



UMCS

**UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
W LUBLINIE**

Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

Dziedzina: **nauki rolnicze**

Dyscyplina: **rolnictwo i ogrodnictwo**

Adrianna Kaczmarska-Król

nr albumu: 272576

**Mechaniczna rola ramnozy w pektynach
ekstrahowanych za pomocą słabych alkaliów
(DASP) z roślinnych ścian komórkowych
(Mechanical role of rhamnose in diluted alkali-soluble
pectin (DASP) extracted from plant cell walls)**

Rozprawa doktorska przygotowywana pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Artura
Zdunka

w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk

LUBLIN, 2024

OŚWIADCZENIE PROMOTORA ROZPRAWY

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego

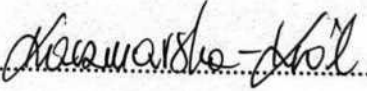
Data. 05.09.24 r. Podpis promotora rozprawy. 

OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza rozprawa jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data. 05.09.24 r. Podpis autora rozprawy. 

*Składam serdeczne podziękowania Panu prof. dr hab. Arturowi
Zdunkowi za nieocenione wsparcie, inspirację i profesjonalne kierownictwo
przy realizacji niniejszej pracy, a także za okazaną życzliwość
i wyrozumiałość.*

*Ponadto, pragnę wyrazić wdzięczność całemu Zespołowi Zakładu
Mikrostruktury
i Mechaniki Biomateriałów za wsparcie, pomoc
i inspirującą atmosferę pracy naukowej.*

*Dziękuję Rodzinie za możliwość rozwoju, wsparcie i nieustającą
wiarę we mnie.*

*W szczególny sposób składam podziękowania dla mojego Męża,
za pokłady cierpliwości, wyrozumiałości i nieustające wsparcie.*



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

Autor uzyskał środki finansowe w ramach finansowania projektu badawczego z Narodowego Centrum Nauki pt. "Mechaniczna rola pojedynczych jednostek ramnozy w łańcuchach homogalakuronianu z pektyn ekstrahowanych z roślinnych ścian komórkowych" (2019/35/O/NZ9/01387) oraz Programu zagranicznych staży doktorskich NAWA Preludium BIS 1 (PPN/STA/2021/1/00072/U/00001).



NARODOWA AGENCJA
WYMIANY AKADEMICKIEJ

Streszczenie

Pektyny są kluczowymi składnikami ścian komórkowych roślin wpływając na sztywność, odporność mechaniczną, a także na integrację tkankową. Spośród pektyn, szczególne znaczenie ma ramnogalakturnan I (RG-I) ze względu na skomplikowaną strukturę i zmienność w zależności od źródła. Struktura molekuł pektyn bogatych w RG-I zależy przede wszystkim od obecności ramnozy w łańcuchu głównym RG-I, do której przyłączone są pozostałe cukry proste. Wtrącenie jednostki ramnozy może powodować powstawanie ugięć w konformacji łańcucha głównego RG-I. W porównaniu z liniowymi łańcuchami HG, może to powodować mniejszą ruchliwość molekuł RG-I w roztworze i zmniejszenie stopnia oddziaływania z innymi cząsteczkami. W konsekwencji, może to skutkować odmiennymi właściwościami funkcjonalnymi RG-I, zarówno sieciującymi w roztworze jak i mechanicznymi w ścianie komórkowej. Frakcja pektyn rozpuszczalna w słabych alkaliach (DASP), oprócz liniowego homogalakturnanu, jest bogata w RG-I. W związku z tym, w niniejszej pracy postawiono hipotezę, że **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.** Powyższa hipoteza została zweryfikowana w eksperymencie prowadzonym na pektynach DASP ekstrahowanych z dwóch gatunków roślin ogrodniczych (jabłko i marchew). Badano skład monosacharydowy pektyn, ich nanostrukturę, właściwości reologiczne w roztworze oraz właściwości mechaniczne ścian komórkowych oraz analogów ścian komórkowych zawierających pektyny frakcji DASP. Analizowano różnice wynikające z gatunku rośliny oraz powstające w wyniku modyfikacji enzymatycznych ukierunkowanych na usunięcie ramnozy oraz łańcuchów bocznych pektyn RG-I w tej frakcji. Celem rozprawy doktorskiej była ocena 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.**

Praca obejmuje trzy główne etapy badawcze. Pierwszy z nich skupiony jest na porównaniu strukturalnych i reologicznych właściwości frakcji DASP ekstrahowanej z dwóch źródeł roślinnych: jabłek (*Malus domestica* Borkh.) i marchwi (*Daucus carota* subsp. *sativus*). W kolejnym etapie zastosowano szereg enzymów degradujących region RG-I oraz hydrolizę chemiczną w celu uzyskania informacji o wpływie konkretnych elementów na strukturę

i właściwości pektyn. Ostatecznie zbadano wpływ frakcji DASP na mechanikę ścian komórkowych poprzez włączenie natywnego oraz zmodyfikowanego enzymatycznie DASP do analogów roślinnych ścian komórkowych oraz badania mechaniczne materiału ścian komórkowych (CWM), również modyfikowanego enzymatycznie.

Badania wykazały, że frakcja pektyn rozpuszczalna w słabych alkaliach (DASP) jest bogata w domenę RG-I, przy czym jej udział jest znacznie większy w próbkach z marchwi niż jabłka. DASP z marchwi zawiera znacznie więcej ramnozy, za to mniej arabinozy niż DASP z jabłka. Roztwory pektyn DASP z dwóch badanych źródeł wykazują właściwości elastyczne, przy czym obecność arabinozy sprzyja tworzeniu silniejszych żeli (próbki DASP z jabłek), natomiast obecność ramnozy może być związana z większą odpornością na odkształcenia mechaniczne (próbki DASP z marchwi). Wykazano, że arabinoza w łańcuchach bocznych RG-I uczestniczy w tworzeniu sieci pektynowej i wpływa na właściwości pseudoplastyczne oraz lepkość roztworu pektyn DASP. Znaczący wzrost długości łańcuchów po usunięciu arabinozy wskazuje, że w pewnych konformacjach, mogą one ograniczać interakcje łańcuchów polimerowych. Wtrącenie ramnozy, obecność przyłączonej do ramnozy arabinozy oraz stopień acetylacji są parametrami strukturalnymi domeny RG-I odpowiedzialnymi za różnice we właściwościach reologicznych roztworów pektyn DASP pochodzących z owoców jabłoni i korzenia marchwi. Badania reologiczne pokazały, że lepkość roztworów pektyn DASP zmniejsza się wraz ze stopniem degradacji domeny RG-I i zależy proporcjonalnie od masy cząsteczkowej. Zmniejszeniu lepkości towarzyszyło powstanie polimerów o krótszych łańcuchach jednak o wysokim stopniu liniowości w wyniku hydrolizy kwasowej lub powstanie polimerów o liniowym charakterze w wyniku selektywnej degradacji enzymatycznej domeny RG-I. Badania mechaniczne pokazały natomiast, że pektyny frakcji DASP, bogatej w RG-I, odgrywają istotną rolę we właściwościach mechanicznych ściany komórkowej roślin. Degradacja domeny RG-I w postaci depolimeryzacji łańcucha głównego Rha-GalA oraz degradacji przyłączonych do ramnozy łańcuchów arabinozy powodują zmniejszenie modułu Younga zarówno naturalnej ściany komórkowej jak i analogów ścian komórkowych opartych na celulozie bakteryjnej.

Słowa kluczowe: pektyny, DASP, ramnogalakuronan I, AFM, modyfikacje enzymatyczne, właściwości reologiczne, ściana komórkowa.

Abstract

Pectins are key component of plant cell walls, influencing rigidity, mechanical resistance, and tissue integration. Among pectins, rhamnogalacturonan I (RG-I) is particularly significant due to its complex structure and variability depending on the source. The structure of pectin molecules rich in RG-I primarily depends on the presence of rhamnose in the main chain of RG-I, to which other neutral sugars are attached. The insertion of a rhamnose unit can cause bends in the conformation of the RG-I main chain. Compared to the homogalacturonan (HG) linear chains, this may lead to reduced mobility of RG-I molecules in solution and, therefore, a decrease in the degree of interaction with other molecules. Consequently, this may result in different functional properties of RG-I, both in cross-linking in solution and mechanically in the cell wall. The diluted alkali-soluble pectin (DASP) fraction, in addition to linear homogalacturonan, is rich in RG-I. **Therefore, this study hypothesized that the presence of rhamnose in diluted alkali-soluble pectin (DASP) affects the structure and cross-linking properties of this fraction and, thus, the mechanical properties of the materials in which they are present.** The above hypothesis was verified in an experiment conducted on DASP pectins extracted from two horticultural plant sources (apple and carrot). The study examined the monosaccharide composition of pectins, their nanostructure, rheological properties in solution, and the mechanical properties of cell walls and cell wall analogues containing DASP fraction. Differences resulting from the plant species and those arising from enzymatic modifications aimed at removing rhamnose and RG-I pectin side chains in this fraction were analyzed. **The aim of the dissertation was to assess the impact of rhamnose and the monosaccharide composition of diluted alkali-soluble pectin (DASP) on the cross-linking properties of this fraction and, thus, on the mechanical properties of the materials in which they are present.**

The work comprises three main research stages. The first stage focuses on comparing the structural and rheological properties of the DASP fraction extracted from two plant sources: apples (*Malus domestica* Borkh.) and carrots (*Daucus carota* subsp. *sativus*). In the next step, a series of enzymes degrading the RG-I region and chemical hydrolysis were used to obtain information about the impact of specific elements on the structure and properties of pectins.

Finally, the impact of the DASP fraction on cell wall mechanics was examined by incorporating native and enzymatically modified DASP into plant cell wall analogues and mechanical testing of cell wall material (CWM) also modified enzymatically.

The research showed that the diluted alkali-soluble pectin fraction is rich in the RG-I domain, with its proportion being significantly higher in carrot samples than in apples. Carrot DASP contains significantly more rhamnose but less arabinose than apple DASP. The DASP pectin solutions from the two studied sources exhibit elastic properties, with the presence of arabinose favoring the formation of stronger gels (apple DASP samples), while the presence of rhamnose may be associated with greater resistance to mechanical deformation (carrot DASP samples). It was demonstrated that arabinose in the RG-I side chains participates in the formation of the pectin network and affects the pseudoplastic properties and viscosity of DASP pectin solution. A significant increase in chain length after the removal of arabinose suggests that in certain conformations, they may limit the interactions of polymer chains. The insertion of rhamnose, the presence of arabinose attached to rhamnose, and the degree of acetylation are structural parameters of the RG-I domain responsible for the differences in rheological properties of DASP pectin solutions derived from apple fruits and carrot roots. Rheological studies showed that the viscosity of DASP pectin solutions decreases with the degree of degradation of the RG-I domain and depends proportionally on molecular weight. The decrease in viscosity was accompanied by the formation of polymers with shorter chains but a high degree of linearity due to acid hydrolysis or the formation of polymers with a linear character due to selective enzymatic degradation of the RG-I domain. Mechanical studies, on the other hand, showed that the DASP fraction pectins, rich in RG-I, play a significant role in the mechanical properties of the plant cell wall. The degradation of the RG-I domain by means of depolymerization of the Rha-GalA main chain and the degradation of arabinose chains attached to rhamnose, cause a reduction in the Young's modulus of both the natural cell wall and cellulose-based bacterial cell wall analogues.

Keywords: pectins, DASP, rhamnogalacturonan I, AFM, enzymatic modifications, rheological properties, cell wall.

Spis treści

Lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej	11
1. Wstęp	13
1.1. Znaczenie pektyn	13
1.2. Budowa i właściwości pektyn	13
1.3. Rhamnogalakturonan I	15
1.3.1. Budowa chemiczna i występowanie	16
1.3.2. Struktura i konformacja	19
1.3.3. Zmiany strukturalne i funkcje w ścianie komórkowej rośliny	20
1.3.4. Właściwości <i>in vitro</i> i udział w procesie żelowania	22
1.4. Frakcja pektyn rozpuszczalna w słabych alkaliach (DASP)	23
2. Hipoteza badawcza i cele rozprawy doktorskiej	26
3. Materiały i metody	28
3.1. Materiał roślinny	28
3.2. Izolacja ścian komórkowych (CWM)	28
3.3. Ekstrakcja sekwencyjna pektyn i otrzymanie frakcji DASP	28
3.4. Modyfikacje enzymatyczne pektyn frakcji DASP	29
3.5. Analiza zawartości monosacharydów i kwasów uronowych	31
3.6. Chromatograficzne oznaczenie stopnia metylacji (DM) i acetylacji (DA)	32
3.7. Miareczkowe oznaczenie stopnia metylacji (DM)	32
3.8. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)	33
3.9. Pomiary AFM	33
3.9.1. Obrazowanie topograficzne	33
3.9.2. Analiza obrazu	33
3.9.3. Długość persystentna	34
3.10. Statyczne rozpraszanie światła laserowego	34
3.11. Pomiary reologiczne	35
3.11.1. Właściwości lepkościowe	35
3.11.2. Krzywe płynięcia	35
3.11.3. Graniczna liczba lepkościowa (lepkość istotna)	36
3.12. Analiza statystyczna	36
4. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach	37
4.1. Publikacja P1 (Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review)	37
4.2. Publikacja P2 (A mini-review on the plant sources and methods for extraction of rhamnogalacturonan)	38
4.3. Publikacja P3 (Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot)	39
4.3.1. Skład chemiczny frakcji DASP	39
4.3.2. Struktura molekuł frakcji DASP	40
4.3.3. Właściwości reologiczne i molekularne frakcji DASP	41
4.4. Publikacja P4 (Effect of enzymatic modification on the structure and rheological properties of diluted alkali-soluble pectin fraction rich in RG-I)	42
4.4.1. Zmiany struktury molekuł DASP w wyniku degradacji enzymatycznych	42
4.4.2. Zmiany grup funkcyjnych molekuł frakcji DASP w wyniku działania mieszaniny enzymów (E3)	44
4.4.3. Zmiany właściwości reologicznych frakcji DASP w wyniku degradacji enzymatycznej	45

5. Omówienie wyników przedstawionych w badaniach uzupełniających.....	48
5.1. Wpływ regionu RG-I frakcji DASP na właściwości mechaniczne naturalnych i modelowych ścian komórkowych.	48
5.1.1. Wstęp	48
5.1.2. Materiały i metody	49
5.1.3. Wyniki i dyskusja	52
5.1.4. Podsumowanie	54
5.2. Badania wpływu regionu RG-I frakcji DASP na właściwości pektyn poprzez enzymatyczne i chemiczne modyfikacje	56
5.2.1. Wstęp	56
5.2.2. Materiały i metody	57
5.2.3. Wyniki	62
5.2.4. Podsumowanie	74
6. Podsumowanie i wnioski	76
7. Tekst publikacji P.1	78
8. Tekst publikacji P.2	88
9. Tekst publikacji P.3	95
9.1. Materiały uzupełniające publikacji P.3	105
10. Tekst publikacji P.4.....	108
10.1. Materiały uzupełniające publikacji P.4	120
11. Bibliografia.....	122
12. Oświadczenia współautorów.....	139
13. Życiorys naukowy.....	145

Lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

Niniejsza rozprawa doktorska oparta jest na cyklu czterech publikacji na temat:

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

P.1: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2022, Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review, Carbohydrate Polymers, 278, 118909.

Czasopismo umieszczone w bazie ISI Journal Citation Reports,

Impact Factor: 11,20

MEiN: 140 punktów.

P.2: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2023, A mini-review on the plant sources and methods for extraction of rhamnogalacturonan I, Food Chemistry, 403.134378.

Czasopismo umieszczone w bazie ISI Journal Citation Reports,

Impact Factor: 8,80

MEiN: 200 punktów.

P.3: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Cieśla Jolanta, Zdunek Artur, 2024, Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot, Food Chemistry, 446, 138869.

Czasopismo umieszczone w bazie ISI Journal Citation Reports,

Impact Factor: 8,80

MEiN: 200 punktów.

P.4: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2024, Effect of enzymatic modification on the structure and rheological properties of diluted alkali-soluble pectin fraction rich in RG-I, Scientific Reports, 14, 11454.

Czasopismo umieszczone w bazie ISI Journal Citation Reports,

Impact Factor: 4,60

MEiN: 140 punktów.

Uzupełnieniem opublikowanych badań są wyniki przedstawione w rozdziale 5 niniejszej rozprawy.

5.1: Badanie wpływu degradacji regionu ramnogalakturonanu I na właściwości mechaniczne analogów ścian komórkowych (celulozy bakteryjnej) oraz materiału ścian komórkowych.

5.2: Badanie wpływu segmentów RG-I na właściwości pektyn poprzez enzymatyczne i chemiczne modyfikacje frakcji rozpuszczalnej w słabych alkaliach (DASP)

1. Wstęp

1.1. Znaczenie pektyn

Dotychczasowe badania nie pozostawiają wątpliwości, że oprócz sieci celulozowo-hemicelulozowej, pektyny stanowią ważny element ściany komórkowej roślin. Odgrywają one znaczącą rolę w strukturze i funkcjonowaniu ścian komórkowych roślin, co ma bezpośrednie znaczenie dla kształtowania jakości roślinnych produktów rolniczych oraz dla ich wykorzystania w przemyśle spożywczym lub do wytwarzania nowych biomateriałów (Voragen i in., 2009). Pektyny mają bezpośredni związek z jędrnością owoców i warzyw, który jest kluczowym parametrem jakościowym monitorowanym na potrzeby zbioru, technologii przechowania i przydatności technologicznej (Cybulska i in., 2015). Wiedza na temat wpływu pektyn na strukturę ścian komórkowych owoców i warzyw jest więc niezbędna do opracowania nowych technik rolniczych i ogrodniczych.

Owoce i warzywa, a szczególnie odpady po produkcji soków, takich jak wytloki jabłkowe i marchwiowe, są bogatym źródłem pektyn do zastosowań w przemyśle. Te produkty uboczne mogą być więc przetworzone na wartościowy produkt między innymi poprzez ekstrakcję z nich pektyn (de Oliveira i in., 2015; Jafari i in., 2017). Dlatego, wiedza na temat właściwości pektyn w warunkach *in vitro* (najczęściej w roztworze) jest niezbędna do szerszego wykorzystania surowców odpadowych i bardziej zrównoważonego zarządzania zasobami naturalnymi.

1.2. Budowa i właściwości pektyn

Pektyny to polisacharydy stanowiące główny składnik pierwotnej ściany komórkowej i blaszki środkowej roślin wyższych (Posé i in., 2012; Redgwell, Fischer, Kendal, & Macrae, 1997). Dla roślin dwu- i jednoliściennych, zawartość pektyn może wynosić 30–35% suchej masy. Mniejsze ilości tych polisacharydów (2–10%) występują w ścianach komórkowych traw, a także w tkance drewna (5%) (Voragen i in., 2009). Głównym składnikiem pektyn jest kwas galakturonowy, który stanowi około 65% ich zawartości (Mierczyńska i in., 2015; Voragen i in., 2009). W zależności od budowy, wyróżnić można trzy główne domeny pektynowe: homogalakturenan (HG), ramnogalakturenan I (RG-I) i ramnogalakturenan II (RG-II) (Cornuault i in., 2018a; Mohnen, 2008; O'Neill i in., 1990). Uważa się, że te trzy domeny polisacharydowe mogą być kowalencyjnie połączone, tworząc sieć pektynową w macierzy

pierwotnej ściany komórkowej i blaszki środkowej. Sieć ta podlega znaczącym zmianom w wyniku działania naturalnych enzymów (Willats i in., 2001).

Homogalakturnan (HG) jest liniowym polimerem składającym się z monomerów kwasu D-galakturnowego (GalA) połączonych wiązaniami α -1 $\rightarrow$ 4 glikozydowymi. Ze względu na niepodstawiony szkielet HG jest uważany za tzw. region „gładki” (ang. *smooth*) pektyn (Mao i in., 2019). Podstawienie jednostek GalA przy C-3 resztami ksylozy, tworzy ksylogalakturnan (XGA) (Kikuchi i in., 1996; Le Goff i in., 2001; Renard i in., 1997; Schols i in., 1995). Podstawienie jednostki GalA apiozą przy C-2 lub C-3 skutkuje powstaniem apiogalakturnanu (Hart & Kindel, 1970; Longland i in., 1989). Wskazane modyfikacje biosyntetyczne regulują w sposób jeszcze nieznany funkcjonowanie HG (Willats i in., 2001). Grupy karboksylowe jednostek GalA w szkielecie HG mogą być poddawane estryfikacji metanolem w określonym stopniu i wzorze, co kształtowane jest w trakcie rozwoju rośliny (Wolf i in., 2009). Podstawowa struktura HG jest stosunkowo sztywna i może zmieniać swoją konformację helikalną w zależności od stopnia metylacji (ang. *degree of methylation*, DM), nazywanego również stopniem estryfikacji (ang. *degree of esterification*, DE) (Voragen i in., 2009; Zdunek i in., 2021) i definiowanego jako procent zestryfikowanych metanolem grup karboksylowych do całkowitej liczby grup karboksylowych w łańcuchu pektynowym. Stopień estryfikacji pektyn wpływa również silnie na jej zdolności do sieciowania oraz formowania struktur wyższego rzędu (Grant i in., 1973) (Tabela 1).

Tabela 1. Warunki żelowania i właściwości żeli dla pektyn wysokoestryfikowanych i niskoestryfikowanych. Na podstawie Cao i in. (2020); Gawkowska i in. (2018b).

	<i>Pektyny wysokoestryfikowane (DE > 50%)</i>	<i>Pektyny niskoestryfikowane (DE < 50%)</i>
Warunki żelowania	pH < 3,5 stężenie cukru >55%	pH 2–6 obecność kationów dwuwartościowych, głównie Ca ²⁺
Oddziaływania międzycząsteczkowe	wiązania wodorowe, siły hydrofobowe	oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy kationami i ujemnie naładowanymi regionami utworzonymi przez łańcuchy polimerowe

Właściwości żeli	elastyczne, nieodwracalne termicznie i odwracalne pod wpływem ścinania	sztywne, wysoko lepkie, odwracalne termicznie
------------------	--	---

Homogalakturenan jest najlepiej poznaną i opisaną domeną pektynową. Badania eksperymentalne (dyfrakcja promieni rentgenowskich, dichroizm kołowy, spektroskopia NMR) wykazały, że w stanie stałym/żelowym HG przyjmuje rozciągniętą konformację, ale jednocześnie jest elastyczny i może występować jako helisy 2_1 i/lub 3_1 , w zależności od czynników takich jak stopień uwodnienia i rodzaj jonu sieciującego (Alagna i in., 1986; Jarvis & Apperley, 1995; Powell i in., 1982; Walkinshaw & Arnott, 1981). Oprócz konformacji helikalnych 2_1 i 3_1 , istnieją również możliwości wystąpienia konformacji lewoskrętnej trzykrotnej (3_2) i prawoskrętnej czterokrotnej (4_1) (Pérez i in., 2000).

Ramnogalakturenan II (RG-II) to złożony polisacharyd, stanowiący ~4% ściany komórkowej roślin dwuliściennych i mniej niż 1% w przypadku roślin jednoliściennych (Mohnen, 1999). Ma wysoce konserwatywną strukturę o szkieletie HG z czterema złożonymi łańcuchami bocznymi przyłączonymi do C-2 i/lub C-3, tworzonymi przez L-ramnozę, L-arabinozę, D-galaktozę, kwas D-glukuronowy, a także fragmenty 2-O-metylo-L-fukozy, 2-O-metylo-D-ksylozy, 3-C-karboksy-5-deoksy-L-ksylozy, kwasu 2-okso-3-deoksy-D-manno-oktulozonowego, 3-C-hydroksymetylo- β -D-erytrozy oraz kwasu 2-okso-3-deoksy-heptulozarowego (O'Neill i in., 2004; Piñkowska & Złocińska, 2014).

