednoczesne działanie enzymów usuwających łańcuchy boczne zawierające arabinozę i enzymów modyfikujących szkielet RG-I pozwoliło na skuteczniejszą fragmentację łańcuchów pektynowych. To osiągnięcie potwierdziło hipotezę, że arabinoza przyłączona do ramnozy, występując w dużych ilościach w badanej frakcji, może ograniczać dostęp do szkieletu enzymom modyfikującym szkielet RG-I. Na uwagę zasługuje także powiązanie wyników badań reologicznych ze zmianami strukturalnymi będącymi skutkiem modyfikacji enzymatycznej. Jako przykład może posłużyć zmniejszenie wartości współczynnika konsystencji K oraz modułu zachowawczego G' przy wzroście wartości współczynnika stratności G'' w rezultacie odcięcia łańcuchów bocznych zawierających arabinozę pod wpływem enzymu ABF ($2,1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$). Za równie interesujące należy uznać wyniki badań uzupełniających dotyczące wpływu regionu RG-I frakcji DASP na

właściwości mechaniczne naturalnych i modelowych ścian komórkowych. Wyniki te potwierdzają istotną rolę RG-I w kształtowaniu właściwości mechanicznych natywnych ścian komórkowych oraz kompozytów utworzonych na bazie celulozy bakteryjnej, do której wprowadzono frakcję DASP. Doktorantka przekonująco wyjaśniła zaobserwowaną prawidłowość biorąc pod uwagę mniejsze wartości modułu Younga próbek zawierających zmodyfikowane enzymatycznie frakcje DASP, w których doszło do degradacji modułu RG-I wchodzącego w interakcję z celulozą dzięki obecności przyłączonych do ramnozy łańcuchów arabinozy. Badania uzupełniające objęły także ocenę wpływu regionu RG-I frakcji DASP na właściwości pektyn przez przeprowadzenie demineralizacji oraz enzymatycznych i chemicznych modyfikacji. Należy przy tym zauważyć, że o ile przeprowadzenie demineralizacji oraz modyfikacji chemicznej, polegającej na hydrolizie kwasowej, stanowiło kolejne narzędzie ingerencji w strukturę frakcji DASP, to modyfikacje enzymatyczne zostały zoptymalizowane i uzupełnione w stosunku do opisanych w poprzednim rozdziale przez zastosowanie degradacji zarówno łańcuchów bocznych arabinozy, jak i galaktozy. Takie podejście metodyczne umożliwiło lepsze poznanie funkcjonalności pektyn w aspekcie ich potencjalnych zastosowań dzięki poszerzeniu ingerencji w region RG-I. Na uwagę zasługuje skonfrontowanie charakterystyki chemicznej badanych próbek ze zmianami strukturalnymi będącymi konsekwencją zastosowanych modyfikacji oraz wyznaczenie zawartości jonów w kontekście właściwości reologicznych. Z kolei analiza zmian strukturalnych na podstawie obrazów zaobserwowanych przy użyciu mikroskopu sił atomowych oraz na podstawie rozkładu masy cząsteczkowej próbek pektyn, uzyskanego przy użyciu wysokosprawnej chromatografii wykluczania sprzężonej z odpowiednimi detektorami, świadczy o umiejętności wykorzystania dostępnych metod analitycznych i zaawansowanych metod obrazowania przy wyjaśnianiu złożonych zjawisk w materiale roślinnym zachodzących na poziomie molekularnym. Zauważenie zmniejszenia współczynnika lepkości dynamicznej roztworów pektyn frakcji DASP wraz ze zmniejszeniem wartości średniej masy cząsteczkowej, w rezultacie przeprowadzonych modyfikacji skutkujących zmianami strukturalnymi, może mieć duże znaczenie praktyczne w przemyśle spożywczym. Można także upatrywać w tym spostrzeżeniu szansę na osiągnięcie o charakterze metodycznym podejmując próbę szacowania wartości średniej masy cząsteczkowej roztworów pektyn frakcji DASP na podstawie pomiaru lepkości, przy czym należałoby dysponować większą liczbą punktów empirycznych, aby dopasować do nich formułę matematyczną przy wystarczająco dużej wartości współczynnika determinacji.

Analiza wyników przedstawionych w poszczególnych pozycjach ocenianego cyklu publikacji i uzyskanych w ramach przeprowadzenia badań uzupełniających pozwoliła Doktorantce podsumować dokonane osiągnięcia o charakterze poznawczym i utylitarnym oraz sformułować 6 syntetycznych wniosków.

