

Olsztyn, dnia 18 października 2024 r.

Prof. dr hab. Wioletta Błaszczak
Zakład Chemicznych i Fizycznych Właściwości Żywności
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Adrianny Kaczmarskiej-Król pt.: „Mechaniczna
rola ramnozy w pektynach ekstrahowanych za pomocą słabych alkaliów (DASP) z
roślinnych ścian komórkowych”**

Promotor: prof. dr hab. Artur Zdunek
Rozprawa doktorska została wykonana w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk w Lublinie.

Podstawę formalną opracowania recenzji stanowi uchwała Rady Naukowej Instytutu
Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie powołująca mnie, w dniu 23 września
2024 r., na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Adrianny Kaczmarskiej-Król.

Przewód został wszczęty w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Ocena zasadności podjęcia tematu

Pektyny należą do heteropolisacharydów i są głównym komponentem ścian komórkowych wielu roślin. Pod względem struktury chemicznej wyróżnia się pięć klas pektyn: homogalakuronan, ksylogalakuronan, apiogalakuronan, ramnogalakuronan I i ramnogalakuronan II. Spośród wymienionych pektyn, jedynie ramnogalakuronan I jest polimerem kwasu galakturonowego i α -1,2-L-ramnozy. Jego silnie rozgałęziona i złożona struktura pozostaje w sferze wielu badań. Z kolei, homogalakuronan, którego liniową strukturę tworzą jednostki kwasu galakturonowego połączone wiązaniami glikozydowymi α -1,4, jest lepiej scharakteryzowaną w literaturze pektyną. Biosynteza i modyfikacje enzymatyczne pektyn *in muro* to kluczowe czynniki determinujące nie tylko reologię ściany komórkowej i mechanizm rozwoju rośliny, ale także właściwości i jakość roślinnych surowców rolniczych, które w konsekwencji decydują o ich wykorzystaniu w przemyśle spożywczym.

W podjętych przez Doktorantkę badaniach, główna idea sprowadza się do szczegółowej analizy zależności pomiędzy nanostrukturą a właściwościami reologicznymi i mechanicznymi frakcji pektyn bogatych w homogalakturenan (HG) i ramnogalakturenan I (RG-I), ekstrahowanych za pomocą słabych alkaliów (DASP) z roślinnych ścian komórkowych. Szeroki i szczegółowo przedstawiony przegląd literatury wskazuje, że badania nad strukturą molekularną pektyn bogatych w RG-I wymagają poszerzenia wiedzy szczególnie w aspekcie oddziaływań molekularnych monosacharydów i ich pochodnych (ramnozy) na konformację przestrzenną łańcucha głównego RG-I i właściwości fizykochemiczne. Doktorantka podejmuje się weryfikacji następującej hipotezy: „...obecność ramnozy w pektynach rozpuszczalnych w słabych alkaliach (DASP) ma wpływ na strukturę i właściwości sieciujące tej frakcji, a tym samym na właściwości mechaniczne materiałów, w których są obecne”. Do weryfikacji hipotezy posłużyły 4 główne cele badawcze, w których określono: strukturę i skład chemiczny pektyn frakcji DASP z jabłek i marchwi oraz ich właściwości reologiczne (1), wpływ modyfikacji enzymatycznej na zmiany struktury i właściwości reologiczne pektyn frakcji DASP (2), wpływ RG-I na właściwości mechaniczne analogów roślinnych ścian komórkowych oraz naturalnych ścian komórkowych (3), wpływ hydrolizy kwasowej na zmiany struktury i właściwości reologiczne pektyn frakcji DASP (4).

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że wybór tematyki pracy jest ważny zarówno ze względów poznawczych jak i utylitarnych. Z tego powodu uważam, że badania podjęte przez Panią mgr Adriannę Kaczmarską-Król są w pełni zasadne. Na podkreślenie zasługuje innowacyjność badań, w których Doktorantka m.in. charakteryzuje wpływ domeny RG-I na właściwości mechaniczne naturalnych i modelowych ścian komórkowych. Ponadto, zastosowany w badaniach surowiec, tj.: owoc jabłoni i korzeń marchwi jest doskonałym wyborem z uwagi na bogate źródło pektyn.

Ogólna charakterystyka rozprawy

Na rozprawę składa się cykl czterech publikacji wydanych w czasopismach naukowych o łącznej punktacji MNiSW wynoszącej 680 punktów i sumarycznym wskaźniku Impact Factor 31,5. Dwie publikacje z cyklu prac są pracami przeglądowymi i stanowią wprowadzenie do aktualnego stanu wiedzy z zakresu realizowanego problemu badawczego. Prace te opublikowano w *Carbohydrate Polymers* i *Food Chemistry*. Kolejne dwie prace, to oryginalne publikacje naukowe opublikowane w czasopismach *Food Chemistry* i *Scientific Reports*. We wszystkich tych pracach Doktorantka pełni funkcję pierwszego autora. W załączonych oświadczeniach współautorów ww. publikacji, nie określono jednak wiodącego udziału Pani mgr Kaczmarskiej-Król w powstaniu cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe.