Szkielet RG-I składa się z powtarzających się jednostek kwasu galakturonowego (GalA) i ramnozy (Rha), które są połączone w następujący sposób: $[\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-GalpA}-(1 \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}-(1 \rightarrow)]$ (Renard i in., 1997). Do jednostek ramnozy, głównie przy czwartym atomie węgla, dołączone są łańcuchy boczne, zawierające cukry proste, takie jak arabinany, galaktany i/lub arabinogalaktany (Yapo i in., 2007). RG-I i RG-II reprezentują region „rozgałęziony” (ang. *hairy*) pektyn.

1.3. Ramnogalakturenan I

Ramnogalakturenan I (RG-I) został uznany za kluczowy składnik dla biomechaniki roślin, którego właściwości i rola zostały potwierdzone w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Liczne eksperymenty ustanowiły związek między cechami strukturalnymi RG-I, a zmianami zachodzącymi podczas procesów dojrzewania i mięknięcia owoców, modyfikacjami tekstury oraz mechaniką ściany komórkowej roślin, a także wykazały jego zdolności do tworzenia sieci i żelowania w roztworach. Z drugiej strony, badania *in vivo* wciąż stanowią wyzwanie, stąd

istnienie pewnych niejasności dotyczących organizacji strukturalnej RG-I i związku z innymi głównymi polisacharydami pektynowymi.

W ogólnie przyjętym liniowym, ciągłym modelu polisacharydów pektynowych, sekcje liniowego homogalakturnanu (HG) przeplatają się z RG-I, tworząc zespół naprzemiennych „gładkich” i „rozgałęzionych” regionów pektyn (Albersheim i in., 1996). Analizy za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM), prowadzone przez Round i in. (2010) wykazały, że usunięcie prawie całej początkowej zawartości reszt ramnozy w drodze łagodnej hydrolizy kwasowej nie zmienia średniej długości szkieletu polisacharydu. Alternatywny model sugerował, że homogalakturnan i ksylogalakturnany są łańcuchami bocznymi RG-I połączonymi z łańcuchami cukrów prostych (Vincken i in., 2003). Jednakże, jak dotąd nie znaleziono żadnych bezpośrednich dowodów potwierdzających tę hipotezę (Coenen i in., 2007). W obu teoriach zakłada się, że homogalakturnan i ksylogalakturnan są kowalencyjnie związane z RG-I, ponieważ nie można ich łatwo rozdzielić bez użycia metod enzymatycznych lub chromatograficznych (Albersheim i in., 1996; Coenen i in., 2007; Round i in., 2010).

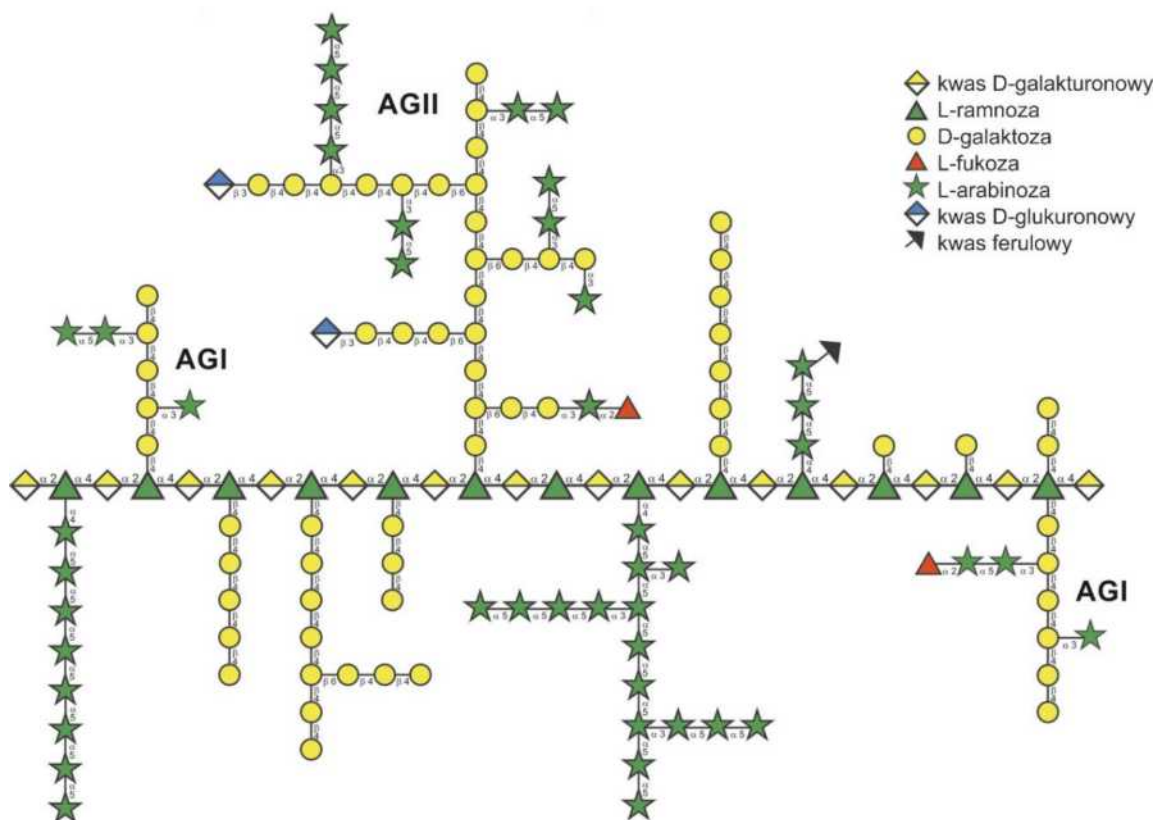
Kolejne badania doprowadziły do hipotezy dotyczącej przestrzennej organizacji pektyn, zgodnie z którą RG-I tworzy asocjacje z peryferyjnie zlokalizowanym szkieletem (Mikshina i in., 2015), a w interakcjach pośredniczą antyrównoległe pary bocznych łańcuchów galaktanu. Nie zostało to jednak potwierdzone danymi dotyczącymi sekwencji glikanów. Istnienie regionów homogalakturnanowych oddzielonych pojedynczymi jednostkami ramnozy zaproponowali Powell i in. (1982) w oparciu o pomiary masy cząsteczkowej częściowo zhydrolizowanej pektyny. Autorzy ci oszacowali długość bloków kwasu 1,4-D-galakturnonowego w takich strukturach na ~25 reszt. Modelowanie molekularne (Pieczywek i in., 2020) wykazało, że włączenie pojedynczej jednostki ramnozy do szkieletu HG powoduje „ugięcie” łańcucha pod kątem $\sim 118^\circ$, co obserwowano również eksperymentalnie za pomocą AFM (Cybulska i in., 2015; Zdunek i in., 2014). Jednakże, ze względu na niejednoznaczność dotychczas dostarczonych wyników i brak analizy dotyczącej identyfikacji i kolejności jednostek monosacharydowych w łańcuchu polisacharydowym, istnienie pojedynczych reszt ramnozy pozostaje spekulatywne.

1.3.1. Budowa chemiczna i występowanie

Ramnogalakturnan I występuje w wielu typach ścian komórkowych i na różnych etapach wzrostu roślin. Najczęściej spotykany jest w pierwotnych ścianach komórkowych i blaszkach środkowych. RG-I stanowi 5–36% zawartości ścian komórkowych i 11–85%

wszystkich polisacharydów pektynowych, w zależności od rośliny źródłowej, konkretnej jej części i metody ekstrakcji (Houben i in., 2011).

Stosunek molowy GalA do Rha wynoszący 1 wskazuje na naprzemiennność tych sacharydów w szkielecie RG-I. Średnia liczba jednostek disacharydowych GalA–Rha tworzących szkielet RG-I wynosi 100 (Albersheim i in., 1996; Ridley i in., 2001), chociaż uzyskane wartości różnią się w zależności od źródła. Wskazują na to dane dla RG-I ekstrahowanego z różnych materiałów roślinnych, gdzie szkielety złożone były z 15–300 jednostek disacharydowych (McNeil i in., 1980; Nakamura i in., 2001). Podobnie różni się również masa cząsteczkowa, która dla różnych metod ekstrakcji oraz surowca przybiera wartości 200–900 kDa (Gurjanov i in., 2008; Muralikrishna i in., 1987).



Rysunek 1. Budowa ramnogalakturonanu I z możliwymi konfiguracjami łańcuchów bocznych. Opracowanie własne, opublikowane w Kaczmarska i in. (2022).

Reszty GalA w szkielecie RG-I mogą zawierać grupy acetylowe przy O-2 i/lub O-3. Procent acetylowanych grup karboksylowych do ich całkowitej liczby w łańcuchu pektynowym jest określany mianem stopnia acetylacji (ang. *degree of acetylation*, DA). Jednostki GalA w szkielecie RG-I zwykle nie są estryfikowane metanolem, jak ma to miejsce w przypadku

łańcuchów HG. O-metylowane reszty GalA zidentyfikowano jedynie w przypadku lnu, którego stopień metylacji oszacowano na 17–40% we frakcjach ekstrahowanych CDTA, które uznano za RG-I (Rihouey i in., 1995). Różne badania wykazały natomiast, że stopień acetylacji waha się od 33% do 90% dla rozgałęzionych obszarów pektyn uzyskanych z błonnika ziemniaczanego, gruszki, marchwi, pora i cebuli modyfikowanych w procesie hydrolizy enzymatycznej (Schols & Voragen, 1994).

W zależności od pochodzenia roślinnego, 20–90% jednostek ramnozy stanowi miejsce przyłączenia łańcuchów bocznych (O'Neill i in., 1990; Ridley i in., 2001; Sengkhamparn i in., 2009). Ich długość różni się w zależności od źródła roślinnego, metody ekstrakcji oraz etapu dojrzewania (Kaya i in., 2014; Posé i in., 2012; Vincken i in., 2003). Rysunek 1 przedstawia budowę RG-I z możliwymi konfiguracjami łańcuchów bocznych. Arabinoza występuje głównie w postaci reszt arabinofuranozylowych, połączonych wiązaniami α -(1→5), podczas gdy galaktoza występuje zwykle w postaci pojedynczej reszty galaktopiranozylowej lub połączonej wiązaniami β -(1→4) (Prade i in., 1999). Krótkie galaktanowe łańcuchy boczne składające się z 1–2 reszt galaktozylowych wykryto we frakcji ekstrahowanej gorącym buforem ze strąków okry, gdzie 65% całkowitej galaktozy było obecne w postaci końcowej reszty β -D-galaktopiranozy, a 23% jako 1,4-Galp (Sengkhamparn i in., 2009). RG-I otrzymany z różnych roślin wykazywał obecność rozgałęzionych łańcuchów bocznych złożonych z terminalnych α -Araf, 1,5- α -Araf, 1,3-, 1,2,5-, 1,3,5- oraz 1,2,3,5-połączonych reszt α -Araf.

Oprócz rozgałęzionych arabinianów, do pozycji O-3 jednostek galaktozylowych przyłączone są arabinogalaktany typu I (AG I) reprezentowane przez łańcuchy 1,4- β -Galp z jednostkami α -L-Araf (Mackie & Perez, 1996). Arabinogalaktan typu II (AG II) zbudowany jest z reszt β -D-galaktopiranozy w postaci 1,3- β -D-Galp, podstawionej w położeniu 1→6 krótkimi łańcuchami 1,6- β -D-Galp, często zakończonej resztą α -L-arabinofuralozylową w postaci α -L-Araf-(1→6)-[β -D-Galp-(1→6)] (Ghosh i in., 2023), rzadziej końcową resztą α -L-Rhap, co zidentyfikowano jako część węglowodanową białek arabinogalaktanu, stanowiąca drugorzędny składnik polisacharydów pektynowych granatu (Shakhmatov i in., 2019). Jego obecność stwierdzono również w łańcuchach bocznych RG-I ekstrahowanych z żeń-szenia (Sun i in., 2019). Użycie przeciwciał połączonych z chromatografią wykrywania epitopów (ang. *Epitope Detection Chromatography, EDC*) wykazało również zmienność łańcuchów bocznych RG-I w zależności od źródła oraz rodzaju rozpuszczalnika ekstrahującego (Cornuault i in., 2018b). W przypadku pomidorów i truskawek, arabinan był najliczniejszym łańcuchem bocznym RG-I w ekstraktach fenolowych i wodnych. Natomiast w przypadku bakłażana, łańcuch boczny galaktanu wykryto we frakcjach ekstrahowanych wodą oraz w środowisku

alkalicznym i kwaśnym. Ponadto w pomidorze wykryto znaczniki pochodzące od arabinanu niezależne od szkieletu RG-I. Wykazano także, że epitopy RG-I nie zawsze są powiązane z HG. Sugeruje to, że łańcuchy RG-I występują w ścianach komórkowych zarówno w postaci związanej z HG, jak i niezwiązanej z HG.

Grupy kwasu ferulowego w RG-I mogą być połączone wiązaniami estrowymi przy O-2 reszt arabinozy i O-6 reszt galaktozy (Ishii & Tobita, 1993; Saulnier & Jean-Francó, 1999). Łańcuchy boczne mogą być również zakończone resztami fukozyłowymi, glukuronozylowymi lub 4-O-metyloglukuronozylowymi (Munarin i in., 2012).

1.3.2. Struktura i konformacja

Metody modelowania molekularnego fragmentu pentasacharydu szkieletu RG-I z łańcuchem bocznym galaktozy wykazały obecność pięciu głównych rodzin konformacji wtórnych (Broadhurst i in., 1996). Najbardziej korzystną energetycznie konformacją RG-I jest potrójna (3_1) helisa o średnicy pojedynczego łańcucha GalA-Rha wynoszącej 0,778 nm (Engelsen i in., 1998). Kouwijzer i in. (1996) uzyskali konformacje disacharydu szkieletowego RG-I w postaci lewoskrętnej trzykrotnej i podwójnej helisy o średnicy odpowiednio 0,675 nm i 0,748 nm. Inne symulacje przy użyciu metod dynamiki molekularnej wykazały, że helisa RG-I ma średnicę 1,1 nm, z okresem oszacowanym na 2,7 nm (Zdunek i in., 2021). Porównanie różnych frakcji pektyn z buraka cukrowego (natywnych, deestryfikowanych i pozbawionych łańcuchów bocznych domen RG-I) wykazało podobne wartości średniej długości persystentnej (ang. *persistence length*) na około 1,4 nm (2 jednostki GalA + 2 jednostki Rha) (Ralet i in., 2008). Mniejsza wartość długości persystentnej oznacza większą elastyczność RG-I w porównaniu ze sztywniejszymi makrocząsteczkami HG, co wynika z obecności ramnozy w tym pierwszym przypadku. Ponadto, wyższy stopień elastyczności RG-I prowadzi do niższej lepkości istotnej cząsteczek przy równoważnych masach molowych. Włączanie coraz większej liczby jednostek ramnozy (5–25%) do głównego łańcucha nie musi mieć istotnego wpływu na ogólne właściwości konfiguracyjne molekuly (Cros i in., 1996), prawdopodobnie z powodu znoszenia się efektu spowodowanego „ugięciem” wynikającym z obecności jednostek ramnozy (Pérez i in., 2000). Jednakże, jak wykazały symulacje metodą dynamiki molekularnej, ugięcia wynikające z obecności ramnozy, powodują zwiększenie średnicy szkieletu RG-I i są miejscem przyłączania łańcuchów bocznych złożonych z cukrów neutralnych (Zdunek i in., 2021). Acetylacja i metylacja jednostek GalA nie mają znaczącego wpływu na konformację helikalną szkieletu RG-I (Cros i in., 1996), jednakże interakcje pomiędzy grupami acetylowymi

a jednostkami Rha i GalA mogą skutecznie modyfikować międzycząsteczkową siłę odpychania jonowego, a także wprowadzać zmiany w siłach przyciągania pomiędzy łańcuchami (Fishman i in., 2004; Kouwijzer i in., 1996).

1.3.3. Zmiany strukturalne i funkcje w ścianie komórkowej rośliny

Ze względu na swoje unikalne właściwości fizykochemiczne, pektyny odgrywają istotną rolę w kontrolowaniu porowatości i sztywności ściany komórkowej, pH i ładunku, sygnalizacji wewnątrzkomórkowej oraz adhezji komórkowej w blaszce środkowej (Moore i in., 2008; Peña & Carpita, 2004; Renard & Jarvis, 1999). W przypadku RG-I istnieje wiele doniesień potwierdzających, że modyfikacje łańcuchów bocznych przyłączonych do ramnozy, wraz z solubilizacją szkieletu i polimeryzacją, determinują integralność strukturalną roślin, począwszy od blaszki środkowej i ścian komórkowych, aż do poziomu całej tkanki. Arabinany i galaktany obecne w łańcuchach bocznych RG-I wykazują się wysoką mobilnością, zdolnością do wzajemnego oddziaływania, tworząc tymczasowo splecione matryce. Łańcuchy arabinanowe z resztami ferulianowymi mogą również tworzyć połączenia oksydacyjne poprzez mostki diferulowe, łącząc sąsiednie polisacharydy RG-I. Dlatego, ze względu na szeroki zakres możliwych interakcji, neutralne łańcuchy boczne RG-I mają znaczący wpływ zarówno na integralność, jak i organizację polimerów w ścianach komórkowych roślin. Istotne zmiany strukturalne w pektynach mają charakter utraty łańcuchów bocznych RG-I i zmiany ich aranżacji, co ma istotny wpływ na jędrność owoców i ich właściwości teksturalne. Innymi procesami modyfikującymi strukturę są solubilizacja i depolimeryzacja. Solubilizacja jest efektem działania enzymu poligalakturonazy (PG), który jest odpowiedzialny za hydrolizę wiązań glikozydowych w pektynach. Proces ten prowadzi do zwiększenia ilości rozpuszczalnych poliuronidów zmniejszając stopień wiązania pektyn ze ścianą komórkową, a także został powiązany ze stopniem pęcznienia ściany komórkowej, co przyczynia się do mięknięcia owoców (Brummell, 2006; Redgwell i in., 1992; Redgwell, Fischer, Kendal, & MacRae, 1997). Nie potwierdzono korelacji między utratą cukrów neutralnych a solubilizacją, niemniej jednak uważa się, że utrata arabinozanów i galaktanów może sprzyjać solubilizacji pektyn poprzez osłabienie wiązań pektyn ze ścianą komórkową (Paniagua i in., 2014). Ponadto, prowadzi to do zwiększenia porowatości ściany komórkowej, umożliwiając łatwiejszy dostęp do składników ściany dla innych hydrolaz (Smith i in., 2002).

Degradacja cukrów prostych (bocznych łańcuchów RG-I) podczas dojrzewania wiąże się z aktywnością enzymów β -galaktozydazy (β -Gal) i α -L-arabinofuranozydazy (α -L-Af), które usuwają odpowiednio reszty galaktozy i arabinozy (Goulao i in., 2007). Degradacja galaktanowych łańcuchów bocznych została odnotowana dla jabłek odmiany Red Delicious już w okresie przed uzyskaniem dojrzałości owoców – w trakcie fazy wzrostu komórek (Peña & Carpita, 2004). Degradacja galaktanowych łańcuchów bocznych zachodzi również w trakcie dojrzewania i mięknięcia (Goulao i in., 2007; Gwanpua i in., 2014). Wzrost aktywności α -L-Af i utratę arabinozy obserwowano na późnym etapie dojrzewania jabłek i gruszek (Goulao i in., 2007; Tateishi i in., 1996). Wzrost aktywności obu enzymów obserwowano również podczas trzymiesięcznego przechowywania marchwi, gdzie wiązało się to ze zmianami strukturalnymi w cząsteczkach pektyn (skręcanie i usuwanie łańcuchów bocznych, obserwowanych za pomocą AFM). Wykazano to między innymi dla frakcji wyekstrahowanej węglanem sodu (Cybulska i in., 2015), uznanej później za RG-I (Pieczywek i in., 2020). Większość zmian zawartości arabinanów i galaktanów związanych z dojrzewaniem obserwuje się we frakcjach pektyn wyekstrahowanych za pomocą 0,05 M Na_2CO_3 , podczas gdy we frakcjach luźno związanych, wyekstrahowanych za pomocą środka chelatującego – 0,05 M CDTA, nie zachodzą żadne zmiany (Brummell, 2006; Seymour i in., 1990). Utrata cukrów neutralnych z łańcuchów bocznych RG-I nie jest jednakowa dla wszystkich typów roślin (Gross & Sams, 1984; Redgwell, Fischer, Kendal, & MacRae, 1997) i różni się również w zależności od ich stadium rozwoju (Peña et al., 2004).

Moore i in. (2008) zaproponowali model, w którym arabinany mają istotne znaczenie w radzeniu sobie przez roślinę z niedoborem wody i odgrywają istotną rolę w zachowaniu elastyczności ścian komórkowych podczas jej wzrostu. Eksperymenty na fragmentach skórki z liści *C. communis* traktowanych α -L-Af wykazały trudności w otwieraniu i zamykaniu aparatów szparkowych. Stwierdzono, że łańcuchy boczne arabinozy pełnią rolę w utrzymaniu elastyczności ścian komórkowych jako regulator wzajemnej odległości polisacharydów, zapobiegając tworzeniu się mostków wapniowych między domenami HG, które powodują ich sztywność i uniemożliwiają odkształcanie się komórek ochronnych w odpowiedzi na turgor komórkowy (Jones i in., 2003). Badania epitopów pektynowych w ziemniakach, wykazały również, że galaktany i arabinany biorą udział w procesie elongacji i proliferacji pierwotnej ściany komórkowej (Bush i in., 2001).

1.3.4. Właściwości *in vitro* i udział w procesie żelowania

Właściwości reologiczne i żelujące RG-I są istotne zarówno dla przemysłu spożywczego, gdzie są wykorzystywane do regulowania konsystencji i tekstury żywności, jak i dla przemysłu farmaceutycznego, gdzie mogą być wykorzystywane w technologii produkcji leków (Lara-Espinoza i in., 2021). Wykazano, że RG-I aktywnie uczestniczy w mechanizmie żelowania, kształtując tym samym właściwości reologiczne pektyn, szczególnie w stężonych roztworach. Zwiększona liczba łańcuchów bocznych RG-I wzmacnia tworzenie sieci, promując splątanie i ciaśniejsze konformacje dyspersji polimerów. Brak kolejnych reszt kwasu galakturonowego w szkielecie RG-I uniemożliwia tworzenie stref połączeń z Ca^{2+} , które są typowe dla żelowania pektyn bogatych w homogalakturnan (Mikshina i in., 2017). Jednak jak wykazały badania, frakcja pektyn bogata w RG-I z dużą ilością łańcuchów bocznych arabinozy może tworzyć żele w obecności jonów dwuwartościowych i w warunkach niskiego pH poprzez grupy hydroksylowe w łańcuchach arabinozy (Mikshina i in., 2017; Mikshina, Petrova, i in., 2015; Zheng i in., 2020). Splątanie łańcuchów bocznych RG-I tworzy ciaśniej upakowane konformacje, zwiększając obszar kontaktu i zmniejszając odległość między sąsiednimi łańcuchami pektyn (Gawkowska i in., 2018a; J. F. Thibault i in., 1993; Zheng i in., 2020). Zmniejszenie ilości i/lub długości łańcuchów bocznych galaktanu uniemożliwia tworzenia stref połączeń, co wskazuje na również ważną rolę łańcuchów galaktozy w żelowaniu RG-I (Mikshina i in., 2017).