Wiedza uzyskana dzięki realizacji celu rozprawy doktorskiej prowokuje do zastanowienia się, w jakim stopniu wnioski uzyskane na bazie pektyn z jabłek i marchwi można odnieść do pektyn wyekstrahowanych z innych owoców i warzyw oraz w jakim zakresie i przy jakich danych możliwe jest utworzenie numerycznego modelu surowca roślinnego, który pozwoliłby prognozować zachowanie jego struktury wewnętrznej pod wpływem czynników zewnętrznych związanych z oddziaływaniem chemicznym i fizycznym z ewentualnym uwzględnieniem czasu przechowywania.

Ocena formalna

Rozprawa doktorska nie budzi większych zastrzeżeń pod względem formalnym. Poszczególne rozdziały występują w prawidłowej kolejności i są ze sobą właściwie powiązane. Rozprawa na ogół została napisana poprawnym i komunikatywnym językiem naukowym. Doktorantka dbając o poprawność strony formalnej rozprawy nie ustrzegła się niedociągnięć i popełnienia błędów, głównie o charakterze redakcyjnym. Mianowicie, występowanie w tekście dużej liczby skrótów uzasadnia wprowadzenie spisu oznaczeń. Tę uwagę można ewentualnie uwzględnić podczas redagowania manuskryptów zawierających wyniki badań uzupełniających, które nie zostały dotychczas opublikowane. Zdefiniowanie na str. 50 modułu Younga próbki jako stosunek napięcia do naprężenia nie jest jasne mimo sugerowanego odniesienia do rys. 5. Należy rozważyć zastąpienie sformułowania „bardziej elastycznych” (str. 53) terminem „bardziej sztywnych” z uwagi na praktyczny odbiór znaczenia pojęcia „elastyczność” w języku polskim. Na rys. 9 (str. 69), w opisie osi rzędnych powinna występować nazwa „częstość”, zamiast terminu „częstotliwość”.

Występujące w rozprawie błędy i niedociągnięcia nie wpływają znacząco na percepcję treści i wysoką wartość merytoryczną opracowania.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Recenzowana rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr Adrianny Kaczmarskiej-Król dotyczy aktualnego i ważnego problemu dotyczącego kształtowania właściwości mechanicznych materiałów zawierających pektyny rozpuszczalne w słabych alkaliach

poprzez zmianę zawartości kluczowego składnika podstawowej frakcji strukturotwórczej. Przedstawienie aktualnego stanu wiedzy pozwoliło Autorce prawidłowo sformułować cel rozprawy, który został zrealizowany w oparciu o prawidłowe podejście metodyczne. Badania o charakterze interdyscyplinarnym pozwoliły uzyskać wyniki przyczyniające się do rozwoju dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo. Wyniki te posiadając duże znaczenie poznawcze mogą być wykorzystane w praktyce do optymalizacji procesów technologicznych w przetwórstwie owocowo-warzywnym, a także w projektowaniu naturalnych kompozytów o określonych właściwościach mechanicznych. Doktorantka, podczas przygotowania rozprawy wykazała umiejętność rozwiązywania skomplikowanych problemów naukowych w oparciu o dużą wiedzę teoretyczną i praktyczną wzbogaconą doświadczeniem nabytym w ramach innych osiągnięć naukowych, do których można zaliczyć, obok 4 artykułów wchodzących w skład ocenianego cyklu publikacji, 3 – miesięczny staż w Laboratory of Food Technology, KU Leuven, który zaowocował podjęciem współpracy międzynarodowej, uczestniczenie w 6 konferencjach krajowych i 6 międzynarodowych oraz udział w realizacji 3 projektów badawczych, także w roli kierownika, finansowanych ze źródeł zewnętrznych. Przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko i jednocześnie wnioskuję o jej wyróżnienie z uwagi na bardzo wysoki poziom merytoryczny, rozwiązanie istotnego problemu naukowego w oparciu o bogaty warsztat metodyczny i znaczne wzbogacenie wiedzy w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo w zakresie agrofizyki.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Adrianny Kaczmarskiej-Król pt. „Mechaniczna rola ramnozy w pektynach ekstrahowanych za pomocą słabych alkaliów (DASP) z roślinnych ścian komórkowych” spełnia wymagania Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.) i stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN o dopuszczenie mgr inż. Adrianny Kaczmarskiej-Król do publicznej obrony.