Pierwszym rozdziałem pracy jest wstęp, w którym Doktorantka bardzo szczegółowo wprowadza czytelnika w tematykę struktury i właściwości fizykochemicznych pektyn. Wiele podobnych informacji odnośnie struktury pektyn, szczególnie RG-I odnaleźć można w podrozdziałach 1.2. (Budowa i właściwości pektyn), 1.3.1. (Budowa chemiczna i

występowanie) czy 1.3.2. (Struktura i konformacja). Zdaniem Recenzentki znacznie lepszym rozwiązaniem byłoby uporządkowanie zebranych informacji i przedstawienie ich w formie syntetycznego opisu, tym bardziej, że dwie z załączonych prac przeglądowych, stanowiących rozprawę doktorską, przedstawiają niemal identyczne wiadomości. Z kolei, pewne informacje cytowane przez Doktorantkę we wstępie pracy wymagają doprecyzowania, np.: w podrozdziale 1.2. (Budowa i właściwości pektyn, str.14) Autorka pisze, że „Grupy karboksylowe jednostek GalA...mogą być poddawane estryfikacji metanolem..., co kształtowane jest w trakcie rozwoju rośliny...”. W pracy Wolf i wsp. 2009, na którą zresztą powołuje się Doktorantka, bardzo precyzyjnie wyjaśniono biosyntezę i metyl-estryfikację pektyn (HG) *in muro*, za którą odpowiada kompleks enzymów komórkowych, w tym metylotransferazy pektynowe. Stąd też, niezrozumiałe jest kolejne stwierdzenie Doktorantki, że „Jednostki GalA w szkielecie RG-I zwykle nie są estryfikowane metanolem...” (str. 17). Proszę o wyjaśnienie tych kwestii. Proszę także o wyjaśnienie użytego przez Doktorantkę określenia: „konserwatywna struktura o szkielecie HG...” (str.15). Podobnie, zastosowanie w tytule podrozdziału 1.3.4., pojęcie „właściwości *in vitro*” uważam za mało precyzyjne. Bardziej właściwym byłby tytuł właściwości reologiczne i żelujące pektyn, na których skupiła się główna uwaga Doktorantki w trakcie opracowywania ww. podrozdziału. Pewną nieścisłością jest także zastosowanie w pracy określenia cukry obojętne/ cukry neutralne (podrozdział 1.3.2. i 1.4.). Na przykład wymieniona w opisie galaktoza wykazuje właściwości redukujące. Wobec powyższego nie może być określana mianem cukru obojętnego. Pozostałe wymienione cukry także posiadają grupy funkcyjne, które mogą generować ugrupowanie hemiacetalowe, obecność którego może świadczyć o ww. właściwościach cukrów.

Rozdział 2 pracy poświęcony jest hipotezie badawczej, celowi pracy i celom szczegółowym. W kolejnym rozdziale Doktorantka szczegółowo opisuje zastosowane w badaniach metody analityczne i charakteryzuje materiał badawczy, z którego pozyskano pektyny. W tym miejscu proszę o doprecyzowanie, czy pektyny pozyskano z pulpy czy z otrzymanych wytlóków? Proszę także o wyjaśnienie, czy w czasie ekstrakcji i pozyskania frakcji DASP stosowano 0,05 M CDTA, czy 0,1 M roztwór – tak jak wykazano w publikacjach P3 i P4? Kolejne pytanie dotyczy postępowania po modyfikacji enzymatycznej pektyn frakcji DASP (podrozdział 3.4.). Czy weryfikowano aktywność enzymów po schłodzeniu próbek w łaźni lodowej? Pewna uwaga dotyczy także pomiarów statycznego rozpraszania światła laserowego (podrozdział 3.10.). Zastosowanie statycznego rozpraszania światła laserowego w celu określenia średnich wagowo mas cząsteczkowych praktycznie ogranicza się do próbek bardzo jednorodnych. Szacowanie masy molowej przy pojedynczej długości fali i przy tak dużym kącie pomiaru światła rozproszonego możliwe jest dla makromolekuł o promieniu mniejszym niż 1/20 długości fali. Natomiast, z przeprowadzonych analiz AFM wynika, że badane cząsteczki charakteryzowała duża niejednorodność odnośnie ich rozmiarów. Proszę o ustosunkowanie się do ww. kwestii.