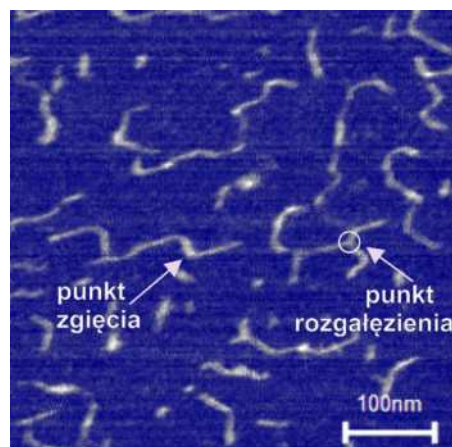
W porównaniu do homogalakturnanu, RG-I charakteryzuje się wyższą masą cząsteczkową i wykazuje większy stopień elastyczności, co potwierdzają pomiary lepkości istotnej. Potwierdzono to dla pektyn ekstrahowanych z limonki i cytryny, gdzie wysoki stosunek HG/RG-I korespondował z wyższym stopniem sztywności i lepkości istotnej, w porównaniu do bardziej elastycznych polimerów o wyższej zawartości RG-I z ekstraktów z grejpfruta i pomarańczy (Kaya i in., 2014). Badania z użyciem bogatych w RG-I pektyn okry wykazały zależność pH od wymiarów zwiniętego polimeru (Alba i in., 2015). Wzrost pH skutkował wyższymi wartościami lepkości istotnej, co było efektem dysocjacji GalA i odpychania elektrostatycznego. Niższe wartości pH prowadziły do protonacji GalA, zmniejszając siły odpychania molekularnego i umożliwiając tworzenie bardziej zwartych konformacji. Badania z użyciem RG-I ze śluzu liści płaszczowca wykazały znaczny wzrost lepkości pozornej i charakteru pseudoplastycznego wraz ze wzrostem stężenia w roztworze (Sims i in., 2018). Badania wykazały również, że łańcuchy boczne RG-I, do których przyłączone są białka i kwas ferulowy wpływają na proces adsorpcji na granicy faz olej-woda

(Alba & Kontogiorgos, 2017). Spadek lepkości i siły żelu pektynowego obserwowano również wraz z długim czasem przechowywania materiału źródłowego pektyn spowodowanym depolimeryzacją polisacharydów pektynowych. Efekt ten zależał od temperatury przechowywania, prowadząc do niższych lepkości roztworów pektynowych ekstrahowanych z owoców przechowywanych w temperaturze 40°C w porównaniu do 25°C (Morris, Castile, i in., 2010). Obserwowane zmiany elastyczności łańcucha dla pektyn niskoestryfikowanych nie były tak wyraźne jak dla pektyn wysokoestryfikowanych (Axelos & Branger, 1993; Morris i in., 1999, 2002).

1.4. Frakcja pektyn rozpuszczalna w słabych alkaliach (DASP)

Frakcja pektyn rozpuszczalna w słabych alkaliach (DASP) jest ekstrahowana z materiału roślinnego za pomocą węglanu sodu po uprzednim usunięciu ze ściany komórkowej kolejno luźno związanych pektyn rozpuszczalnych w wodzie (tzw. frakcji WSP) oraz jonowo połączonych pektyn rozpuszczalnych w chelatorze (tzw. frakcji CSP). DASP jest uważana za frakcję związaną wiązaniami kowalencyjnymi ze ścianą komórkową. Analiza składu chemicznego wykazała, że głównym składnikiem frakcji DASP z jabłek odmian Golden Delicious i Idared był kwas galakturonowy, w związku z tym homogalakturnan był głównym regionem tej frakcji. Ponadto obecność cukrów obojętnych (arabinoza, galaktoza, ramnoza i fukoza) świadczyła o obecności ramnogalakturnanu (Gawkowska i in., 2018b, 2019; Pieczywek i in., 2020). Na podstawie zawartości i stosunku molowego poszczególnych składników frakcji DASP ekstrahowanej z jabłek i marchwi, uznano ją za bogatą w ramnogalakturnan typu I (Kaczmarska i in., 2024).

Frakcja DASP została gruntownie przebadana pod względem struktury fizycznej molekuł ze względu na swoją charakterystyczną strukturę samoorganizującą się w sieć, kiedy zostanie osadzona i wysuszona na mice, która jest wykorzystywana jako podłoże do obrazowania AFM (Cybulska i in., 2015, Zdunek i in., 2014). Zaobserwowano, że DASP ulega dezintegracji w czasie pozbiorniczego przechowywania (Cybulska et al., 2015). Przeprowadzono obszerne analizy struktury molekularnej DASP, wykorzystując mikroskop sił atomowych oraz symulacje dynamiki molekularnej (MD) (Pieczywek i in., 2020).



Rysunek 2. Struktura frakcji pektyn rozpuszczalnej w słabych alkaliach (DASP) na micy, tworząca charakterystyczne punkty zgięć i rozgałęzień.

Molekuły frakcji DASP to stosunkowo sztywne łańcuchy o średnicy od 0,3 do 1 nm. Badania modelowe potwierdziły, że wtrącenia ramnozy tworzą zgięcia i rozgałęzienia łańcuchów w liniowym homogalakuronanie (Rysunek 2) pod charakterystycznym kątem (118°) (Pieczywek i in., 2020; Rees & Wight, 1971). Symulacje dynamiki molekularnej wykazały, że charakterystyczny motyw konformacyjny pochodzi od inkluzji ramnozy. Punkty zgięcia na obrazach AFM między dwoma łańcuchami najprawdopodobniej są tworzone przez dwie sekcje HG oddzielone pojedynczą jednostką ramnozy, jak wcześniej modelowano przez Rees i Weight (1971) i potwierdzono symulacjami MD (Pieczywek i in., 2020). Inne modele hipotetyczne sugerowały również, że punkty rozgałęzienia są tworzone, w podobny sposób do punktów zgięcia, przez pojedyncze wtrącenia ramnozy, które łączą trzy łańcuchy HG lub krótkie sekcje RG-I z bocznym rozgałęzieniem HG. Trzecią proponowaną alternatywą był kompleks dwóch sąsiednich łańcuchów HG, z których jeden posiada pojedyncze wstawienie ramnozy, powodujące zgięcie w strukturze.

W badaniach Gawkowska i in. (2019) wykazano, że struktura DASP jest zależna od warunków kwasowo-zasadowych. W środowisku o niskim pH (4) na powierzchni miki obserwowano typową dla tej frakcji sieć, co wynikało z niskiego odpychania elektrostatycznego między łańcuchami posiadającymi niejonizowane grupy karboksylowe oraz utworzenia wiązań wodorowych. Zwiększenie pH spowodowało wzrost stopnia dysocjacji grup funkcyjnych, co prowadziło do powstania krótkich łańcuchów pektynowych oddalonych od siebie z powodu odpychania elektrostatycznego. W warunkach zasadowych osłanianie zjonizowanych grup karboksylowych przez kationy sodu spowodowało powstanie sieci pektynowej. Agregacja przy wysokim pH (11) wynikała z wysokiego stężenia jonów w ośrodku dyspergującym. W innych badaniach wykazano, że wzrost stężenia DASP powoduje obniżenie

pH, a co za tym idzie wzrost wiązania jonów wodorowych i skrócenie odległości międzycząsteczkowej (Gawkowska i in., 2019). Zjawiska te wpływają na powstanie sieci DASP w czystej wodzie poprzez tworzenie wiązań wodorowych.

Dodanie jonów cynku do 5% roztworu DASP spowodowało zmiany we właściwościach reologicznych tej frakcji (Gawkowska i in., 2018a). Zaobserwowano znaczący wzrost lepkości, co mogło być związane z tworzeniem się sieci pektynowej. Odnotowano również prawie 1,5-krotne zmniejszenie wskaźnika charakterystycznego płynięcia (n) oraz 5-krotne zwiększenie wskaźnika konsystencji (K), co świadczy o wzroście charakteru pseudoplasycznego uzyskanych roztworów. Można podejrzewać, że te interakcje jonów cynku z grupami karboksylowymi i hydroksylowymi jednostek kwasu galakturonowego są do pewnego stopnia podobne do znanego modelu "egg-box", który opisuje, jak wielowartościowe kationy mogą krzyżowo łączyć polielektrolity takie jak alginian w uporządkowany sposób. W przypadku pektyn, jony cynku mogą w podobny sposób koordynować się z ujemnie naładowanymi grupami karboksylowymi kwasu galakturonowego, prowadząc do tworzenia bardziej uporządkowanej, sieciowej struktury żelu.

2. Hipoteza badawcza i cele rozprawy doktorskiej

Hipoteza badawcza

Jak pokazał powyższy przegląd literatury, struktura molekuł pektyn bogatych w RG-I zależy przede wszystkim od obecności ramnozy w łańcuchu głównym RG-I, do której przyłączone są pozostałe cukry proste. Wtrącenie jednostki ramnozy może powodować powstawanie ugięć w konformacji łańcucha głównego RG-I. W porównaniu z liniowymi łańcuchami HG, może to powodować mniejszą ruchliwość molekuł RG-I w roztworze i w wyniku tego zmniejszenie stopnia oddziaływania z innymi cząsteczkami. W konsekwencji, może to skutkować odmiennymi właściwościami funkcjonalnymi RG-I, zarówno sieciującymi w roztworze jak i mechanicznymi w ścianie komórkowej. Frakcja pektyn rozpuszczalna w słabych alkaliach (DASP), oprócz liniowego homogalakturnanu, jest bogata w RG-I. W związku z tym, w niniejszej pracy postawiono hipotezę, że **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.**

Powyższa hipoteza została zweryfikowana w eksperymencie prowadzonym na pektynach DASP ekstrahowanych z dwóch gatunków roślin ogrodniczych (jabłko i marchew). Badano skład monosacharydowy pektyn, ich nanostrukturę, właściwości reologiczne w roztworze oraz właściwości mechaniczne ścian komórkowych oraz analogów ścian komórkowych zawierające pektyny frakcji DASP. Analizowano różnice wynikające z gatunku rośliny oraz powstające w wyniku modyfikacji enzymatycznych ukierunkowanych na usunięcie ramnozy oraz łańcuchów bocznych pektyn RG-I w tej frakcji.

Cele rozprawy doktorskiej

Celem rozprawy doktorskiej była ocena 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.**

Powyższy cel realizowano poprzez następujące cele szczegółowe:

- Określenie struktury i składu chemicznego pektyn frakcji DASP z jabłek i marchwi oraz ich właściwości reologicznych.

- Określenie wpływu modyfikacji enzymatycznej (usunięcie ramnozy oraz łańcuchów bocznych pektyn) na zmiany struktury i właściwości reologicznych pektyn frakcji DASP.
- Określenie wpływu RG-I na właściwości mechaniczne analogów roślinnych ścian komórkowych oraz naturalnych ścian komórkowych.
- Określenie wpływu hydrolizy kwasowej na zmiany struktury i właściwości reologicznych pektyn frakcji DASP.

3. Materiały i metody

3.1. Materiał roślinny

Materiał badawczy w niniejsze rozprawie stanowiły jabłka odmiany Najdared (*Malus domestica* Borkh.) oraz marchew odmiany Brava (*Daucus carota* subsp. *sativus*). Zostały one zebrane w październiku 2020 roku i pochodzą odpowiednio z komercyjnej plantacji znajdującej się w Ostrowcu (52°9'59.60" N, 20°3'23.84" E) oraz z Rolniczego Zakładu Doświadczalnego w Żelaznej (51°51'8.38" N, 20°7'1.76" E). Po zbiorze materiał przechowywano w chłodni w temperaturze 2°C przez dwa dni. Próbkę do badań przygotowano ze 102 kg surowych jabłek i 34 kg surowej marchwi. Oba materiały zostały obrane i pokrojone w plastry. Sok został wyciśnięty za pomocą prasy, a pozostała pulpa została zhomogenizowana i zamrożona w temperaturze -18°C do dalszych analiz.

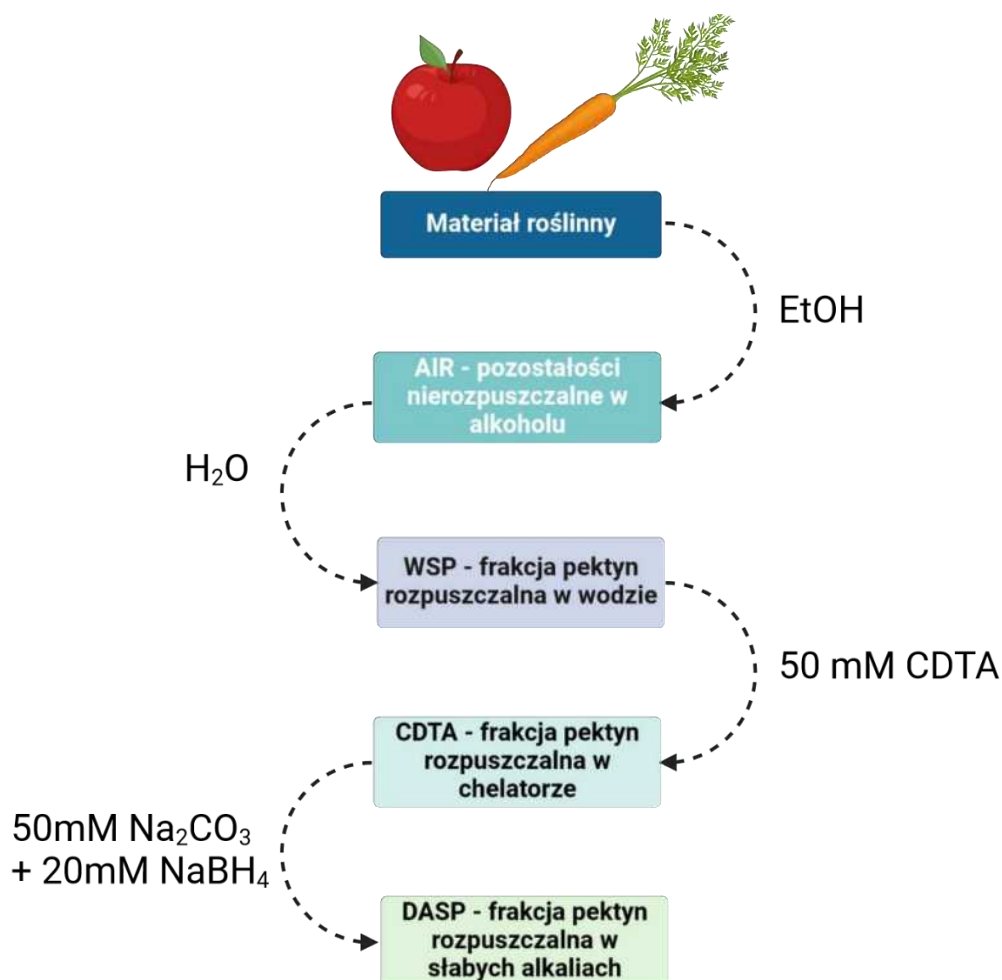
3.2. Izolacja ścian komórkowych (CWM)

Pozostałości nierozpuszczalne w alkoholu (ang. *alcohol insoluble residue*, AIR) przygotowano zgodnie z metodą zaproponowaną przez Renard (2005), z pewnymi modyfikacjami wprowadzonymi przez Gawkowska, Cybulska i Zdunek (2018). Pulpa była mieszana z ~70% etanolem (czysty, p.a., Stanlab, Lublin, Polska) w proporcji wagowej 1:10 (pulpa-EtOH) przez 30 min, a następnie filtrowana na sączku nylonowym. Procedurę powtarzano do momentu odcukrzenia materiału, co sprawdzano za pomocą metody fenolowej według Dubois i in. (1956). Następnie próbki płukano 96% EtOH oraz acetonem (czysty, p.a., Stanlab, Lublin, Polska) i wysuszono w temperaturze 45°C otrzymując materiał ściany komórkowej (CWM)

3.3. Ekstrakcja sekwencyjna pektyn i otrzymanie frakcji DASP

Przeprowadzono ekstrakcję sekwencyjną zgodnie z metodą zaproponowaną przez Redgwell & Selvendran (1986), z pewnymi modyfikacjami opartymi na wcześniejszych badaniach (Gawkowska i in., 2018a; Pieczywek i in., 2020; Posé i in., 2012). Schemat ekstrakcji przedstawiono na Rysunku 3. Materiał ścian komórkowych AIR był mieszany z wodą dejonizową (stosunek 1:9, w/v) przez 24 godziny w temperaturze 21°C, a następnie poddawany wirowaniu (5000 obr./min). Supernatant był zbierany jako frakcja pektyn rozpuszczalna w wodzie (WSP). Osad był mieszany z 0,05 M CDTA (trans-1,2-diaminocykloheksan-N,N,N',N'-tetraoctan, min. 99%, p.a., Roth, Chemat, Gdańsk, Polska), pH 6,5 i mieszany przez 24 godziny w temperaturze 21°C. Po odwirowaniu, supernatant był oddzielany jako frakcja

rozpuszczalna w chelatorze (CSP). Do osadu dodano 0,05 M Na_2CO_3 (węglan sodu, czystość $\geq 99,5\%$, p.a., Sigma-Aldrich, Merck Life Science Sp.z.o.o., Poznań, Polska) i 20 mM NaBH_4 (borowodorek sodu, czystość $\geq 98,0\%$, p.a., Sigma-Aldrich, Merck Life Science Sp.z.o.o., Poznań, Polska) i mieszano przez 24 godziny w temperaturze 21°C . Frakcja pektyn rozpuszczalna w słabych alkaliach (DASP) została zebrana jako supernatant, a następnie dializowana wobec wody dejonizowanej przy użyciu membran ZelluTrans/ROTH® (Carl Roth GmbH & Co. KG, Niemcy; MWCO 3500 Da). Ostatecznie surowiec był liofilizowany.



Rysunek 3. Schemat ekstrakcji sekwencyjnej pektyn. Przygotowano z wykorzystaniem oprogramowania Biorender.

3.4. Modyfikacje enzymatyczne pektyn frakcji DASP

Część frakcji DASP pochodzącą z jabłek i marchwi poddano działaniu enzymów degradujących szkielet RG-I oraz jego łańcuchy boczne. Wykorzystano trzy enzymy:

- Acetyloestraża ramnogalakturonianowa – **RGAE** (BtRme NC (CE NC), BT4158, E.C. 3.1.1) bierze udział w deacetylacji jednostek kwasu galakturonowego w szkielecie RG-I, co umożliwia dostęp innym enzymom do łańcuchów;
- Endoliaza ramnogalakturonianu – **RGL** (BtRge9A (PL9), BT4183, E.C. 4.2.2.23) bierze udział w rozcinaniu wiązań α -1,4 między ramnozą i kwasem galakturonowym;
- Arabinofuranozydaza – **ABF** (CjAbf51B (GH51), E.C. 3.2.1.55) odcina łańcuchy boczne zawierające arabinozę, przyłączonej za pomocą głównie wiązań α -1,2- oraz α -1,3.

Wszystkie enzymy pochodziły od firmy NZYTech i dostarczone były w buforze Na-HEPES (35 mM, pH 7,5; 750 mM NaCl, 200 mM imidazolu, 3,5 mM CaCl₂ oraz 25% v/v glicerolu). Ilości enzymów zostały dobrane na podstawie ich aktywności oraz składu chemicznego DASP z 10% nadmiarem. Na 1 mg DASP użyto 0,22 U RGL; 9,9 U RGAE oraz 2,1 U ABF. Objętości zostały określone na podstawie stężeń białek enzymatycznych (RGAE: 0,5 mg·mL⁻¹; RGL: 0,5 mg·mL⁻¹; ABF: 0,25 mg·mL⁻¹). Roztwory wodne DASP były inkubowane w trzech różnych wariantach mieszanin enzymów (Tabela 2). Jako kontrolę (bez obróbki enzymatycznej) do roztworów wodnych DASP dodano bufor, w którym dostarczono enzymy.

Tabela 2. Lista kodów próbek i opis zastosowanych modyfikacji.

Kod obróbki	Opis
E1	RGAE (9,9 U·mg ⁻¹) + RGL (0,22 U·mg ⁻¹)
E2	ABF (2,1 U·mg ⁻¹)
E3	RGAE (9,9 U·mg ⁻¹) + RGL (0,22 U·mg ⁻¹) + ABF (2,1 U·mg ⁻¹)
BUFFER	35 mM Na-HEPES, pH 7,5, 750 mM NaCl, 200 mM imidazol, 3,5 mM CaCl ₂ oraz 25% (v/v) glicerol

RGAE, acetyloestraża ramnogalakturonianowa; RGL, endoliaza ramnogalakturonianu; ABF, arabinofuranozydaza.

Wartości pH wszystkich badanych roztworów mieściły się w zakresie od 7,30 do 7,60. Zarówno próbki kontrolne, jak i te poddane działaniu enzymów, inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 120 minut. Po inkubacji próbki były schłodzone w łaźni lodowej przez 5 minut w celu zatrzymania reakcji enzymatycznych, wymieszane i wykorzystane do dalszej analizy.

3.5. Analiza zawartości monosacharydów i kwasów uronowych

Zawartość poszczególnych monosacharydów i kwasów uronowych w próbkach oznaczono według metody opracowanej przez Zhang S. i in. (2018), z pewnymi modyfikacjami zgodnie z Cybulska i in. (2022). Początkowo prowadzono metanolizę 2 mg DASP z 2 M metanolem w roztworze HCl (~1,25 M HCl (T), do derywatyzacji GC, LiChropur™) w temperaturze 80°C przez 72 godziny. Następnie próbkę hydrolizowano z użyciem 2 mL 3 M kwasu trifluorooctowego (czystość $\geq 99,0\%$, p.a., Merck Life Science sp. z o.o., Poznań, Polska) w temperaturze 100°C przez 7 godzin. Uwolnione monosacharydy i kwasy uronowe zostały zderywatyzowane z użyciem PMP (3-metylo-1-fenilo-2-pirazolin-5-on (czystość 99%, p.a. Thermo Scientific Chemicals, Waltham, MA USA) przez dodanie 1 mL wody i 50 μ L 0,3 M wodorotlenku sodu (czysty p.a., Avantor Performance Materials S.A., Gliwice, Polska), wymieszanie, a następnie dodanie 50 μ L roztworu 0,5 M metanolemowego PMP. Po inkubacji w temperaturze 70°C przez 60 minut, próbkę schłodzono, zneutralizowano 50 μ L 0,3 M kwasem chlorowodorowym (35–38%, czysty, p.a., Avantor Performance Materials S.A., Gliwice, Polska), a następnie ekstrahowano chloroformem (czystość $\geq 99,5\%$, HPLC Grade, Thermo Scientific Chemicals, Waltham, MA USA). Następnie, 20 μ L przefiltrowanych pochodnych PMP wstrzykiwano do systemu HPLC (Sykam GmbH, Gewerbering, Niemcy) wyposażonego w kolumnę Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 mm śr. wewn. $\times$ 250 mm, 5 μ m) w połączeniu z kolumną ochronną Agilent Eclipse XDB-C18 (4,6 mm śr. wewn. $\times$ 12,5 mm, 5 μ m), oraz detektorem PDA S 3350 (Sykam GmbH, Gewerbering, Niemcy). Separacja chromatograficzna składników przeprowadzana była w temperaturze 30°C, przy użyciu fazy ruchomej składającej się z A (0,1 M buforu fosforanowego (pH 6,7)) i B (50% (v/v) roztwór 0,1 M buforu fosforanowego w acetonitrylu) w stosunku A:B 69:31% (v/v) oraz prędkości przepływu 1,8 mL $\cdot$ min⁻¹. Detekcja odbywała się przy długości fali 246 nm. Próbkę analizowano w trzech powtórzeniach. Identyczną procedurę analityczną zastosowano dla standardów monosacharydów i kwasów uronowych: arabinoza, fukoza, galaktoza, kwas galakturonowy, glukoza, kwas glukuronowy, mannoza, ramnoza i ksyloza (Sigma-Aldrich, Merck Life Science Sp.z.o.o., Poznań, Polska). Analizę przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

3.6. Chromatograficzne oznaczenie stopnia metylacji (DM) i acetylacji (DA)

W celu oznaczenia DM i DA pektyn, próbki były zmydlane z użyciem 0,2 M NaOH w celu wytworzenia metanolu i kwasu octowego, oznaczanych następnie za pomocą HPLC (kolumna C18, Bionacom velocity LPH-C18, 300 Å, 4,6 × 250 mm, 5 mikronów, detektor RI), zgodnie z metodą zaproponowaną przez Levigne i in. (2002) z pewnymi modyfikacjami według Yu i in. (2021). Próbki pektyn (5 mg) roztworzano w 0,5 mL 0,2 M NaOH i inkubowano w temperaturze 4 °C przez 120 minut. Następnie mieszaninę zneutralizowano przy użyciu 0,5 mL 0,2 M H₂SO₄ (95–98%, Sigma Aldrich, Merck Life Science Sp.z.o.o., Poznań, Polska), odwirowano przez 10 minut, przefiltrowano przez filtr strzykawkowy (0,22 µm) i wstrzykiwano do systemu HPLC (objętość wstrzyknięcia 20 µL, faza ruchoma 4 mM kwas siarkowy przy przepływie 0,8 mL·min⁻¹). W tych samych warunkach przygotowano i analizowano standardowe roztwory metanolu i kwasu octowego. Analizę przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

3.7. Miareczkowe oznaczenie stopnia metylacji (DM)

Stopień metylacji pektyn został oznaczony również metodą zgodną z Food Chemical Codex (FCC, 1981) oraz USP 26 NF 21 (2003), opisaną przez Wai i in. (2010) z pewnymi modyfikacjami. Wysuszona próbka (500 mg) została zwilżona 2 mL 96% EtOH, a następnie całkowicie rozpuszczona w 100 mL wody dejonizowanej. Do mieszaniny dodawano pięć kropli 1% etanolowego roztworu fenoloftaleiny jako wskaźnika, a następnie prowadzono miareczkowanie z użyciem 0,5 M roztworu wodorotlenku sodu, a wynik odnotowano jako objętość początkową. Następnie dodano 10 mL 0,5 M NaOH. Próbka została energicznie wstrząśnięta i pozostawiona w temperaturze pokojowej. Po 15 minutach dodano 10 mL 0,5 M HCl i mieszano do zaniku różowej barwy. Ponownie dodano fenoloftaleinę, i miareczkowano roztwór za pomocą 0,5 M NaOH do uzyskania lekko różowego koloru, który utrzymywał się po energicznym wstrząśnięciu (punkt końcowy miareczkowania), co oznaczono jako objętość końcową. Analiza została przeprowadzona w trzech powtórzeniach. Stopień metylacji obliczono według równania (1).

$$\%DM = \frac{\text{objętość końcowa [mL]}}{\text{objętość początkowa [mL]} + \text{objętość końcowa [mL]}} \times 100 \quad (1)$$

3.8. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)

Widma liofilizatów DASP w podczerwieni zebrano w temperaturze pokojowej przy użyciu spektrometru FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Madison, WI, USA), wyposażonego w przystawkę Smart iTR ATR. Wszystkie próbki badano w tych samych warunkach, zgodnie z metodą opisaną wcześniej przez Chylińska i in. (2016). Widma zebrano w zakresie od 4000 cm^{-1} do 650 cm^{-1} , z rozdzielczością wynoszącą 4 cm^{-1} . Korektę linii bazowej przeprowadzono za pomocą oprogramowania OMNIC (Thermo Scientific, Madison, WI, USA). Finalne widma uzyskano poprzez uśrednienie wyników z pięciu kolejnych analiz, gdzie na każdą przypadało 200 skanów oraz znormalizowane do wartości 1,0 przy 1013 cm^{-1} za pomocą programu OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

3.9. Pomiary AFM

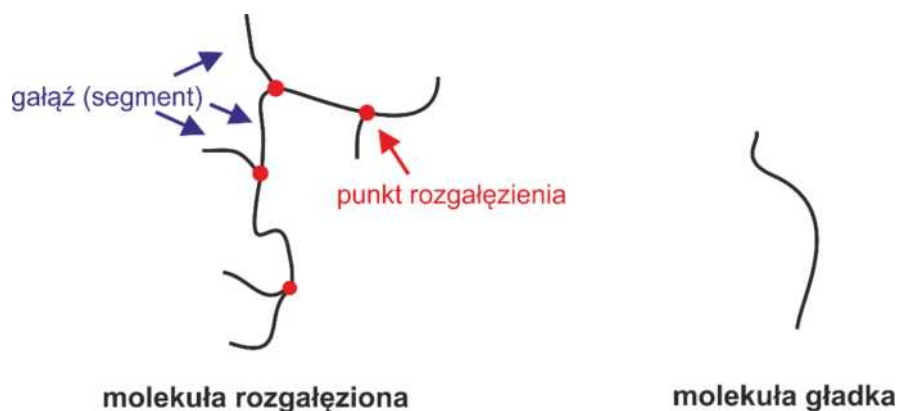
3.9.1. Obrazowanie topograficzne

Do przygotowania roztworów pektyn frakcji DASP użyto wody HPLC (Sigma-Aldrich Merck Life Science Sp.z.o.o., Poznań, Polska). Wykonano stężenia $0,02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ o objętości $30\text{ }\mu\text{L}$. Próbkę do AFM przygotowano poprzez nakropienie na mikę wodnego roztworu DASP i rozprowadzenie za pomocą powlekacza obrotowego (spin coater) POLOS SPIN150i NPP (SPS-Europe B.V., Putten, Holandia). Następnie próbki suszono przez noc w eksykatorze w temperaturze 22°C . Obrazy były rejestrowane za pomocą mikroskopu sił atomowych Multimode 8 współpracującym z kontrolerem NanoScope V (Bruker, Billerica, MA, USA) z użyciem sondy ScanAsyst-Air-HR (Bruker, Billerica, MA, USA) o współczynniku sprężystości $0,4\text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$. Zastosowano następujące ustawienia skanowania: rozmiar skanu $4 \times 4\text{ }\mu\text{m}$ przy rozdzielczości 1024×1024 punktów i szybkości skanowania $3,91\text{ Hz}$. Zebrano co najmniej 10 obrazów każdej próbki, reprezentujących różne obszary miki.

3.9.2. Analiza obrazu

Wstępne przetwarzanie obrazów zostało przeprowadzone przy użyciu oprogramowania Gwyddion 2.52 (Nečas & Klapetek, 2012). Ekstrakcja widocznych na obrazach wysokościowych molekuł, segmentyzacja oraz obliczenia parametrów geometrycznych zostały przeprowadzone przy pomocy aplikacji pracującej w środowisku Matlab R2011a (MathWorks, Natick, MA, USA). Obiekty na obrazach AFM zostały sklasyfikowane do jednego z dwóch typów struktur: "rozgałęzione" i "gładkie" (Rysunek 4). Jedna gałąź (segment) została zdefiniowana jako odcinek między najbliższymi punktami rozgałęzienia (czerwone kropki na

Rysunku 4) lub do końca molekuly. Wyznaczano cztery parametry: (1) całkowitą długość molekuł rozgałęzionych, jako suma długości ich wszystkich gałęzi, (2) długość molekuly gładkiej, (3) długość pojedynczej gałęzi, (4) średnią liczbę gałęzi na molekulę.



Rysunek 4. Schemat struktur wyodrębnionych na podstawie topologicznych obrazów AFM.

3.9.3. Długość persystentna

W celu oszacowania długości persystentnej (ang. *persistence length*), włókna zobrazone na mice za pomocą AFM analizowano za pomocą oprogramowania FiberApp (Usov & Mezzenga, 2015) przy użyciu podejścia opartego na tzw. *mean-squared end-to-end distance, MSED*. W metodzie tej obliczana jest średnia wartość kwadratu odległości pomiędzy końcami łańcucha polimerowego, co umożliwia określenie jego długości persystentnej, czyli odległości, na jakiej zanikają korelacje w kierunku stycznym. Metoda MSED dla modelu WLC (ang. *worm-like chain*) jest opisana teoretyczną zależnością przedstawioną równaniem (2):

$$\langle R^2 \rangle = 4\lambda \left[l - 2\lambda(1 - e^{-\frac{l}{2\lambda}}) \right], \quad (2)$$

gdzie:

λ – długość persystentna; R – bezpośrednia odległość między dowolną parą segmentów wzdłuż konturu, oddzielonych długością łuku l (Usov & Mezzenga, 2015).

3.10. Statyczne rozpraszanie światła laserowego

Metoda statycznego rozpraszania światła laserowego (ang. *Static Light Scattering, SLS*) z wykorzystaniem wykresu Debye'a została wykorzystana do określenia średnich wagowo mas cząsteczkowych (MW) (Hiemenz & Lodge, 2007; Puskás i in., 2013). Roztwory DASP w zakresie niskich stężeń (0,006–0,100% m/w) przygotowano poprzez rozcieńczenie roztworu

wyjściowego (2% m/w) wodą MiliQ (Typ 1; System oczyszczania wody Direct-Q® 3 UV, Merck Millipore, Merck Life Science Sp. z o.o., Poznań, Polska). Próbki początkowo wymieszano za pomocą wytrząsarki typu vortex (Velp Scientifica, Usmate, Włochy), a następnie pozostawiono na rotatorze (neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Niemcy) przez 24 godziny w temperaturze $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Oznaczono współczynniki załamania światła dla czystej wody (rozpuszczalnika) i roztworów (Refraktometr kieszonkowy, RI 1.3306–1.5284, Atago Ltd., Tokyo, Japonia) w temperaturze 20°C . Toluen (standard analityczny, czystość $\geq 99,9\%$ według GC; Merck Life Science Ltd., Poznań, Polska) został użyty jako standard. Pomiar rozproszenia światła pod pojedynczym kątem (173°) (633 nm) został przeprowadzony za pomocą aparatu Zetasizer Nano ZS (Malvern Ltd., Malvern, Wielka Brytania) przy co najmniej 12 pomiarach, w trzech powtórzeniach. Oprogramowanie automatycznie obliczyło masę cząsteczkową (MW) oraz drugi współczynnik wiralny danego polisacharydu na podstawie analizy rozpraszania światła szeregu roztworów wodnych z rosnącym stężeniem DASP.

3.11. Pomiary reologiczne

Pomiary reologiczne przeprowadzono w temperaturze 20°C przy użyciu reometru hybrydowego Discovery (HR-1) firmy TA Instruments (New Castle, PA, USA) wyposażonym w układ pomiarowy typu stożek-płytki (o średnicy 40 mm i kącie $2,007^\circ$) z szerokością szczeliny 0,56 mm.

3.11.1. Właściwości lepkosprężyste

Test oscylacyjny przeprowadzono dla 6% (m/v) wodnych roztworów DASP. Wyznaczano moduł zachowawczy (G') i moduł stratności (G''). Pomiary przeprowadzono przy częstotliwości 0,5 Hz i logarytmicznym skoku amplitudy odkształcenia w zakresie od 0,1 do 100% (25 punktów na dekadę).

3.11.2. Krzywe płynięcia

Zależności naprężenia ścinającego od prędkości ścinania (krzywe płynięcia) mierzono w zakresie prędkości ścinania $10\text{--}600\text{ s}^{-1}$ oraz $600\text{--}10\text{ s}^{-1}$ (skok logarytmiczny, 15 punktów na dekadę). Lepkość została zarejestrowana przy prędkości ścinania 10 s^{-1} . Do uzyskania krzywych płynięcia i określenia zachowania reologicznego próbek zastosowano model potęgowy (model Ostwalda–de Waele'a) oraz model Herschela i Bulkleya.

Model potęgowy Ostwalda de Waele'a jest opisany równaniem (3):

$$\sigma = K\gamma^n \quad (3)$$

gdzie:

σ – naprężenie ścinające (Pa); K – współczynnik konsystencji ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$); γ – prędkość ścinania (s^{-1}); n – wskaźnik płynięcia.

Model Herschela i Bulkleya jest opisany równaniem (4):

$$\sigma = \sigma_0 + K\gamma^n \quad (4)$$

gdzie: σ – naprężenie ścinające (Pa); σ_0 – graniczna wartość naprężenia ścinającego (granica płynięcia) (Pa); K – współczynnik konsystencji ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$); γ – prędkość ścinania (s^{-1}); n – wskaźnik płynięcia.

3.11.3. Graniczna liczba lepkościowa (lepkość istotna)

Graniczna liczba lepkościowa (lepkość istotna) opisuje względny wzrost lepkości roztworu w stosunku do czystego rozpuszczalnika. Pomiarów dokonano w wodnych dyspersjach DASP ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ do $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) na podstawie pomiarów lepkości przy zmiennej prędkości ścinania $10\text{--}400 \text{ s}^{-1}$ oraz od $400\text{--}10 \text{ s}^{-1}$ (skok logarytmiczny; 25 punktów na dekadę). Lepkość istotna (η) została wyznaczona przez ekstrapolację do stężenia równego zero zgodnie z równaniem (5) (Huggins, 1942):

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_H[\eta]^2c \quad (5)$$

gdzie: η_{sp} – lepkość (specyficzna) właściwa, obliczona na podstawie lepkości względnej ($\eta_{\text{roztworu}}/\eta_{\text{rozpuszczalnika}}$), c – stężenie roztworu polimeru, k_H – stała Hugginsa.

3.12. Analiza statystyczna

Wszystkie analizy chemiczne i reologiczne przeprowadzono co najmniej trzykrotnie. Wyniki obliczano jako wartości średnie i podawano z odchyleniem standardowym lub błędem standardowym. Testy statystyczne (test t-Studenta, wieloczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya) mające na celu określenie istotnych różnic między próbami przeprowadzono przy użyciu pakietu „stats” (wersja 4.1.2.) firmy R (R Core Team, 2013) i Statistica 13.1 (StatSoft, Kraków, Polska). Istotność statystyczną oceniano na poziomie $p < 0,05$.

4. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach

4.1. Publikacja P1 (Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review)

Kaczmarska A., Pieczywek P., Cybulska J., Zdunek A., 2022, *Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review*, *Carbohydrate Polymers*, 278, 118909.

Celem publikacji przeglądowej P1 było podsumowanie wyników dotychczas badań struktury chemicznej i konformacji cząsteczek oraz funkcji RG-I w roślinie i w warunkach *in vitro* w roztworach. W publikacji omówiono strukturę chemiczną i fizyczną RG-I, jako kluczowego składnika pektyn występujących w ścianach komórkowych roślin. Zebrano szczegółowe informacje na temat budowy RG-I, w tym jego szkieletu oraz łańcuchów bocznych zbudowanych z cukrów prostych. Przeanalizowano także właściwości fizyczne RG-I, takie jak konformacja helikalna i funkcje pełnione przez RG-I w ścianach komórkowych roślin, włączając w to jego rolę w strukturalnej organizacji ścian komórkowych, zmiany strukturalne podczas dojrzewania oraz właściwości reologiczne w warunkach *in vitro*. Dodatkowo, omówiono wpływ różnych czynników, takich jak stopień metylacji, na właściwości żelujące i lepkość RG-I.

Przegląd literatury, obejmujący wyniki badań nad różnymi źródłami roślin, wskazuje na wysokie zróżnicowanie w składzie i funkcjach RG-I w zależności od gatunku rośliny i etapu jej rozwoju. Na podstawie informacji zawartych w pracy, sformułowano następujące podsumowanie obecnego stanu wiedzy:

- Szkielet RG-I składa się z powtarzających się jednostek GalA-Rha. Do jednostek ramnozy przyłączone są łańcuchy boczne, zbudowane głównie z arabinanów i/lub galaktanów, a rzadko arabinogalaktanów i innych grup. Długość domen RG-I oraz stopień rozgałęzienia różnią się między roślinami.
- RG-I wykazuje konformację tzw. losowego kłęбка (ang. *random coil*) w roztworze oraz wysoką lepkość właściwą, tworząc sieci w określonych warunkach. Obecność RG-I ma wpływ na właściwości reologiczne pektyn w roztworze. Cukry obojętne wchodzące w skład łańcuchów bocznych mają również wpływ na tworzenie sieci podczas żelowania. Struktura przypominająca wygięte pręty stworzona przez wtrącenia Rha

może również promować większy stopień ruchliwości i interakcji molekularnych, natomiast inkluzje ramnozy w konformacji trzykrotnej (3_1) helisy powodują zwiększenie elastyczności i większą średnicę molekuly. Nie mają one jednak istotnego wpływu na ogólny kształt molekuly ze względu na samoistne znoszenie się efektu strukturalnego kolejnych sparowanych reszt Rha.

- Obserwuje się istotne zmiany strukturalne w RG-I podczas dojrzewania i przechowywania w zależności od źródła pektyn. Łańcuchy boczne, zarówno galaktanowe, jak i arabinanowe są związane zarówno z jądrem tkanki, jak i z fizycznymi i funkcjonalnymi właściwościami ścian komórkowych.

4.2. Publikacja P2 (A mini-review on the plant sources and methods for extraction of rhamnogalacturonan)

Kaczmarek A., Pieczywek P., Cybulska J., Cieśla J., Zdunek A., 2023, A mini-review on the plant sources and methods for extraction of rhamnogalacturonan I, Food Chemistry, 403.134378.

W publikacji przeglądowej P2 szczegółowo podsumowano czynniki związane z materiałem wyjściowym i technikami ekstrakcji, które determinują wydajność i skład chemiczny pektyn regionu RG-I. Przeanalizowano wpływ źródła pektyn, rozpuszczalnika, pH, temperatury, czasu oraz dodatkowych czynników związanych z zastosowanymi technikami, takimi jak mikrofały, ultradźwięki, wysokie i niskie ciśnienie, czy traktowanie enzymatyczne.

Ilości RG-I wyekstrahowane ze ścian komórkowej roślin różnią się w zależności od źródła roślinnego i zastosowanej techniki pozyskiwania. Wysoki udział tej domeny w ogólnej zawartości pektyn zazwyczaj wiąże się z obecnością rozgałęzionych łańcuchów bocznych, wyrażonym przez większe ilości cukrów prostych. Tradycyjne metody ekstrakcji RG-I zwykle obejmują ekstrakcję kwasem, zasadą, wodą, chelatorem lub kombinacją tych rozpuszczalników w procesie sekwencyjnym. Techniki wspomagające, takie jak mikrofały, ultradźwięki, enzymy i wysokie ciśnienie, mogą być połączone z tradycyjnymi metodami, co prowadzi do zwiększenia wydajności. Najczęściej stosowaną techniką ekstrakcji frakcji bogatych w RG-I jest ekstrakcja w środowisku zasadowym, pozwalająca na zachowanie w stanie nienaruszonym łańcuchów bocznych. Jednakże wykazano, że odpowiednio dostosowane kombinacje (np. woda i kwas cytrynowy z enzymami) mogą zapewnić wysokie wydajności, niemalże nie naruszając struktury. Choć najpopularniejszymi źródłami ekstrakcji pektyn są cytrusy i jabłka, liczne

badania wykazały, że inne źródła mogą być równie skuteczne, wśród których szczególnie interesujące wydają się odpady z przemysłu przetwórczego.

Wysoka zmienność ścian komórkowej roślin sprawia, że opracowanie uniwersalnych procedur ekstrakcji pektyny jest wyzwaniem. Metody te muszą być dopasowane do źródła pektyn aby zapewnić pożądane wydajności i właściwości strukturalne ekstrahowanych polisacharydów.

4.3. Publikacja P3 (Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot)

Kaczmarska A., Pieczywek P., Cybulska J., Cieśla J., Zdunek A., 2024, Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot, Food Chemistry, 446, 138869.

W publikacji P3 przedstawiono wyniki badań dotyczące analiz struktury oraz reologii natywnej frakcji rozpuszczalnej w słabych alkaliach (DASP), ekstrahowanej z dwóch różnych źródeł: jabłek i marchwi. Celem badań było zrozumienie podobieństw i różnic w składzie chemicznym, strukturze, a co za tym idzie właściwościach reologicznych i molekularnych frakcji DASP.

4.3.1. Skład chemiczny frakcji DASP

Analiza monosacharydów za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykazała, że frakcja DASP złożona jest głównie z kwasu galakturonowego, arabinozy, galaktozy i ramnozy w różnych proporcjach, odpowiednio 57,3 mol%, 24,9 mol%, 9,4 mol%, 3,6 mol% dla owoców jabłoni oraz 43,3 mol%, 18,2 mol%, 27,9 mol%, 8,4 mol% dla korzenia marchwi. Dla pektyn z jabłka odnotowano wyższą zawartość kwasu galakturonowego i arabinozy, natomiast w przypadku pektyn z marchwi, frakcja była bogatsza w galaktozę i ramnozę, co ma swoje odzwierciedlenie w stosunku domen HG i RG-I dla tych źródeł. DASP ekstrahowana z jabłek wykazała wyższą zawartość HG (53,70 mol%) w porównaniu z RG-I (41,50 mol%), podczas gdy DASP z marchwi zawierała mniej HG (34,90 mol%) przy większym udziale RG-I (62,90 mol%).

Analiza spektroskopowa FTIR potwierdziła obecność charakterystycznych pasm dla pektyn z obu materiałów, jednak intensywność tych pasm różniła się ze względu na różnice w składzie chemicznym. Piki mające maksima przy liczbie falowej 1597 cm⁻¹ oraz 1406 cm⁻¹ są charakterystyczne dla drgań odpowiednio asymetrycznych i symetrycznych jonów COO⁻.

Charakterystyczny dla pektyn pik pojawia się również przy liczbie falowej 1320 cm^{-1} i odpowiada drganiom zginającym C-H w pierścieniu aromatycznym. Przy liczbie falowej 1142 cm^{-1} obserwuje się drgania rozciągające C-O-C w wiązaniu glikozydowym, natomiast przy 1094 cm^{-1} drgania rozciągające C-O i C-C w pierścieniu. Pik przy 1070 cm^{-1} odpowiada drganiom rozciągającym C-O oraz zginającym C-C. Sygnałowi przy długości fali 1014 cm^{-1} przypisano drgania rozciągające C-O i C-C w grupie atomów C2-C3, C2-O2, C1-O1, natomiast piki przy długościach fali 890 i 835 cm^{-1} odpowiadają kolejno drganiom zginającym C-H oraz drganiom deformacyjnym pozapłaszczyznowym C-OH w pierścieniu aromatycznym. Brak pików w zakresie $1745\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ odpowiadającemu absorpcji zestryfikowanych grup karboksylowych cząsteczek pektyn, sugeruje brak metylestryfikacji w badanej frakcji pektyn dla obu źródeł, co spowodowane jest prawdopodobnie hydrolizą wiązań estrowych podczas ekstrakcji alkalicznej. Zerowy stopień estryfikacji potwierdzono metodą miareczkową.