Osiągnięcia badawcze Doktorantki opisano w rozdziale 4 pracy. W oparciu o dane literaturowe, zebrane w publikacjach P1 i P2, syntetycznie podsumowano wyniki dotychczasowych badań na temat struktury i funkcji RG-I w roślinie oraz zależności pomiędzy właściwościami chemicznymi RG-I a materiałem wyjściowym i technikami ekstrakcji. W tej części pracy Doktorantka omówiła także rezultaty badań własnych, które opisała w publikacjach (P3 i P4). Są to prace eksperymentalne o charakterze czysto naukowym, spójnie nawiązujące do podjętego problemu naukowego. Doktorantka dokonuje analizy wyznaczonych właściwości chemicznych, reologicznych i molekularnych frakcji DASP ekstrahowanej z dwóch różnych źródeł (jabłek i marchwi). Charakteryzuje także zmiany w jej strukturze i właściwościach reologicznych na skutek degradacji enzymatycznej domeny RG-I. Zaznaczyć należy, iż prace eksperymentalne są obszerne, a część analityczna i opracowanie otrzymanych wyników wymagały od Doktorantki nie tylko znacznych nakładów pracy ale przede wszystkim znajomości warsztatu badawczego i dojrzałości naukowej.

W rozdziale 5 przedstawiono wyniki badań eksperymentalnych, które stanowią uzupełnienie ocenianej dysertacji. W tej części pracy, Doktorantka scharakteryzowała zmiany właściwości mechanicznych analogów ścian komórkowych i naturalnych ścian komórkowych w wyniku degradacji enzymatycznej RG-I. Zdaniem recenzentki zaplanowane badania modelowe charakteryzuje nie tylko wartość naukowa ale także duży potencjał aplikacyjny. W kolejnej części rozdziału określono rolę regionu RG-I frakcji DASP w kształtowaniu właściwości pektyn stosując rozszerzoną modyfikację enzymatyczną i hydrolizę kwasową. Na uwagę zasługuje fakt, że poza analizą chemiczną i badaniem nanostruktury przeprowadzono również pomiar rozkładu mas cząsteczkowych z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii wykluczenia sprzężonej z trzema detektorami. Należy żałować, że nie zastosowano detektora wiskozymetrycznego, który w połączeniu z detekcją RI i LS dostarczyłby dodatkowych informacji odnośnie parametrów hydrodynamicznych, na podstawie których możliwa byłaby charakterystyka struktury liniowej/ rozgałęzionej badanego materiału i tym samym, potwierdzenie obserwacji AFM. Natomiast, otrzymane wyniki zostały szczegółowo przedyskutowane z wykorzystaniem trafnie dobranej i aktualnej literatury przedmiotu.

Podsumowanie i wnioski z przeprowadzonych badań przedstawiono w rozdziale 6. Pracę podsumowuje 6 wniosków, które stanowią odpowiedź na postawione cele szczegółowe badań ocenianej dysertacji. Otrzymane wyniki pozwoliły Doktorantce dowieść, że struktura domeny RG-I i obecność łańcuchów bocznych przyłączonych do ramnozy, szczególnie arabinozy, determinuje właściwości reologiczne i mechaniczne ścian komórkowych oraz, że RG-I pełni istotną rolę w mechanice kompozytów z celulozą i hemicelulozą. Natomiast, modyfikacja enzymatyczna i hydroliza kwasowa skutkuje depolimeryzacją łańcuchów bocznych domeny RG-I, co w konsekwencji decyduje o spadku lepkości frakcji DASP i powstaniu liniowych polimerów.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Adrianny Kaczmarskiej-Król pt.: „Mechaniczna rola ramnozy w pektynach ekstrahowanych za pomocą słabych alkaliów (DASP) z roślinnych ścian komórkowych” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.), zgodnie z ustawą dnia 20 lipca 2018 roku. Zgodnie z przepisami wprowadzającymi – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) i rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20-go września 2018 roku, w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin artystycznych.

Problematyka badawcza, podjęta przez Panią mgr Adriannę Kaczmarską-Król, stanowi istotny wkład dla rozwoju nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo. Ponadto, analiza otrzymanych wyników i ich dyskusja w oparciu o literaturę tematu dowodzą o pogłębionej ogólnej wiedzy teoretycznej Doktorantki w zakresie nauk rolniczych, a także umiejętności prowadzenia samodzielnie pracy naukowej. Oceniana praca ma duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne oraz jest oryginalnym i wartościowym osiągnięciem naukowym, a przedstawione uwagi nie umniejszają jej wartości. Dlatego też, zwracam się do **Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie** o dopuszczenie Pani mgr Adrianny Kaczmarskiej-Król do dalszych etapów w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora.

Wioletta Bolaszacka