4.3.2. Struktura molekuł frakcji DASP

Na obrazach AFM natywnej frakcji DASP ściany komórkowej wyizolowanej z jabłka oraz marchwi, pektyny tworzyły struktury złożone ze stosunkowo długich odcinków liniowych, rozdzielonych lokalnie występującymi punktami zgięć lub rozgałęzień. W niektórych miejscach obecne były również amorficzne agregaty skoncentrowane przy fragmentach liniowych. Na podstawie topologicznych obrazów AFM wyznaczono parametry molekuł natywnej frakcji, dotyczące długości molekuł liniowych, rozgałęzionych oraz długości i liczby rozgałęzień.

Średnia długość rozgałęzionych włókien dla DASP z jabłek wynosiła $287,3\text{ nm}$, podczas gdy dla DASP z marchwi długość była mniejsza i wyniosła $188,6\text{ nm}$. Pojedyncze rozgałęzienie dla DASP z jabłek miało długość $45,6\text{ nm}$, w porównaniu do $36,2\text{ nm}$ dla DASP z marchwi. Cząsteczki pektyn ekstrahowane z jabłek były również bardziej rozgałęzione: średnia liczba gałęzi na jedną cząsteczkę wynosiła $6,1$, podczas gdy dla pektyn z marchwi było to $5,1$. Średnia długość persystentna DASP wynosiła $42,8\text{ nm}$ dla jabłka i $40,1\text{ nm}$ dla marchwi, a uzyskane wartości były większe niż te, które zazwyczaj podawane są w literaturze dla różnych domen pektynowych ($4,5\text{--}15\text{ nm}$). Oceniono, że możliwym powodem tych różnic jest zastosowanie metody AFM do oceny tego parametru, podczas gdy większość poprzednich oznaczeń bazowała na metodach hydrodynamicznych.

4.3.3. Właściwości reologiczne i molekularne frakcji DASP

Z przebiegu krzywych uzyskanych teście oscylacyjnym przy zmiennej amplitudzie odkształcenia i stałej częstotliwości wynika, że oba badane żele wykazują przewagę cech sprężystych ($G' > G''$) oraz przebieg charakterystyczny dla układów, których łańcuchy uległy splątaniu. Natomiast przy wyższych wartościach odkształcenia ulegają rozplątaniu i ułożeniu w kierunku przepływu. Uzyskana wartość modułu G' jest wyższa w przypadku frakcji z jabłka, natomiast szerszy zakres liniowej lepkości wykazywała frakcja z marchwi. Również punkt płynięcia był wyższy dla pektyn z marchwi – minimalna wartość odkształcenia powodująca zniszczenie struktury żelu wyniosła 7,57% dla jabłka oraz 9,15% dla marchwi. Dla uzyskanych roztworów, modelem opisującym układ z największą dokładnością był model Ostwalda de Waele'a. Oba płyny zakwalifikowano jako pseudoplastyczne rozrzedzane ścinaniem ($n < 1$). Oznacza to, że ich lepkość pozorna malała wraz ze wzrostem szybkości ścinania. Współczynnik konsystencji K związany jest z lepkością próbki. Wyższa wartość tego parametru w modelu odnotowana została dla marchwi ($K = 1,8$), natomiast niższa dla jabłka ($K = 0,6$), co wraz z niską wartością n świadczy o tym, że frakcja z marchwi wykazywała wyższą pseudoplastyczność roztworów. Wyznaczono również lepkość istotną pektyn - uzyskano wartości $194,91 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ i $186,79 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ odpowiednio dla jabłka i marchwi. Lepkość istotna jest ściśle związana z masą cząsteczkową oraz długością polimeru, a co za tym idzie sztywnością łańcucha. Można podejrzewać, że żele uzyskane z frakcji jabłkowej były silniej związane, podczas gdy te z frakcji z marchwi były bardziej odporne na odkształcenia mechaniczne. Silniejsze żelopodobne roztwory jabłkowego DASP mogą wynikać z wyższej zawartości arabinozy, która sprzyja tworzeniu zwartej struktury i większemu rozgałęzianiu cząsteczek. Z kolei DASP z marchwi zawierała więcej ramnozy (8,4 mol%), czyli ponad dwukrotnie w porównaniu do DASP z jabłka, jednakże cząsteczki marchwi były mniej rozgałęzione ($(\text{Gal} + \text{Ara})/\text{Rha} = 5,49$). Średnia wagowo masa cząsteczkowa DASP wyniosła $895 \pm 76 \text{ kDa}$ dla próbek z jabłka oraz $886 \pm 99 \text{ kDa}$ dla marchwi. Nieznacznie wyższa masa cząsteczkowa oraz lepkość próbek z jabłka mogły być konsekwencją większej zawartości HG w DASP w porównaniu do frakcji marchwiowej, która zawierała więcej RG-I.

4.4. Publikacja P4 (Effect of enzymatic modification on the structure and rheological properties of diluted alkali-soluble pectin fraction rich in RG-I)

Kaczmarska A., Pieczywek P., Cybulska J., Zdunek A., 2024, Effect of enzymatic modification on the structure and rheological properties of diluted alkali-soluble pectin fraction rich in RG-I, Scientific Reports, 14, 11454.

W publikacji P4 przedstawiono wyniki badań dotyczące zmian w strukturze DASP w wyniku działania enzymów degradujących szkielet główny oraz łańcuchy boczne RG-I:

- Acetyloestraża ramnogalakturonianowa – RGAE (BtRme NC (CE NC), BT4158, E.C. 3.1.1) bierze udział w deacetylacji jednostek kwasu galakturonowego w szkielecie RG-I, co umożliwia dostęp innym enzymom do łańcuchów;
- Endoliaza ramnogalakturonianu – RGL (BtRge9A (PL9), BT4183, E.C. 4.2.2.23) bierze udział w rozcinaniu wiązań α -1,4 między ramnozą i kwasem galakturonowym;
- Arabinofuranozydaza – ABF (CjAbf51B (GH51), E.C. 3.2.1.55) odcina łańcuchy boczne zawierające arabinozę, przyłączonej za pomocą głównie wiązań α -1,2- oraz α -1,3.

Enzymy stosowano w trzech kombinacjach (E1, E2, E3), opisanych rozdziale 3.4.

Celem pracy była charakterystyka strukturalna oraz badania reologiczne właściwości frakcji DASP ekstrahowanych z dwóch źródeł ogrodniczych (jabłko i marchewka) i strukturalnie zmienionych poprzez modyfikację enzymatyczną. Modyfikacja enzymatyczna miała na celu zmiany struktury domeny RG-I i ocenę wpływu ramnozy i arabinozy na właściwości reologiczne frakcji DASP.

4.4.1. Zmiany struktury molekuł DASP w wyniku degradacji enzymatycznych

Jak pokazano w pracy P3, natywne próbki DASP inkubowane w buforze tworzą na mice struktury o liniowych segmentach o zmiennej długości oddzielonymi punktami zgięć lub rozgałęzień. Wcześniej podobne struktury obserwowano dla frakcji DASP z jabłek, marchwi lub gruszek, co było tłumaczone wtrąceniami ramnozy w łańcuchach homogalakturonanu. Podobna struktura DASP, bez znaczących różnic w stosunku do próbki umieszczonej w samym buforze, tworzyła się po zastosowaniu modyfikacji E1 (RGAE+RGL) powodującej deacetylację i następnie rozcięcie wiązania Rha-GalA. W próbce traktowanej E2 (ABF)

obserwowano jednak znacznie większe agregaty i dłuższe łańcuchy, szczególnie dla próbek z marchwi. Dodatkowo, zarówno dla traktowania E2, jak i kombinacji trzech enzymów (E3), zauważalne były krótkie łańcuchy i małe cząsteczki. Na podstawie analizy obrazów AFM, klasyfikowano różne struktury jako cząsteczki "rozgałęzione" oraz "liniowe". Długości molekuł rozgałęzionych przed umieszczeniem w buforze wynosiły około 585 ± 23 nm i 443 ± 23 nm odpowiednio dla DASP z jabłek (DASP-A) i marchwi (DASP-C), co jest zgodne z wcześniejszymi badaniami, które wykazały długości krzeseł od 20 do 1000 nm dla frakcji pektynowych ekstrahowanych z różnych owoców.

Po inkubacji pektyn w samym buforze przez 120 minut, długości molekuł rozgałęzionych nie zmieniły się znacząco dla jabłek, podczas gdy zwiększyły się dla marchwi. Długości cząsteczek liniowych przed umieszczeniem w buforze były krótsze niż 100 nm, a inkubacja z buforem przez 120 minut spowodowała ich skrócenie dla DASP-A oraz nieznaczny wzrost dla DASP-C. Efekt inkubacji z buforem sugeruje, że pektyny mogą ulegać zmianom strukturalnym prowadzącym do samoagregacji. Biorąc pod uwagę, iż inkubacja prowadzona była w buforze o pH 7, wynik ten może być podobny do wcześniej uzyskanego dla pektyn frakcji DASP z jabłek i można go wyjaśnić mechanizmem elektrostatycznego odpychania między całkowicie zdysocjowanymi makrocząsteczkami, które prawdopodobnie blokują tworzenie się rozszerzonych konformacji łańcuchów pektynowych.

Najbardziej wyraźny efekt na strukturę DASP w obu materiałach uzyskano po zastosowaniu ABF (traktowanie E2) powodującym degradację arabinozy. Po inkubacji obserwowano znaczny wzrost całkowitej długości cząsteczek rozgałęzionych (do prawie 1500 nm po 120 minutach). Efekt ten był wyraźnie związany ze wzrostem liczby segmentów i ich nieznacznym skróceniem. W przeciwieństwie do zastosowania jedynie ABF, jednoczesne działanie tego enzymu wraz z RGAE i RGL (traktowanie E3) nie spowodowało agregacji i nie zwiększyło długości cząsteczek rozgałęzionych. Po inkubacji E3, wartości tych parametrów wynosiły odpowiednio 576 ± 26 nm i 356 ± 12 nm dla DASP-A i DASP-C. Obserwowano zmniejszenie liczby rozgałęzień na cząsteczkę, z siedmiu rozgałęzień bocznych dla obu źródeł do sześciu dla jabłka i pięciu dla pektyn z marchwi. Skrócenie cząsteczek rozgałęzionych oraz spadek liczby rozgałęzień w wyniku działania RGAE+RGL+ABF, był bardziej wyraźny dla DASP-C niż dla DASP-A. Większa fragmentacja łańcucha pektynowego marchwi mogła wynikać z większej zawartości RG-I w porównaniu do jabłka, jak opisano wcześniej w pracy P3, co zapewnia więcej miejsc działania enzymów ukierunkowanych na degradację tej domeny pektyn w DASP. Inkubacja w mieszaninie enzymów E1 nie spowodowała znaczących różnic

w długościach rozgałęzień w żadnym przypadku. Podejrzewa się, że funkcjonowanie enzymu RGL, powodującego rozcięcie wiązania Rha-GalA, mogło zostać ograniczone z powodu gęsto występujących łańcuchów bocznych arabinozy, które uniemożliwiają dostęp do szkieletu głównego RG-I.

Zmniejszenie długości segmentu, obserwowane dla działania ABF, oznacza skrócenie się łańcuchów bocznych. Ponadto w przypadku kombinacji trzech enzymów (E3) spadła średnia długość liniowych cząsteczek, co również wskazuje na fragmentację łańcucha. Może to oznaczać, że jednoczesne działanie enzymów modyfikujących szkielet RG-I i enzymów usuwających łańcuchy boczne arabinozy pozwoliło na skuteczniejszą fragmentację łańcuchów pektynowych. Potwierdza to hipotezę, że przyłączona do ramnozy, arabinoza występująca w dużych ilościach w badanej frakcji może ograniczać dostęp do szkieletu enzymom modyfikującym szkielet RG-I.

4.4.2. Zmiany grup funkcyjnych molekuł frakcji DASP w wyniku działania mieszaniny enzymów (E3)

Widma FTIR uzyskano dla DASP-A i DASP-C, w formie natywnej, jak i po traktowaniu kombinacją E3 przez 120 minut, dla których zaobserwowano najbardziej wyraźny efekt działania. Ogólny kształt widma polisacharydu jest determinowany przez skład cukrowy szkieletu, ale wpływ ma również budowa łańcuchów bocznych. Dla wszystkich próbek można wyróżnić charakterystyczne regiony absorpcji o podobnym wzorze charakterystycznym dla polisacharydów DASP. Brak pasma w zakresie $1745\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, związanego z drganiami grup estrowych, sugeruje brak tego ugrupowania w badanych frakcjach pektyn. Wyniki HPLC nie wykazały obecności grup metylowych w natywnych pektynach, co jest prawdopodobnie wynikiem deestryfikacji pektyn podczas ekstrakcji za pomocą węglanu sodu w środowisku alkalicznym. Wartości stopnia acetylacji wynosiły 5,59% i 7,48%, odpowiednio dla natywnych pektyn jabłek i marchwi. Sugeruje to niepełną degradację wiązania estrowego między grupą acetylową a resztą GalA w łańcuchach pektyn podczas ekstrakcji. Szerokie pasmo w zakresie około $1260\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ może odpowiadać wiązaniu rozciągającemu C–O–C, jednak niższa intensywność tego pasma dla obu próbek traktowanych RGAE mogła być efektem częściowej deestryfikacji grup acetylowych. Pasma przy długości fali 1590 cm^{-1} przypisano asymetrycznym drganiom COO– w polimerach kwasu galakturonowego, reprezentującym nieestryfikowane grupy karboksylowe pektyn, podczas gdy pik przy około 1407 cm^{-1} reprezentował symetryczne drgania anionów karboksylowych. Na podstawie absorpcji widma

FTIR w zakresie $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ (region odcisku palca) możliwe jest określenie grup charakterystycznych dla poszczególnych polisacharydów. Głównym składnikiem wpływającym na zmiany w kształcie tego obszaru w wyniku obróbki enzymatycznej jest GalA. Zmiany w intensywności pasm w tym regionie i/lub zanik pików obserwowanych dla zmodyfikowanych frakcji mogą sugerować zmiany w łańcuchu głównym DASP. Pasmom o liczbach falowych w zakresie $900\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ przypisuje się region anomeryczny, co pozwala na rozróżnienie α - i β -konfiguracji anomerycznego węgla. Piki przy około $890\text{--}850\text{ cm}^{-1}$ wskazują na obecność jednostek galaktopiranozy i arabinofuranozy w próbce. Dla DASP-C i DASP-A zaobserwowano zanik pików przy 890 cm^{-1} dla zmodyfikowanej próbki. Dla DASP-A zaobserwowano zmniejszenie intensywności pasma przy 850 cm^{-1} . Te zmiany mogą sugerować przekształcenie wiązań w obrębie łańcuchów bocznych w cząsteczkach.

4.4.3. Zmiany właściwości reologicznych frakcji DASP w wyniku degradacji enzymatycznej

Podsumowanie właściwości reologicznych oraz parametrów modelu potęgowego (Ostwalda de Waele) i modelu Herschela–Bulkleya dopasowanych do krzywych płynięcia znajduje się w Tabeli 4. Współczynnik konsystencji (K) i wskaźnik płynięcia (n) były używane do opisu zachowania płynu. Wszystkie wartości n były mniejsze niż 1, co wskazuje na to, że próbki zachowywały się jak płyny pseudoplastyczne rozrzedzane ścinaniem, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dla roztworów pektynowych. Ich pozorna lepkość zmniejszała się wraz ze wzrostem szybkości ścinania, a sieć makromolekularna była orientowana lub deformowana w kierunku przepływu.

Tabela 3. Właściwości reologiczne natywnego (bufor) i modyfikowanego przez 120 minut enzymami (E1, E2 i E3) DASP z jabłek (DASP-A) i marchwi (DASP-C). G' – moduł zachowawczy; G'/G'' – stosunek modułu zachowawczego do modułu stratności; $\tan\delta$ – współczynnik stratności; K – współczynnik konsystencji; n – indeks płynięcia; G_0 – granica plastyczności; Punkt płynięcia – minimalna szybkość ścinania potrzebna do zainicjowania płynięcia materiału; Granica lepkości liniowej – graniczna wartość lepkości, powyżej której próbka traci liniową charakterystykę reologiczną.

Parametr	Jednostka	DASP-A				DASP-C			
		BUFOR	E1 (RGAE + RGL)	E2 (ABF)	E3 (RGAE + RGL + ABF)	BUFOR	E1 (RGAE + RGL)	E2 (ABF)	E3 (RGAE + RGL + ABF)
G'	Pa	310,83 ±231,30 _{ab}	154,61 ±139,91 _a	32,29 ±17,23 _{ab}	338,77 ±145,85 _{ab}	405,5 ±28,92 _b	167,20 ±154,87 _{ab}	43,67 ±25,38 _{ab}	207,33 ±119,49 _{ab}
G'/G''		7,52 ±3,14 _{ab}	10,74 ±1,42 _b	4,38 ±0,99 _{ab}	8,34 ±1,43 _{ab}	6,77 ±0,51 _{ab}	6,44 ±1,08 _{ab}	3,51 ±0,93 _a	6,93 ±2,48 _{ab}
tanδ		0,14 ±0,00 _{abc}	0,09 ±0,01 _{bc}	0,24 ±0,05 _a	0,13 ±0,03 _{a^b}	0,15 ±0,01 _{abc}	0,16 ±0,03 _{abc}	0,30 ±0,07 _c	0,15 ±0,07 _{ab}
Punkt płynięcia	%	6,07 ±3,83 _{ab}	5,76 ±1,26 _{bc}	16,09 ±4,50 _{a^b}	3,77 ±1,95 _a	1,93 ±0,85 _a	12,85 ±7,76 _{abc}	20,60 ±10,64 _c	3,77 ±1,62 _{ab}
Granica lepkości liniowej	%	3,72 ±1,83 _{abc}	1,79 ±0,50 _{bc}	5,76 ±2,20 _a	1,54 ±0,75 _a	1,34 ±0,90 _a	3,41 ±1,47 _{abc}	7,20 ±2,23 _c	1,88 ±0,79 _{ab}
Model potęgowy	$K \text{ Pa} \cdot \text{s}$	2,59 ±3,99 _a	1,39 ±1,46 _a	0,19 ±0,09 _a	2,62 ±2,76 _a	9,33 ±3,66 _{ab}	20,40 ±3,57 _b	5,42 ±2,16 _a	23,56 ±12,54 _b
	n	0,56 ±0,16 _{bc}	0,63 ±0,19 _{cd}	0,86 ±0,07 _d	0,54 ±0,13 _{abc}	0,41 ±0,06 _{abc}	0,32 ±0,14 _{ab}	0,49 ±0,09 _{a^{bc}}	0,29 ±0,08 _a
Model Herschela– Bulkleya	$G_0 \text{ Pa}$	3,63 ±5,75 _a	3,21 ±4,08 _a	0,06 ±0,11 _a	3,71 ±5,61 _a	10,79 ±6,97 _{ab}	31,17 ±20,41 _{b^c}	7,94 ±4,57 _a	32,98 ±16,12 _c
	$K \text{ Pa} \cdot \text{s}$	1,07 ±1,16 _{abc}	0,46 ±0,25 _{ab}	0,19 ±0,09 _a	1,28 ±0,9 _{abc}	4,76 ±0,65 _d	3,07 ±1,68 _{cd}	2,79 ±0,95 _{b^{cd}}	5,08 ±2,31 _d
	n	0,63 ±0,12 _{ab}	0,73 ±0,09 _{bc}	0,87 ±0,07 _c	0,61 ±0,10 _{ab}	0,50 ±0,03 _a	0,59 ±0,14 _{ab}	0,58 ±0,05 _{a^b}	0,48 ±0,04 _a
Lepkość (przy 10 s⁻¹)	$\text{Pa} \cdot \text{s}$	0,93 ±0,89 _{ab}	0,65 ±0,55 _a	0,14 ±0,05 _a	1,58 ±1,17 _{ab}	3,13 ±0,87 _{bc}	4,91 ±2,08 _c	2,13 ±0,77 _{a^b}	5,19 ±1,90 _c
Lepkość istotna	$\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	158,33	148,53	151,56	123,29	293,37	242,31	160,28	147,51

Różne litery wskazują różnice istotne statystycznie (ANOVA, $p < 0,05$).

Traktowanie E2 (ABF) prowadziło do zmniejszenia współczynnika K dla frakcji DASP z obu źródeł, co wskazuje na osłabienie sieci makromolekularnych przez ten enzym. Można więc wnioskować, że boczne łańcuchy arabinozy były zaangażowane w splątania makromolekularne w natywnych frakcjach, co skutkowało wyższą lepkością pektyn w buforze. Silny wpływ ABF na strukturę DASP i reologię może być spowodowany stosunkowo wysoką zawartością arabinozy w badanych frakcjach.

Oscylacyjne testy reologiczne wykazały, że wszystkie badane próbki wykazywały zachowanie bardziej ciał stałych niż cieczy, co potwierdzają wysokie wartości modułu zachowawczego (G') w porównaniu do modułu stratności (G''). Wartości $\tan\delta$ (współczynnik stratności) były mniejsze niż 1, co potwierdza, że próbki zachowywały się bardziej jak ciała stałe.

Zmniejszenie modułu zachowawczego G' było wynikiem modyfikacji E1 (RGAE+RGL) dla frakcji z obu źródeł. Proces ten mógł zmniejszać średnią masę cząsteczkową polimeru, co prowadziło do zmniejszenia stopnia splątania, a tym samym ogólnej wytrzymałości sieci. Dla DASP-A, traktowanie E3 (RGAE+RGL+ABF) skutkowało największym zmniejszeniem lepkości istotnej, co może mieć związek z zaobserwowanym zmniejszeniem się liczby rozgałęzień na cząsteczkę.

Duże zmniejszenie modułu G' , które zaobserwowano po usunięciu bocznych łańcuchów arabinozy w modyfikacji E2. W połączeniu ze wzrostem współczynnika stratności G'' , wskazuje to na znaczne zmniejszenie elastycznych właściwości żeli pektynowych. Może to też sugerować, że łańcuchy arabinozy, jako punkty wiążące w sieci pektynowej, są odpowiedzialne za zachowanie typowe dla ciał stałych. Wzrost lepkości po traktowaniu E3, wskazuje na większą możliwość interakcji cząsteczek ograniczaną przez splątania łańcuchów bocznych przyłączonych do jednostek ramnozy, a także grup acetylowych, które mogą utrudniać przyjmowanie sprzyjających wiązaniu konformacji przez polimer.

Zmniejszenie modułu G' w wyniku działania E1 było mniejsze dla DASP-C niż dla DASP-A, co sugeruje, że struktura deacetylowanego DASP-C jest bardziej odporna na odkształcenia. Wyniki te mogą wskazywać, że arabinoza przyłączona do ramnozy, obficie występująca w badanej frakcji, mogła ograniczać dostęp enzymów modyfikujących szkielet RG-I.

5. Omówienie wyników przedstawionych w badaniach uzupełniających

5.1. Wpływ regionu RG-I frakcji DASP na właściwości mechaniczne naturalnych i modelowych ścian komórkowych.

5.1.1. Wstęp

Pektyny odgrywają kluczową rolę w mechanice ścian komórkowych roślin, wpływając na ich sztywność, elastyczność i integralność strukturalną. Dotychczasowe badania sugerują, że pektyny tworzą niezależną sieć w matrycy celulozowo-hemicelulozowej, o właściwościach plastyfikujących i wiążących wodę, zapewniając wytrzymałość mechaniczną roślinnych ścian komórkowych (Somerville i in., 2004; B. Zhang i in., 2021). Co więcej, uważa się, że pektyny oddziałują z celulozą poprzez interakcje regionów HG z wapniem (Lin i in., 2016) oraz łańcuchy boczne RG-I, złożone z arabinanu i/lub galaktanu, które silnie adsorbują się na mikrofibrylach celulozy (Iwai i in., 2001; Oechslin i in., 2002; Zykwińska i in., 2005). Podejrzewa się, że kowalencyjnie związana ze ścianą komórkową frakcja DASP jest jednym z głównych determinantów sztywności ścian komórkowych gruszek (Zdunek i in., 2016). Badania *in vitro* wykazały również, że usunięcie pektyn ze ścian komórkowych powodowało spadek jej sztywności i ujednolicenie wartości dla owoców o odmiennej teksturze (Kozioł i in., 2017).

Strukturalne i chemiczne podobieństwo celulozy bakteryjnej (BC) do celulozy roślinnej pozwala na traktowanie kompozytów stworzonych na bazie tej celulozy jako tzw. analogi ścian komórkowych roślin (Chibrikov, Pieczywek, & Zdunek, 2023; Cybulska i in., 2010; Szymańska-Chargot i in., 2011, 2017). Celem niniejszych badań była ocena wpływu domeny RG-I frakcji DASP na właściwości mechaniczne ścian komórkowych. Badania prowadzono na bakteryjnych analogach ścian komórkowych oraz na materiale ściany komórkowej z jabłek i marchwi. W przypadku analogów ścian komórkowych badania prowadzono z użyciem frakcji DASP pozyskanej z owoców jabłoni. Frakcję DASP w formie natywnej lub zmodyfikowanej enzymatycznie pod kątem struktury domeny RG-I dodawano do pożywki hodowlanej bakterii produkujących celulozę (BC), co pozwoliło na określenie wpływu tej domeny na właściwości mechaniczne powstałego analogu ściany komórkowej. W przypadku badań z użyciem naturalnych ścian komórkowych, ściany poddawano degradacji enzymatycznej z użyciem tych samych enzymów degradujących RG-I. Należy zaznaczyć, że przedstawione w tym rozdziale

analizy mają charakter porównawczy ze względu na badanie analogów i ścian komórkowych w stanie suchym.

5.1.2. Materiały i metody

5.1.2.1. Materiał ścian komórkowych (CWM)

Ściany komórkowe (CWM) ekstrahowano z owoców jabłoni oraz korzenia marchwi zgodnie z metodą opisaną w rozdziale 3.2 niniejszej pracy. W celu przeprowadzenia modyfikacji enzymatycznych CWM, przygotowano zawiesinę zmielonego materiału o stężeniu $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Zastosowano degradację enzymatyczną mieszaniną enzymów E3, zgodnie z metodyką i konwencją opisaną w rozdziale 3.4 niniejszej pracy, z niewielkimi modyfikacjami, przedstawionymi na schemacie (Rysunek 5).

5.1.2.2. Ekstrakcja frakcji DASP i modyfikacje enzymatyczne

Frakcję DASP z jabłka ekstrahowano zgodnie z metodą opisaną w rozdziale 3.3 niniejszej pracy, jednakże z pominięciem zastosowania 50 mM CDTA. Jest to spowodowane jego silnym działaniem bakteriostatycznym, nawet po usunięciu większości odczynnika podczas procesu dializy. Zatem w tym przypadku frakcję DASP pozyskano po usunięciu jedynie frakcji pektyn rozpuszczalnych w wodzie. Modyfikacje enzymatyczne frakcji DASP mieszaniną enzymów E3 prowadzono zgodnie z metodą opisaną w rozdziale 3.4 niniejszej pracy, przy użyciu następujących enzymów:

- RGAE – acetyloestraza ramnogalakturonianowa ($9,9 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$);
- RGL – endoliaza ramnogalakturonianu ($0,22 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$);
- ABF – arabinofuranozydaza ($2,1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$).

Próba kontrolna – bufor (35 mM Na-HEPES, pH 7,5; 750 mM NaCl, 200 mM imidazol, 3,5 mM CaCl_2 oraz 25% (v/v) glicerol).

5.1.2.3. Przygotowanie kompozytów celulozy bakteryjnej

Filmy celulozy bakteryjnej (ang. *bacterial cellulose*, BC) przygotowano na pożywce Hestrin–Schramm (HS) (Hestrin i Schramm, 1954) modyfikowanej według (Cybulska i in., 2010). Czystą BC (BC-PURE) przygotowano na pożywce HS zawierającej 2% mas. glukozy (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 0,5% mas. peptonu kazeinowego (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 0,5% mas. ekstraktu drożdżowego (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 0,27% mas. bezwodnego fosforanu disodowego (Sigma-

Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) i 0,115% mas. monohydratu kwasu cytrynowego (Chempur, Piekary Śląskie, Polska), rozpuszczając składniki w wodzie dejonizowanej. Następnie pH pożywki hodowlanej doprowadzono do 5,0 za pomocą roztworu 1 M NaOH/HCl. Kompozyt celulozy bakteryjnej z pektynami przygotowano poprzez dodanie do pożywki HS DASP natywnego (próbki oznaczono jako BC-DASP) lub wcześniej zmodyfikowanego enzymatycznie w mieszaninie enzymów E3 (próbki w tej części eksperymentu oznaczono jako BC-E3) w obu przypadkach w ilości 0,5% mas.

Pożywkę HS autoklawowano w temperaturze 121°C przez 11 minut, a następnie doprowadzono do temperatury pokojowej. Inokulum przygotowano poprzez zaszczepienie ok. 2 mg dwudniowej kolonii szczepu bakterii *Komataeibacter xylinum* ATCC-53524 (LGC Standards, Teddington, Wielka Brytania) w 50 mL pożywki. Kompozyty wytwarzano statycznie w temperaturze $30 \pm 1^\circ\text{C}$ przez 10 dni. Następnie uzyskane kompozyty płukano w wodzie dejonizowanej przez 72 godziny w celu pozbycia się resztek podłoża oraz innych zanieczyszczeń i niewbudowanych składników. Po oczyszczeniu, kompozyty suszono w temperaturze $40 \pm 1^\circ\text{C}$ do stałej masy. Wysuszone kompozyty przechowywano do dalszych analiz, w temperaturze $20 \pm 1^\circ\text{C}$ i przy wilgotności względnej $33\% \pm 2\%$.

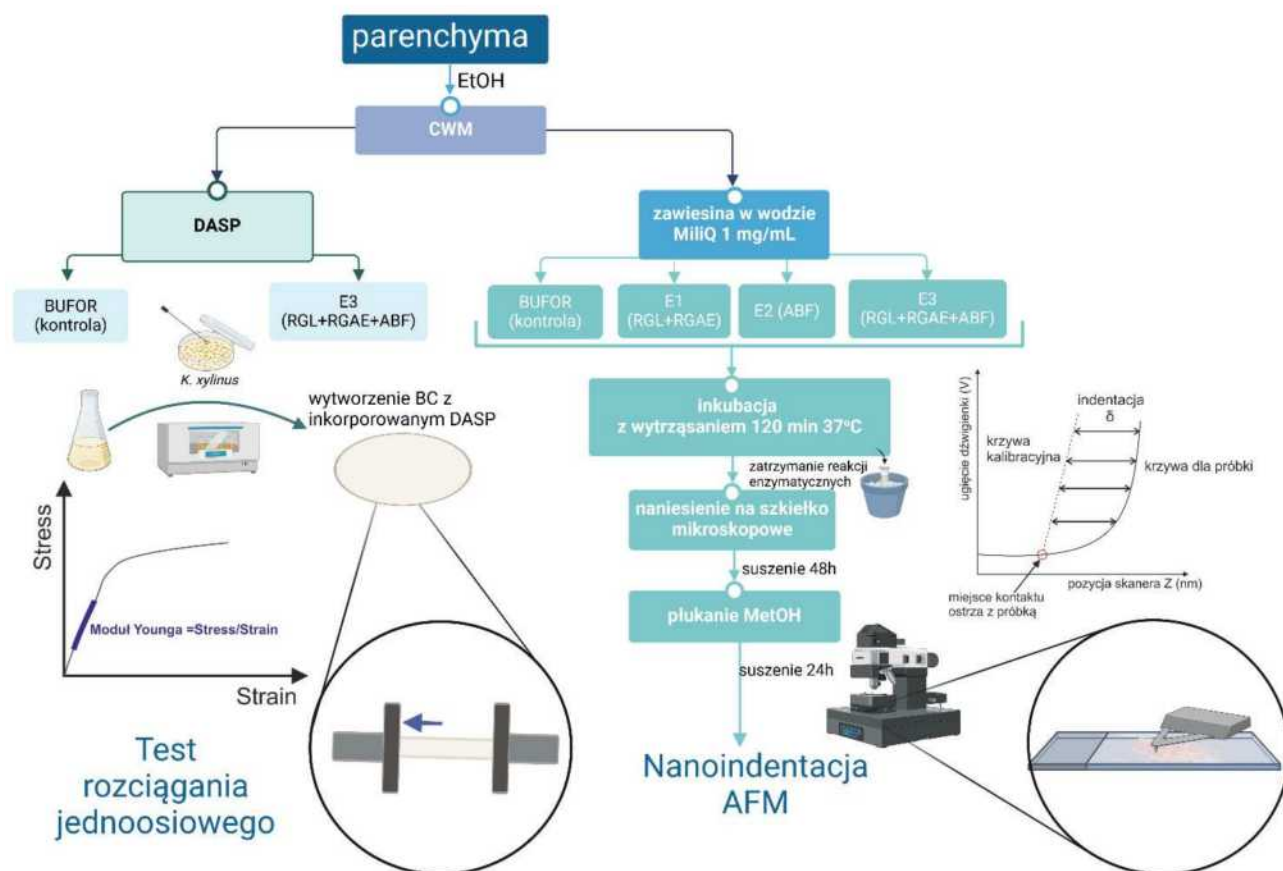
5.1.2.4. Testy mechaniczne

Testy mechaniczne kompozytów celulozy bakteryjnej (BC) z pektynami

Właściwości mechaniczne celulozy bakteryjnej z pektynami w skali określono w teście jednoosiowego rozciągania przy stałej prędkości odkształcania (Chibrikov i in., 2024). Uzyskane próbki w postaci błony cięto na paski o szerokości około 3 mm i długości 20 mm. Szerokość wyciętej próbki mierzono za pomocą mikroskopu Olympus SZX16 (Olympus Corporation, Tokio, Japonia) wyposażonego w obiektyw SDF PLAPO 0,5XPF i kamerę DMK 21 AU04 AS (The Imaging Source, Charlotte, Karolina Północna, USA). Grubość każdego próbki mierzono za pomocą mikrometru cyfrowego BAKER IP54 (Baker Gauges Private Limited, Maharashtra, Indie). Próby jednoosiowego rozciągania przeprowadzono przy użyciu mikrotestera (Deben Microtest, Suffolk, Wielka Brytania) wyposażonego w głowicę 200 N. Odległość pomiędzy zaciskami mikrotestera ustalono na 10 mm (efektywna długość rozciąganej próbki). Próbki rozciągano ze stałą prędkością wynoszącą $1,67 \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ do momentu jej rozerwania. Wykonano minimum 3 powtórzenia dla każdej próbki. Moduł Younga próbki, wyznaczono za pomocą procedury Python TDA (Pieczywek, 2022a) jako stosunek napięcia do naprężenia dla początkowego odcinka nachylenia krzywej (Rysunek 5).

Testy mechaniczne ścian komórkowych (CWM)

Badania właściwości mechanicznych ścian komórkowych (CWM) wykonano przy użyciu mikroskopu sił atomowych (pomiar w nano-skali) w teście indentacji. Próbkki CWM nakraplano (około 300 μL zawiesiny wodnej) na szkło mikroskopowe. Następnie suszono je przez 48 godzin na powietrzu (22°C, RH 26–30%). Po tym czasie z próbek wypłukiwano glicerol, będący pozostałością po roztworach enzymów, poprzez moczenie w metanolu. Następnie próbki suszono w takich samych warunkach przez 24 godzin. Do wykonania testów nanoindentacji próbek CWM w stanie suchym wykorzystano mikroskop sił atomowych Bioscope Catalyst II z kontrolerem Nanoscope V oraz sondę RTESPA-525 AFM z krzemu domieszkowanego antymonem o sztywności $200 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ (Bruker, Billerica, MA, USA), promieniu ostrza 8 nm oraz częstotliwości nominalnej 525 kHz. Dla każdej próbki wykonywano 10 pomiarów losowo wybranych skrawków CWM. Indywidualny pomiar obejmował rejestrację 25 krzywych „siła-przemieszczenie” (25 punktów pomiarowych w siatce 5×5 na obszarze $4 \mu\text{m}^2$).



Rysunek 5. Schemat eksperymentów mechanicznych: test rozciągania jednoosiowego analogów ścian komórkowych przy pomocy mikrotastera oraz nanoindentacja CWM za pomocą AFM, wraz z przykładowymi krzywymi eksperymentalnymi. Przygotowano z wykorzystaniem oprogramowania Biorender.

Do wyznaczenia modułu Younga materiału ścian komórkowych zastosowano model Hertza-Sneddona (Równanie 6) (Sneddon, 1965), będący rozwinięciem modelu Hertza, poprzez wpisanie tego modelu w eksperymentalne krzywe siła-indentacja. Moduł Younga oszacowano przy użyciu oprogramowania NanoPlot (środowisko Matlab R2011a, Pieczywek, 2022b). Przyjęto współczynnik Poissona równy 0,3 jako wartość zalecaną dla polimerów anizotropowych i materiałów pochodzenia biologicznego (Niklas & Spatz, 2012).

$$F(\delta) = \frac{2 \cdot \tan \alpha}{\pi(1 - \nu^2)} E \cdot \delta^2 \quad (6)$$

gdzie:

F – siła indentacji (nacisku stożkowej końcówki);

E – wartość modułu Younga badanego materiału;

ν – współczynnik Poissona badanego materiału;

α – kąt otwarcia stożkowej końcówki;

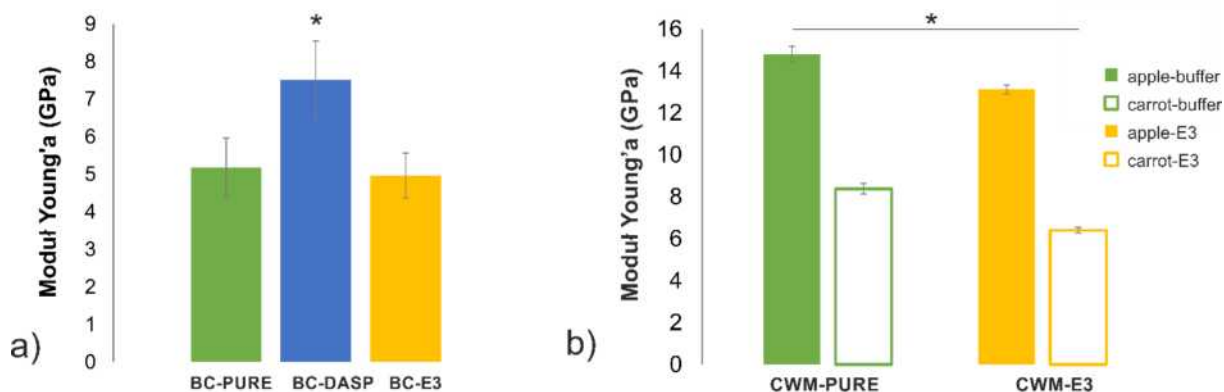
δ – wartość indentacji.

5.1.3. Wyniki i dyskusja

5.1.3.1. Zmiany właściwości mechanicznych analogów ścian komórkowych w wyniku degradacji RG-I

Dodanie DASP do pożywki hodowlanej BC wpłynęło na właściwości mechaniczne powstałych kompozytów (Rysunek 6a). Wartość modułu Younga dla celulozy bakteryjnej bez dodatku pektyn (BC-PURE) była w zakresie wartości podawanych w literaturze (Chibrikov i in., 2024; Chibrikov, Pieczywek, Cybulska, i in., 2023; Cybulska i in., 2023) i wynosiła $5,18 \pm 0,78$ GPa, natomiast dodatek natywnego DASP (BC-DASP), spowodował istotny jego wzrost do $7,51 \pm 1,04$ GPa. Uzyskany wzrost modułu Younga jest zgodny z wcześniejszymi badaniami BC z różnymi frakcjami pektyn: zarówno frakcja pektyn rozpuszczalna w wodzie jak i komercyjny RG-I powodowały wzrost wartości modułu Younga oraz ogólne usztywnienie kompozytów, co sugerowało pewną zdolność do łączenia się z celulozą (Cybulska i in., 2023;

Lin i in., 2016). Potwierdzają to również badania Gu & Catchmark (2012) obejmujące pektyny, gdzie pokazano, że na mechaniczne właściwości kompozytów celulozy bakteryjnej ma wpływ między innymi RG-I poprzez tworzenie bardziej elastycznych struktur kompozytowych.



Rysunek 6. Wyniki testów mechanicznych modelowych (a) i naturalnych (b) ścian komórkowych. Słupki błędów na rys. a przedstawiają odchylenie standardowe, natomiast na rys. b, błąd standardowy. Znak (*) wskazuje na różnice istotne statystycznie (ANOVA, $p < 0,05$).

Dodatek do pożywki zmodyfikowanych enzymatycznie pektyn DASP (próbka BC-ET) spowodowała spadek wartości modułu Younga do $4,97 \pm 0,60$ GPa czyli do poziomu zbliżonego do sztywności czystej celulozy bakteryjnej. Świadczy to o tym, że struktura regionu RG-I frakcji DASP ma istotny wpływ na właściwości mechaniczne uzyskanych kompozytów. Zmiana cech strukturalnych pod wpływem mieszaniny enzymów (jak to opisano w publikacji P4 dla mieszaniny E3) spowodowała też utratę mechanicznej funkcji RG-I w obecności celulozy bakteryjnej. Wynik ten sugeruje, że RG-I jest elementem, który odpowiada w znaczącym stopniu za właściwości mechaniczne ściany komórkowej. Może być to związane z obficie występującymi we frakcji DASP łańcuchami bocznymi, szczególnie dołączonej do ramnozy arabinozy, które wzmacniają interakcje między włóknami w sieci przede wszystkim poprzez opisane powyżej splątania (Silveira i in., 2014).

5.1.3.2. Zmiany właściwości mechanicznych CWM w wyniku degradacji RG-I

Próbki CWM nie poddane traktowaniu enzymami (zastosowano sam bufor) w stanie suchym z owoców jabłoni charakteryzują się wyraźnie wyższym modułem Younga ($14,80 \pm 0,37$ GPa) w porównaniu do próbek z marchwi ($8,38 \pm 0,25$ GPa) (Rysunek 6b). Uzyskane różnice pokazują po raz pierwszy międzygatunkowe różnice w sztywności ściany komórkowej.

Jest to też wynik zgodny z ogólnie przyjętą hipotezą, że makroskopowe właściwości mechaniczne tkanek roślinnych zależą od struktury, w tym struktury i właściwości ścian komórkowych, co zostało pokazane między innymi na przykładzie dwóch odmian owoców gruszy o skrajnie odmiennej jędrności (Zdunek i in., 2014) oraz dla szeregu odmian owoców jabłoni (Cybulska i in., 2013).

Modyfikacja materiału ścian komórkowych mieszaniną enzymów E3 spowodowała obniżenie wartości modułu Younga o około 1,7 GPa dla próbek z jabłka oraz o około 2 GPa dla próbek z marchwi. Uzyskane wyniki zmniejszenia się sztywności ściany komórkowej w wyniku degradacji enzymatycznej są zgodne z poprzednimi badaniami o podobnym charakterze oraz wynikami badań dla BC wzbogaconej o DASP. We wcześniejszych badaniach spadek wartości modułu Younga odnotowano w wyniku ekstrakcji kolejnych frakcji pektyn (WSP, CSP, DASP) ze ściany komórkowej gruszy (Kozioł i in., 2017). Zgodnie z przyjętą tam interpretacją, obserwowany spadek sztywności CWM próbek z jabłka oraz marchwi w tym eksperymencie można tłumaczyć tworzeniem się pustych przestrzeni w sieci celulozowo-hemicelulozowej. W przypadku zestawu enzymów E3, spadek ten należy przypisać degradacji domeny RG-I w pektynach zawartych w CWM.

5.1.4. Podsumowanie

W tej części badań stosowano mieszaninę enzymów E3. Pektyny frakcji DASP poddawane były więc jednocześnie deacetylacji jednostek kwasu galakturonowego w szkielecie RG-I, rozcinaniu wiązań α -1,4 między ramnozą i kwasem galakturonowym oraz odcinaniu arabinozy z łańcuchów bocznych.

Pokazano, że dodatek pektyn frakcji DASP, bogatej w RG-I, wpływa na mechaniczne właściwości błon celulozy bakteryjnej podwyższając ich sztywność. Jednak dodatek pektyn DASP ze zdegradowanym RG-I nie powodował już znaczących różnic sztywności kompozytu w stosunku do czystej błony celulozy bakteryjnej. Wynik ten sugeruje, że RG-I może wchodzić w interakcje z celulozą powodując usztywnienie kompozytu. Pokazano również, że degradacja RG-I natywnej ściany komórkowej (CWM) prowadzi do nieznacznego spadku jej sztywności. Wynik ten jest zgodny z obserwowanym we wcześniejszych pracach spadkiem sztywności CWM podczas naturalnej degradacji pektyn w owocach gruszy podczas dojrzewania lub enzymatycznej degradacji *in vitro*. Z przeprowadzonych badań w niniejszej pracy można więc wysnuć wniosek, że struktura łańcucha głównego Rha-GalA oraz obecność przyłączonych do

ramnozy łańcuchów arabinozy odgrywają istotną rolę w kształtowaniu sztywności ściany komórkowej u roślin.

5.2. Badania wpływu regionu RG-I frakcji DASP na właściwości pektyn poprzez enzymatyczne i chemiczne modyfikacje

5.2.1. Wstęp

Modyfikacje enzymatyczne oraz chemiczne pektyn są powszechnie stosowane w celu kontrolowania ich właściwości reologicznych i funkcjonalnych. Strukturę poszczególnych domen pektynowych można ujawnić poprzez ich chemiczne i/lub enzymatyczne rozdzielanie, a następnie charakterystykę fizykochemiczną (Santiago i in., 2018). Aby w pełni rozwinąć potencjał modyfikacji pektyn, kluczowe jest dogłębne zrozumienie mechanizmów działania czynników modyfikujących oraz opracowanie metod precyzyjnego dostosowywania właściwości do konkretnych zastosowań. Kontrolowana modyfikacja lepkości i właściwości żelujących może być wykorzystana do produkcji bardziej stabilnych i funkcjonalnych żeli spożywczych oraz innych zastosowań przemysłowych, gdzie kluczowe są specyficzne właściwości reologiczne.

Jiao i in. (2023) przeprowadzili przegląd różnych metod modyfikacji pektyn, podkreślając potencjalne bioaktywności zmodyfikowanych pektyn, takie jak zwiększone właściwości antyoksydacyjne i przeciwbakteryjne. Fragmentacja łańcucha RG-I może prowadzić do znaczącego obniżenia lepkości pektyn w wyniku depolimeryzacji łańcuchów, jak wykazano w badaniach nad modyfikowanymi pektynami z jabłek (Ngouémazong i in., 2015). Modyfikacje enzymatyczne za pomocą pektynaz w regionach łańcuchów bocznych pektyn prowadziły do uzyskania polimerów o znacznie niższej lepkości przy braku obecności jonów wapnia. Z drugiej strony, lepkość próbek w tych samych warunkach wzrastała po deestryfikacji szkieletu pektynowego za pomocą metylestrazy pektynowej (PME). W obecności wapnia, pektyny poddane deestryfikacji wykazywały 35-krotny wzrost wartości modułu przechowywania (G'), co oznaczało znaczny wzrost siły uzyskanych sieci żeli (Schmelter, 2002).

J.-F. Thibault i in. (1993) wyizolowali frakcję homogalakuronanu pektyn z różnych źródeł za pomocą łagodnej hydrolizy kwasowej w temperaturze 80°C przez 72 godziny, a jej charakterystyka wykazała różną wrażliwość wiązań glikozydowych na hydrolizę kwasową. Sugeruje się, że łagodna hydroliza kwasowa w temperaturze 80°C przez 24 godziny wystarcza do izolacji frakcji HG różnych pektyn cytrusowych oraz niedojrzałej okrywy nasiennikowej pomidora (Kaya i in., 2014; Round i in., 2010), umożliwiając rozdzielanie degradowanych

fragmentów RG-I, rozpuszczalnych w kwasie, oraz nienaruszonych domen HG, które pozostają nierozpuszczalne w kwasie. Należy mieć na uwadze, że używanie metod chemicznych lub enzymatycznych do rozdzielania subdomen pektyn często może wiązać się z obecnością resztkowych ilości jednej frakcji w innej (Santiago i in., 2017). Domena HG związana jest najczęściej z wysoką masą cząsteczkową, lepkością oraz sztywnością makromolekuł (Kaya i in., 2014; Morris, Ralet, i in., 2010).

Cechy strukturalne polimerów pektynowych są kształtowane głównie przez ich źródło oraz zastosowaną metodę ekstrakcji. Frakcja DASP, opisywana jest jako mieszanina domen HG i RG-I, jednakże poprzednie badania sugerują istotną rolę RG-I w kształtowaniu właściwości strukturalnych i reologicznych.

W celu dokładniejszej charakterystyki roli regionu RG-I frakcji DASP na właściwości pektyn, pogłębiono zakres modyfikacji enzymatycznych, stosując degradację zarówno łańcuchów bocznych arabinozy, jak i galaktozy. Bez zmian pozostał rodzaj reszty enzymów, zastosowaliśmy je jednak w modelu sekwencyjnym, co miało na celu wzmocnienie działania degradującego łańcuchy boczne oraz deacetylację, poprzedzając wycięcie jednostek ramnozy. Poprzednie badania sugerowały bowiem, że eliminacja wszystkich czynników sterycznych w postaci łańcuchów bocznych, może być konieczna do prawidłowego działania enzymu RGL. Dodatkowo zastosowano metodę hydrolizy kwasowej w celu degradacji chemicznej RG-I, ze względu na możliwość skutecznej, jednak nieselektywnej degradacji pektyn. Hydroliza kwasowa pozwala na efektywne usunięcie czynników sterycznych i rozdzielenie domen pektynowych. Pozwala to na dokładniejsze zbadanie wpływu poszczególnych regionów na ich właściwości reologiczne i funkcjonalne. Porównanie dwóch metod degradacji regionu RG-I, selektywnej metody enzymatycznej oraz kompleksowej hydrolizy kwasowej, pozwala na uzyskanie szerszego obrazu wpływu regionu RG-I na właściwości pektyn, co jest kluczowe dla zrozumienia ich funkcjonalności i potencjalnych zastosowań.

5.2.2. Materiały i metody

5.2.2.1. Ekstrakcja frakcji DASP ze ściany komórkowej

Ekstrakcję frakcji DASP z owoców jabłoni i korzenia marchwi przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.3 niniejszej pracy.

5.2.2.2. Modyfikacje pektyn frakcji DASP

Frakcję DASP z jabłek i marchwi poddano modyfikacjom enzymatycznym lub hydrolizie kwasowej. W tej części badań mieszanek enzymów E3 uzupełniono o enzym odpowiedzialny za degradację galaktozy, łańcucha bocznego przyłączonego, podobnie jak arabinoza, do ramnozy w pektynach RG-I. W celu zwiększenia efektywności degradacji enzymatycznej enzymy stosowano w sekwencji GAL>RGAE>ABF>RGL (oznaczenia zawarto w Tabeli 6). Przygotowując próbkę, dodatkowo zastosowano demineralizację. Tabela 6 przedstawia szczegóły zastosowanych modyfikacji i ich oznaczenia.

Tabela 6. Opis oznaczeń zastosowanych modyfikacji pektyn.

Oznaczenie	Opis
M	Macierzysta próbka pektyn
D	Demineralizacja: H ₂ O:EtOH 1:4 v/v pH 2,0
ET	Modyfikacje enzymatyczne: GAL (0,19 U·mg ⁻¹) + RGAE (19,8 U·mg ⁻¹) + ABF (4,2 U·mg ⁻¹) + RGL (0,44 U·mg ⁻¹)
AH	Hydroliza kwasowa pH 1,0 80°C

M, próbka macierzysta; D, demineralizacja; ET, traktowanie enzymatyczne; AH, hydroliza kwasowa; GAL, β-galaktozydaza; RGAE, acetyloestaza RG-I; ABF, arabinofuranozydaza; RGL, endoliaza ramnogalakuronanu.

Demineralizacja

Liofilizowane próbki pektyn mieszano w roztworze woda-etanol (1:4 v/v) o pH 2,0 przez godzinę, po czym przefiltrowano za pomocą jednostki do filtracji próżniowej. Proces płukania powtarzano trzykrotnie. Następnie mieszaninę pozostawiano na mieszadle magnetycznym przez noc w temperaturze 4°C. Ciało stałe oddzielano za pomocą filtracji próżniowej. Pozostałość rozpuszczono w wodzie MiliQ i mieszano przez około 1 godzinę. Finalnie próbki pektyn liofilizowano po zamrożeniu w ciekłym azocie.

Reakcje enzymatyczne

Demineralizowaną frakcję DASP traktowano enzymami degradującymi szkielet RG-I oraz jego łańcuchy boczne. Użyto czterech rodzajów enzymów: Acetyloestaza RG-I BtRme NC (CE NC), BT4158, E.C. numer 3.1.1. (Nzytech) (RGAE); Endoliaza ramnogalakuronanu BtRge9A (PL9), BT4183, E.C. numer 4.2.2.23 (Nzytech) (RGL); Arabinofuranozydaza CjAbf51B (GH51), E.C. numer 3.2.1.55 (Nzytech) (ABF); β-Galaktozydaza GH35, E.C. numer

3.2.1.23 (Megazyme) (GAL). Enzymy były stosowane sekwencyjnie. Tabela 6 przedstawia dokładne ilości użytych enzymów.

Liofilizowane pektyny rozpuszczano przez noc w buforze octanowym (100 mM, pH 4,5). Następnie pH dostosowano do 5,0 i dodawano GAL. Próbkę inkubowano z wytrząsaniem w kąpeli wodnej w temperaturze 60°C przez 120 minut. Następnie temperatura kąpeli wodnej była zmniejszana do 37°C. W drugim etapie dostosowano pH próbek do 7,5 za pomocą 0,1 M NaOH, po czym dodawano enzymy RGAE i ABF i inkubowano przez 120 minut. Na koniec dodawano enzym RGL i próbki inkubowano przez kolejne 120 minut. Po upływie zadanego czasu próbki schładzano w łaźni lodowej przez 5 minut, a następnie dializowano wobec wody demineralizowanej przez 48 godzin (Spektra/Por® Dialysis Membrane, 0.1–0.5 kDa MWCO) i liofilizowano (Alpha 2–4 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Niemcy).

Hydroliza kwasowa

Hydroliza kwasowa próbek frakcji DASP była przeprowadzana zgodnie z metodą opisaną przez Neckebroek i in. (2021). Na wstępie 200 mg zdemineralizowanej próbki rozpuszczano przez noc w 4°C w 60 mL wody MiliQ. pH dostosowano do 1,0 za pomocą 1 M HCl i roztwór inkubowano w temperaturze 80°C przez 24 godziny w kąpeli wodnej. Następnie roztwór schładzano do temperatury pokojowej i dodawano etanol do końcowego stężenia 80% (v/v). Zawiesinę filtrowano przy użyciu filtra szklanego (filtry membranowe Durapore®, 0,1 µm, Merck Millipore Ltd., Irlandia). Uzyskane pozostałości rozpuszczano w 40 mL wody MiliQ, a następnie dodawano 12 mL 0,1 M HCl. Następnie pH roztworu dostosowano do 6,1 przy użyciu 0,5 M LiOH. Ostatecznie roztwór pektyny dializowano wobec wody demineralizowanej przez 48 godzin (Spektra/Por® Dialysis Membrane, 3500 Da MWCO) i liofilizowano (Alpha 2–4 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Niemcy).

5.2.2.3. Zawartość kwasu galakturonowego

W celu oznaczenia zawartości kwasu galakturonowego (GalA) przeprowadzono hydrolizę próbek kwasem siarkowym (10 mg próbki z 8 mL stężonego H₂SO₄), zgodnie z metodą Ahmed & Labavitch (1978). Następnie próbki analizowano w trzech powtórzeniach metodą spektrofotometryczną (spektrofotometr (GENESYS™ 30 Visible Spectrophotometer, Thermo Scientific, Boston, MA, USA), zgodnie z metodą Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973), przy długości fali 520 nm i temperaturze 23°C.

5.2.2.4. Zawartość cukrów prostych

Zawartość monosacharydów określano za pomocą wysokosprawnej chromatografii jonowymiennej sprzężonej z detektorem pulsacyjno-amperometrycznym (HPAEC-PAD), zgodnie z metodą opisaną przez Houben i in. (2011) modyfikowaną przez Neckebroek i in. (2021). Początkowo przeprowadzono hydrolizę kwasową polisacharydów. Liofilizaty w ilości 2 mg rozpuszczano w 2,8 mL wody MiliQ przez noc. Następnie dodawano 100 μ L 72% H_2SO_4 w celu uzyskania 4% H_2SO_4 . Hydrolizę prowadzono przez 1 godzinę w 121°C. Następnie próbki neutralizowano dodając 1 M NaOH i rozcieńczano do końcowego stężenia 0,02% (w/v). Przed analizą próbki przepuszczono przez filtr strzykawkowy 0,45 μ m (Chromafil A-45/25, Macherey-Nagel, Duren, Niemcy). System HPLC Dionex (DX600) był wyposażony w pompę gradientową GS50, kolumnę CarboPac™ PA20 (150 $\times$ 3 mm, zakres pH = 0–14) z przedkolumną CarboPac™ PA20 (30 $\times$ 3 mm). Detektor elektrochemiczny ED50 (Dionex, Sunnyvale, USA), używany w trybie PAD z czterokrotną falą potencjałową, był wyposażony w referencyjną elektrodę pH (Ag/AgCl) i złotą elektrodę.

Analiza HPAEC-PAD obejmowała dwuetapowe płukanie z użyciem 100 mM NaOH przez 5 minut i 4 mM NaOH przez 5 minut, po czym wstrzykiwano 10 μ L hydrolizatu i eluowano (0,5 mL $\cdot$ min⁻¹) metodą izokratyczną z użyciem 4 mM NaOH przez 20 minut w temperaturze 30°C. Na koniec regenerację kolumny przeprowadzano za pomocą 500 mM NaOH przez 10 minut (Arnous & Meyer, 2008).

Do ilościowego oznaczania i identyfikacji monosacharydów w analizowanych próbkach używano krzywych kalibracyjnych standardów (L-fukoza, L-ramnoza, L-arabinoza, D-galaktoza, D-glukoza, D-ksyloza i D-mannoza) w różnych stężeniach (1–6 ppm). Analizy przeprowadzano trzykrotnie.

5.2.2.5. Zawartość białka

Całkowitą zawartość azotu określano metodą Dumasa, jak opisano przez Kyomugasho i in. (2017) przy użyciu analizatora elementarnego (EA 1108 CHNS–O, CE Instruments/Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Ilość białka obliczano na podstawie całkowitej zawartości azotu przy użyciu współczynnika konwersji 6,25. Analizę przeprowadzano czterokrotnie dla każdej próbki.

5.2.2.6. Zawartość jonów Fe^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+}

Określenie zawartości minerałów przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Moens i in. (2020). Liofilizowaną próbkę (10 mg) zwilżano za pomocą 1 mL wody MiliQ

i suszono w 100°C przez 24 godziny. Następnie przeprowadzano spalanie w piecu muflowym w 550°C przez 24 godziny. Następnie próbki rozpuszczano w wodzie MiliQ (9,9 mL) z dodatkiem 100 µL 65% HNO₃. Po 24 godzinach próbki filtrowano (Chromafil A-45/25, porowatość 0,45 µm, Macherey-Nagel GmbH, Duren, Niemcy) i poddawano analizie przy użyciu optycznej spektrometrii emisyjnej z analizą w indukcyjnie sprzężonej plazmie (ICP-OES) (spektrometr iCAP 7400 ICP-OES Duo, Thermo Scientific, USA). Analizę przeprowadzano trzykrotnie dla każdej próbki.

5.2.2.7. Pomiar rozkładu masy cząsteczkowej

Rozkład masy cząsteczkowej (ang. *molecular mass*, *MM*) próbek pektyn analizowano zgodnie z procedurą opisaną przez Neckebroek i in., (2021) oraz Shpigelman i in. (2014) przy użyciu wysokosprawnej chromatografii wykluczania (HPSEC) sprzężonej z detektorem wielokątowego rozpraszania światła laserowego (MALLS) (PN3621, Postnova analytics, Niemcy), detektorem refraktometrycznym (RI) (Shodex RI-101, Showa Denko K.K., Kawazaki, Japonia) oraz detektorem diodowym (DAD) (G1316A, Agilent Technologies, Diegem, Belgia). Probki (0,2% w/v) rozpuszczano przez noc w wodzie MiliQ, filtrowano (Chromafil A-45/25, porowatość 0,45 µm, Macherey-Nagel GmbH, Duren, Niemcy) i wstrzykiwano do aparatury (100 µL). Użyto serii trzech kolumn: Ultrahydrogel 250, 1000 i 2000, z granicami wykluczenia wynoszącymi odpowiednio $8 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^6$ i $1 \cdot 10^7$ g·mol⁻¹ (Waters, Milford, MA), które były utrzymywane w temperaturze 35°C. Elucja polimerów pektynowych była prowadzona przy przepływie 0,5 mL min⁻¹ z użyciem buforu octanowego (0,1 M; pH 4,4) zawierającego 0,1 M NaNO₃ przez 103 minuty. Wartość dn/dc użyta do obliczenia stężenia wynosiła 0,146 mL·g⁻¹. Masa cząsteczkowa była obliczana przy użyciu metody dopasowania Debye'a (drugiego rzędu) za pomocą oprogramowania dostarczonego przez producenta (NovaMals, wersja 1.2.0.0, Postnova analytics, Niemcy).

5.2.2.8. Lepkość

Pomiary reologiczne przeprowadzono w temperaturze 20°C przy użyciu reometru hybrydowego Discovery (HR-1) firmy TA Instruments (New Castle, PA, USA) wyposażonym w układ pomiarowy typu stożek-płytki (o średnicy 40 mm i kącie 2,007°) z szerokością szczeliny 0,56 mm. Lepkość mierzono przy prędkości ścinania wynoszącej 100 s⁻¹ dla roztworów o stężeniu 1% w/v.

5.2.2.9. Obrazowanie AFM

Obrazowanie AFM przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.9.1 niniejszej pracy.

5.2.2.10. Analiza obrazów

Topologiczne obrazy AFM były przetwarzane i analizowane za pomocą oprogramowania SPIP 6.0.9 (Image Metrology, Hørsholm, Dania). Wykonano operacje takie jak: przetwarzanie wstępne – wyrównywanie i korekcja tła metodą wpasowania wielomianu drugiego rzędu, segmentacja ze względu na próg wysokościowy metodą progowania (ang. *thresholding*) z wartością progu wysokościowego 0,2 nm powyżej poziomu tła. Moduł „*Particle & Pore Analysis*” był używany do wyodrębniania cząsteczek pektyn z obrazów AFM oraz określania ich parametrów geometrycznych. Dane były następnie filtrowane w celu usunięcia obiektów krótszych niż 2 nm i o wysokości ponad 1 nm.

5.2.2.11. Analiza statystyczna

Wszystkie analizy przeprowadzono co najmniej trzykrotnie. Wyniki obliczano jako wartości średnie i podawano z odchyleniem standardowym lub błędem standardowym. Testy statystyczne (jednoczynnikowa lub wieloczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya) mające na celu określenie istotnych różnic między próbami przeprowadzono przy użyciu Statistica 13.1 (StatSoft, Kraków, Polska). Istotność statystyczną oceniano na poziomie $p < 0,05$.

5.2.3. Wyniki

5.2.3.1. Charakterystyka chemiczna

Skład monosacharydowy (Tabela 7) uzyskany przy pomocy wysokosprawnej chromatografii jonowymiennej sprzężonej z detektorem pulsacyjno-amperometrycznym (HPAEC-PAD) sugeruje, że macierzyste frakcje pektyn DASP składały się głównie z kwasu galakturonowego, galaktozy, arabinozy i ramnozy w różnych proporcjach dla badanych źródeł pektyn, jak opisano wcześniej (Kaczmarek i in., 2024). Niemodyfikowana frakcja DASP z jabłek (M-apple DASP) zawierała więcej kwasu galakturonowego i arabinozy, podczas gdy DASP z marchwi (M-carrot DASP) wykazywała wyższą zawartość galaktozy i ramnozy. Skutkowało to wyższym stosunkiem Rha/GalA w próbkach marchwi, czyli wyższą zawartością RG-I w strukturze frakcji. Mimo większego udziału RG-I w pektynach marchwi, stopień

rozgałęzienia w tym regionie pozostał wyższy dla pektyn jabłek. Wyniki te są zgodne pod względem jakościowym z uzyskanymi wcześniej i opublikowanymi w pracy P3 analizami tych samych próbek przy pomocy HPLC.

Próbki pektyn DASP, czego nie badano wcześniej, wykazywały wysoką zawartość białka (nawet do $80,5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ próbki). Demineralizacja znacząco zmniejszyła zawartość białka do około $10\text{--}12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ próbki oraz spowodowała wzrost procentowy zawartości poszczególnych komponentów pektyn (próbki D-carrot-DASP i D-apple-DASP).

Zarówno modyfikacje enzymatyczne (próbki ET-carrot-DASP i ET-apple-DASP), jak i hydroliza kwasowa (próbki AH-carrot-DASP i AH-apple-DASP) powodowały zmiany zawartości monosacharydów, przy czym wielkość zmian była zależna od źródła pektyn. W przypadku próbek marchwi w wyniku modyfikacji enzymatycznych (ET-carrot-DASP) zaobserwowano niewielkie zmiany zawartości monosacharydów, głównie związane ze spadkiem zawartości kwasu galakturonowego i arabinozy. W przypadku próbek jabłka (ET-apple-DASP), degradacja enzymatyczna była bardziej efektywna. Powodowała znaczący spadek zawartości GalA oraz monosacharydów budujących łańcuchy boczne – arabinozy, ramnozy i galaktozy. Zarówno dla próbek z jabłek jak i marchwi, zmiany te pociągały za sobą spadek stopnia rozgałęzienia regionu RG-I, jednak były one szczególnie istotne dla próbek z owoców jabłoni. Hydroliza kwasowa spowodowała również znaczące zmiany w profilu monosacharydowym pektyn DASP z obu źródeł (próbki AH-carrot-DASP i AH-apple-DASP). Degradacja cukrów prostych (arabinozy, ramnozy i galaktozy) spowodowała procentowy wzrost zawartości kwasu galakturonowego i wzbogacenie próbki w region homogalakturnanu. W rezultacie próbki AH-carrot DASP i AH-apple DASP uzyskały wysoki stopień liniowości.

Tabela 7. Właściwości chemiczne wygenerowanych próbek pektyn, w tym zawartość kwasu galakturonowego, cukrów obojętnych, proporcje składników i zawartość białka. Wyniki są wyrażone jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe.

	M-carrot-DASP	D-carrot-DASP	ET-carrot-DASP	AH-carrot-DASP	M-apple-DASP	D-apple-DASP	ET-apple-DASP	AH-apple-DASP
Zawartość monosacharydów (g/100g próbki)								
Kwas galakturonowy	37,71 $\pm 0,23^c$	52,59 $\pm 1,11^a$	45,43 $\pm 0,54^d$	79,27 $\pm 3,68^g$	50,21 $\pm 1,58^a$	58,73 $\pm 1,98^e$	27,51 $\pm 0,37^b$	70,46 $\pm 3,49^f$
Arabinoza	7,15 $\pm 3,97^a$	14,21 $\pm 9,76^{cd}$	9,40 $\pm 0,59^{ac}$	0,02 $\pm 0,01^b$	19,06 $\pm 3,8^d$	39,44 $\pm 2,67^e$	7,15 $\pm 1,40^a$	0,33 $\pm 0,30^b$
Ramnoza	2,43 $\pm 0,19^e$	3,17 $\pm 0,31^d$	3,05 $\pm 0,18^{bd}$	0,95 $\pm 0,04^{ab}$	1,00 $\pm 0,05^{ab}$	1,21 $\pm 0,12^b$	0,64 $\pm 0,11^{ac}$	0,23 $\pm 0,03^c$
Galaktoza	10,41 $\pm 0,66^c$	17,57 $\pm 2,67^a$	16,97 $\pm 1,00^a$	1,55 $\pm 0,07^{bc}$	7,91 $\pm 1,44^{de}$	15,30 $\pm 0,68^a$	4,76 $\pm 1,26^{cd}$	1,07 $\pm 0,29^b$
Glukoza	0,13 $\pm 0,08^a$	1,02 $\pm 0,82^{abc}$	0,71 $\pm 0,05^{ab}$	0,34 $\pm 0,04^{ab}$	1,38 $\pm 0,32^{bc}$	2,36 $\pm 0,20^c$	0,75 $\pm 0,44^{ab}$	-
Ksyloza	-	-	-	-	0,72 $\pm 0,05^a$	0,97 $\pm 0,11^b$	0,34 $\pm 0,08^c$	0,42 $\pm 0,09^c$
Mannoza	-	-	0,44 $\pm 0,02^a$	0,42 $\pm 0,02^a$	-	-	-	-
Zawartość RG I								
Rha/GalA	0,06	0,06	0,07	0,01	0,02	0,02	0,02	0
Stopień rozgałęzienia RGI								
(Ara+Gal)/Rha	7,23	10,03	8,65	1,65	17,05	29,36	18,61	6,09
Stopień liniowości pektyn								
GalA/(Rha+Ara+Gal+Xyl)	1,89	1,50	1,54	31,46	2,58	1,52	2,08	28,53

Zawartość białka (mg białka/g próbki)

76,91 ±8,91 ^b	10,52 ±0,62 ^a	27,88 ±1,68 ^c	11,58 ±1,95 ^a	80,47 ±4,12 ^b	12,81 ±1,17 ^a	16,67 ±2,88 ^a	12,38 ±0,81 ^a
-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------

Różne oznaczenia literowe wskazują istotne różnice ($p < 0,05$). M, próbka macierzysta; D, demineralizacja; ET, traktowanie enzymatyczne (GAL+RGAE+ABF+RGL); AH, hydroliza kwasowa; Rha, ramnoza; GalA, kwas galakturonowy; Ara, arabinoza; Gal, galaktoza; Xyl, ksyloza.

W eksperymencie zmierzono również zawartość jonów, która jest istotna w kontekście badań właściwości reologicznych. Dwuwartościowe kationy wpływają na właściwości pektyn w roztworze, szczególnie dla frakcji DASP o zerowym stopniu metylacji, która wykazuje wysoką zdolność wiązania jonów przez grupy karboksylowe (Kyomugasho i in., 2017, 2018). Jony wapnia i żelaza poprawiały właściwości reologiczne matrycy polisacharydów ekstrahowanych z jabłek (Mierczyńska i in., 2015) oraz pektyn frakcji DASP (Gawkowska i in., 2018a). Moduł zachowawczy (G') próbek z jonami wapnia i żelaza był większy niż moduł stratności (G''), co wskazuje na wytworzenie trwałego żelu. W przypadku dodatku jonów magnezu obserwowany efekt na proces żelowania i zagęszczania zawiesin matrycy polisacharydowej był odwrotny i właściwości reologiczne uległy pogorszeniu. Obecność jednowartościowych jonów, szczególnie Na^+ , również wpływa na pewne funkcjonalne właściwości pektyn, takie jak tworzenie żelu, odwracalność procesu żelowania przez pektyny o niskim DE i zdolność wiązania kationów (Humerez-Flores, Kyomugasho, i in., 2022; Kastner i in., 2020; Munarin i in., 2012).

Tabela 8. Zawartość jonów Fe^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} w badanej frakcji dla obu źródeł przed (M-carrot-DASP, M-apple-DASP) i po procesie demineralizacji (D-carrot-DASP, D-apple-DASP).

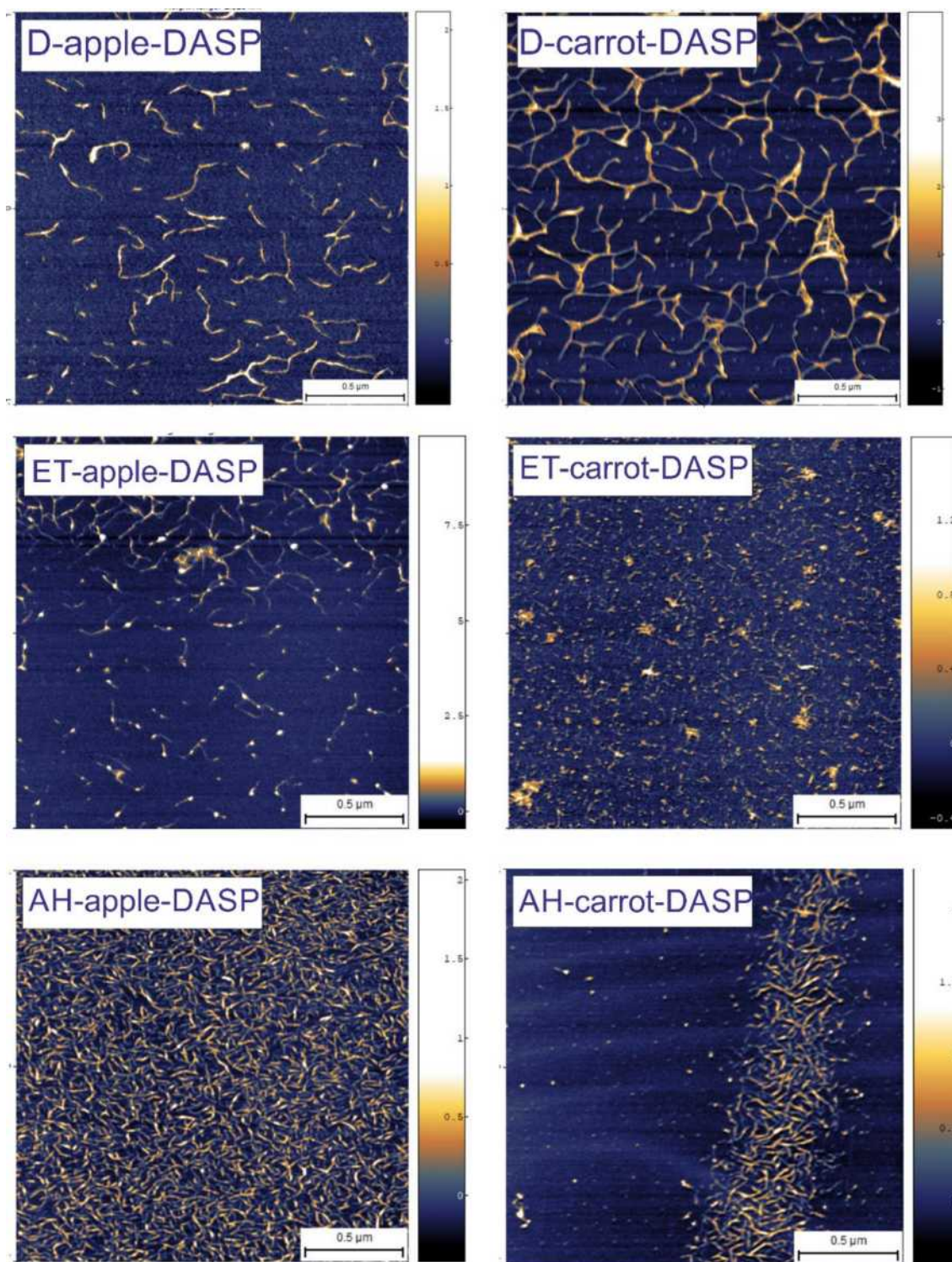
	M-carrot-DASP	D-carrot-DASP	M-apple-DASP	D-apple-DASP
	Zawartość mineralów ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ próbki)			
Fe^{2+}	0,04±0,00 ^a	0,04±0,04 ^a	0,08±0,0 ^a	0,01±0,00 ^a
Na^+	42,73±2,61 ^c	0,59±0,23 ^a	41,40±5,66 ^c	0,85±0,15 ^a
Mg^{2+}	0,15±0,03 ^a	0,05±0,02 ^a	0,20±0,10 ^a	0,03±0,00 ^a
K^+	3,47±1,81 ^{ab}	0,34±0,19 ^a	6,01±1,56 ^b	0,42±0,11 ^a
Zn^{2+}	0,01±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
Ca^{2+}	0,54±0,09 ^a	0,40±0,15 ^a	0,66±0,09 ^a	0,53±0,09 ^a

Różne oznaczenia literowe wskazują istotne różnice ($p < 0,05$) między zawartością określonego składnika w obrębie danego źródła pektyn.

Natywna frakcja pektyn, uzyskana zarówno z marchwi, jak i z jabłek, wykazywała obecność minerałów, co przedstawiono w Tabeli 8. Wśród jonów dwuwartościowych, w najwyższym stężeniu występował wapń ($0,54 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ i $0,66 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ odpowiednio dla próbek z marchwi i z jabłka). Jednak w obu testowanych materiałach najwyższą zawartość odnotowano dla jonów sodu ($42,73 \pm 2,61 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ dla M-carrot-DASP i $41,40 \pm 5,66 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ dla M-apple-DASP) oraz potasu ($3,47 \pm 1,81 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ dla M-carrot-DASP i $6,01 \pm 1,56 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ dla M-apple-DASP). Obecność tych jonów w dużych ilościach może wynikać z użytych podczas ekstrakcji sekwencyjnej reagentów – Na_2CO_3 , NaBH_4 i KOH , które nie zostały dokładnie usunięte pomimo procesu dializy. Próbki poddane procesowi demineralizacji (próbki D-carrot-DASP i D-apple-DASP) wykazały znaczne zmniejszenie zawartości minerałów, w tym sodu, do poziomu, który jest nieistotny w kontekście dalszych modyfikacji.

5.2.3.2. Zmiany struktury pektyn DASP

Fracje z obu źródeł tworzyły w badanym stężeniu struktury przypominające te uzyskane w poprzednich badaniach, opublikowanych w pracach P3 i P4, z charakterystycznymi lokalnie występującymi punktami zgięć i rozgałęzień. Rysunek 8 przedstawia reprezentatywne obrazy wysokościowe AFM pektyn DASP obu materiałów poddanych modyfikacjom w tej części pracy. Demineralizacja spowodowała, że w stosunku do obrazów tej frakcji w stanie natywnym opublikowanych w P3 i P4, w przypadku jabłkowej pektyny DASP (D-apple-DASP) nie zaobserwowano istotnych jakościowych różnic. Odmiennie, w przypadku pektyn DASP z marchwi (D-carrot-DASP), demineralizacja spowodowała tendencję włókien do agregacji w roztworze. Zastosowanie modyfikacji enzymatycznych (próbki ET) spowodowały, że włókna próbek ET-apple-DASP i ET-carrot-DASP przybierały formę krótszych, bardziej liniowych polisacharydów i/lub oligosacharydów na mice, z tendencją do lokalnej agregacji.



Rysunek 8. Reprezentatywne obrazy wysokościowe AFM frakcji pektyn rozpuszczalnej w słabych alkaliach (DASP) na mice jako efekt różnych traktowań: D – demineralizacja; ET – GAL+RGAE+ABF+RGL ; AH – hydroliza kwasowa.

Średnia długość szkieletu (Tabela 9) zmniejszała się po działaniu enzymów w przypadku obu źródeł, jednak bardziej znaczącą zmianę zaobserwowano dla próbek z marchwi

(ET-carrot-DASP). Na wykresach rozkładu długości szkieletu (Rysunek 9), pojawia się więcej cząstek o średniej długości, nie obserwuje się za to molekuł o długości 400 nm i dłuższych. Wzrasta również znacząco szerokość włókien (Tabela 9), co może być spowodowane reorientacją i zbliżeniu włókien w wyniku utworzenia bardziej uporządkowanych struktur. Rozkład długości szkieletu (Rysunek 9) analizowanych włókien wskazuje na obecność zarówno dużej liczby bardzo krótkich odcinków, jak i dłuższych cząsteczek, co w połączeniu z analizą rozkładu masy molowej (Rysunek 10) sugeruje wzbogacenie w oligomery o niskiej masie cząsteczkowej i mniejszą ilość polimerów o średniej MM w wyniku degradacji enzymatycznej.

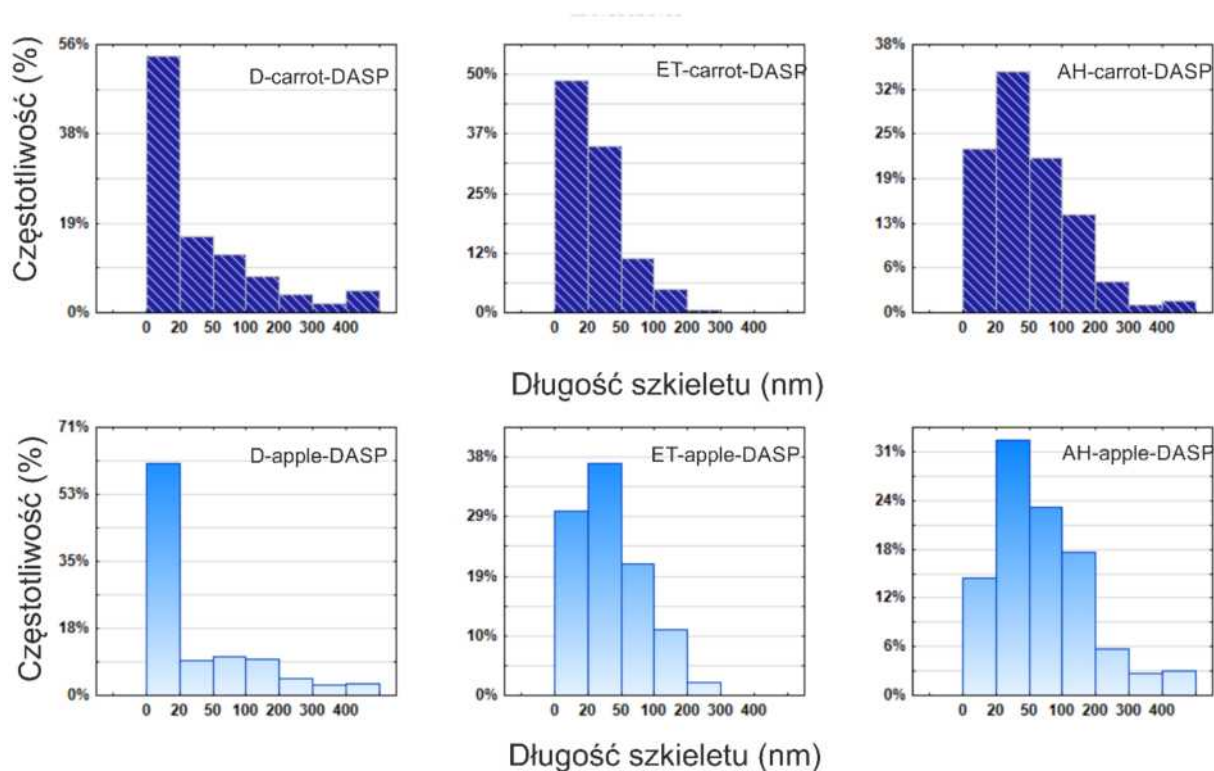
Tabela 9. Parametry strukturalne frakcji pektyn rozpuszczalnej w słabych alkaliach (DASP) po różnych traktowaniach.

	Próbka					
	D-carrot-DASP	ET-carrot-DASP	AH-carrot-DASP	D-apple-DASP	ET-apple-DASP	AH-apple-DASP
Długość szkieletu (nm)	73,34 ±2,16 ^a	31,91 ±1,76 ^b	72,15 ±1,77 ^a	67,14 ±2,10 ^a	49,72 ±1,54 ^c	96,59 ±1,23 ^d
Długość włókna (nm)	59,14 ±1,53 ^a	29,67 ±1,25 ^b	61,66 ±1,26 ^a	58,90 ±1,48 ^a	44,96 ±1,09 ^c	77,98 ±0,87 ^d
Szerokość włókna (nm)	9,41 ±0,25 ^c	15,54 ±0,20 ^a	16,69 ±0,20 ^d	8,01 ±0,24 ^b	15,49 ±0,18 ^a	15,21 ±0,14 ^a
Średnia wysokość (nm)	0,94 ±0,00 ^f	0,32 ±0,00 ^b	0,38 ±0,00 ^d	0,43 ±0,00 ^c	0,36 ±0,00 ^c	0,28 ±0,00 ^a
n	2164	3251	3176	2280	4364	6561

Wartości są wyrażone jako średnia ± S.E.M. (standardowy błąd średniej); Różne oznaczenia literowe wskazują istotne różnice statystyczne (ANOVA, $p < 0,05$). D, demineralizacja; ET, traktowanie enzymatyczne (GAL+RGAE+ABF+RGL); AH, hydroliza kwasowa; n oznacza liczbę molekuł.

W przypadku hydrolizy kwasowej (próbki AH) na obrazach AFM widoczne są włókna o średniej długości z tendencją do zwiększania ich szerokości. Analiza obrazu wykazała, że hydroliza kwasowa nie spowodowała znaczących zmian w parametrach związanych

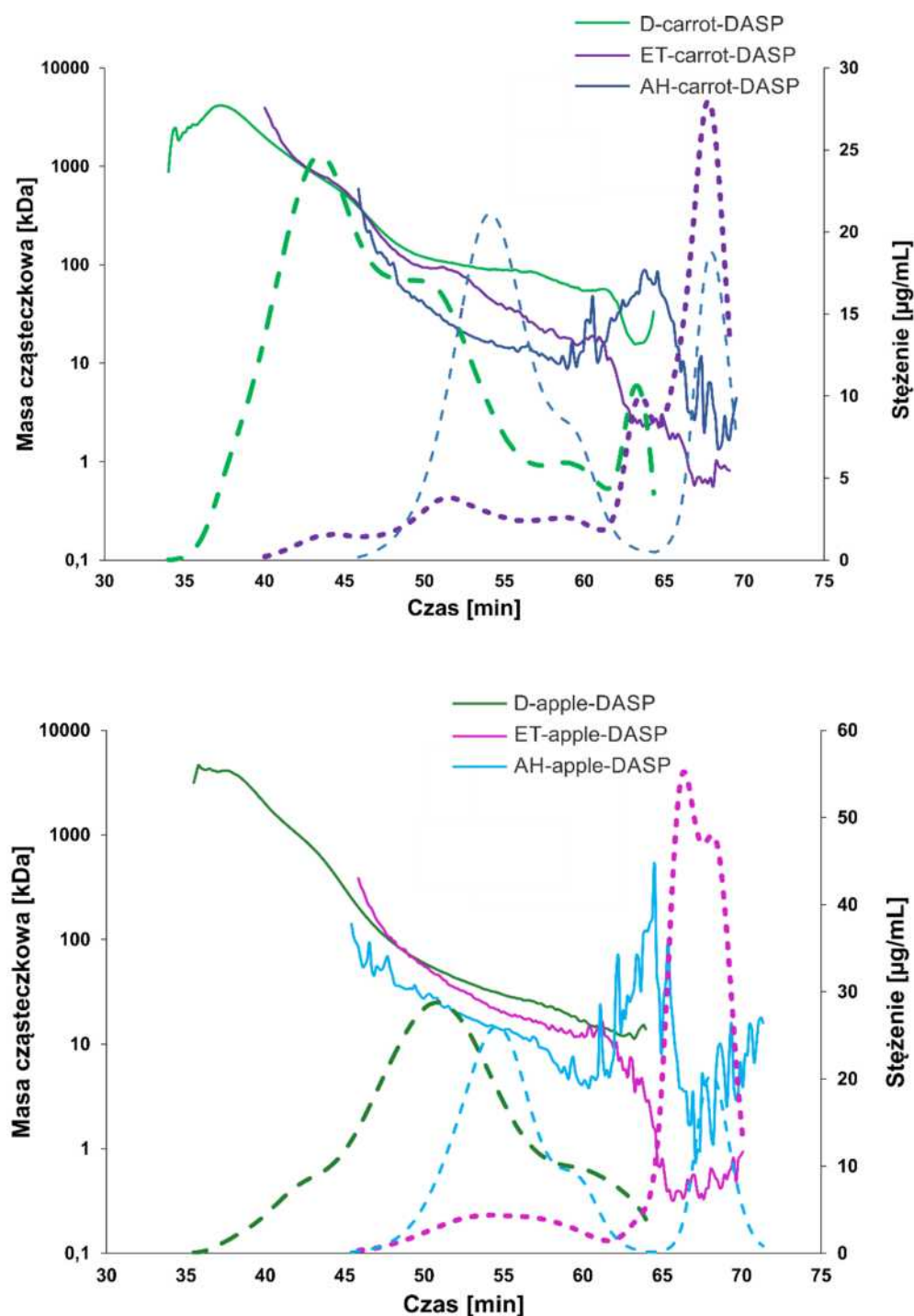
z długością włókien w przypadku próbek z marchwi, natomiast dla próbek z jabłek zaobserwowano włókna o około 50% dłuższe. W przypadku obu materiałów zaobserwowano blisko dwukrotny wzrost szerokości obiektów przy znacznym zmniejszeniu ich wysokości (Tabela 9). Histogramy rozkładu (Rysunek 9) pokazują, że w wyniku hydrolizy kwasowej rozkład długości szkieletu dla obu materiałów przesunął się w stronę wyższych wartości, wskazując na obecność głównie cząsteczek o długości 20–100 nm, pomimo braku zmiany wartości średniej dla AH-carrot-DASP w Tabeli 9. Wydłużenie włókien po hydrolizie kwasowej koresponduje z wcześniejszym wnioskiem, że hydroliza kwasowa spowodowała zwiększenie udziału HG w próbce. W natywnej strukturze DASP, bogatszej w RG-I, interakcje między sąsiadującymi łańcuchami zachodzą prawdopodobnie przez łańcuchy boczne, podczas gdy w strukturze złożonej w większości z liniowego HG interakcje nabierają charakteru oddziaływań pomiędzy łańcuchami głównymi. Może to sprawiać, że struktura jest bardziej zwarta, co wydaje się być widoczne na obrazach AFM (Rysunek 8) dla próbek po hydrolizie kwasowej.



Rysunek 9. Rozkład częstości występowania długości szkieletu dla poszczególnych próbek. D, demineralizacja; ET, traktowanie enzymatyczne (GAL+RGAE+ABF+RGL); AH, hydroliza kwasowa.

5.2.3.3. Właściwości molekularne

Rozkład masy cząsteczkowej wygenerowanych próbek pektyn z marchwi i jabłek przedstawiony jest na Rysunku 10. Profil elucji D-carrot-DASP obejmował szeroki zakres, sugerując, że frakcja składa się zarówno z polimerów o wyższej, jak i również niższej masie. Ostry pik przy 63 min. może reprezentować frakcję najmniejszych cząsteczek w tej próbce, jednakże były one obecne w stosunkowo niewielkich ilościach. Dla frakcji D-apple-DASP profil elucji był stosunkowo szeroki, monomodalny i obejmował głównie polimery o średniej masie cząsteczkowej, co sugerowała analiza składu monosacharydowego. Ramiona pików po obu stronach wskazywały na obecność frakcji odpowiednio o wyższej lub niższej masie molekularnej (Humerez-Flores, Kyomugasho, i in., 2022; Van Audenhove i in., 2021).



Rysunek 10. Rozkład masy cząsteczkowej różnych wygenerowanych próbek pektyn z marchwi i jabłek. Masa cząsteczkowa (pełne linie) i stężenie (linie przerywane) są przedstawione jako funkcja czasu elucji. D, demineralizacja; ET, traktowanie enzymatyczne (GAL+RGAE+ABF+RGL); AH, hydroliza kwasowa.

Zarówno modyfikacje enzymatyczne, jak i chemiczne, którym poddano DASP z obu źródeł, przyczyniły się do wyraźnych zmian strukturalnych widocznych na Rysunku 10.

Produkcja próbek pektyn o niższej masie cząsteczkowej niż frakcje demineralizowane została wykazana przesunięciem profilu rozkładu masy w prawo, dla obu próbek traktowanych enzymami lub poddanych hydrolizie kwasowej.

Profil stężenia rozkładu masy cząsteczkowej próbki ET-apple-DASP (Rysunek 10) wskazywał na znaczne wzbogacenie w oligomery o niskiej masie, które eluowały między 60 a 70 minutą analizy HPSEC-MALLS, oraz mniejszą ilość polimerów o średniej masie cząsteczkowej. Pik stężenia około 68 minuty może wskazywać na obecność jednostek GalA, pochodzących z depolimeryzacji HG, lub na obecność resztkowych soli (Humerez-Flores i in., 2021). Na podstawie niewielkiej ilości kwasu galakturonowego w próbce i rozkładu masy cząsteczkowej można założyć, że wiązania między Rha a GalA zostały skutecznie rozcięte, a krótkie segmenty HG i jednostki GalA lub zdegradowane monosacharydy z łańcuchów bocznych pozostały w próbce. Na podstawie krzywych stężenia ET-carrot-DASP można zauważyć, że próbka ta eluowała wcześniej, co oznacza, że generowane były cząsteczki pektyn o wyższej średniej masie molekularnej. Pik przy około 68 minuty, obserwowany dla obu źródeł jest znacznie niższy w porównaniu z próbką pochodzącą z jabłek. Sugeruje to, że degradacja enzymatyczna mogła być mniej skuteczna dla pektyn z marchwi.

Tabela 10. Średnia masa cząsteczkowa oraz lepkość roztworów (1% w/v) pektyn frakcji DASP po zastosowaniu różnych modyfikacji.

Próbka	Średnia masa cząsteczkowa (kDa)	Lepkość (mPa·s)
D-carrot-DASP	656±76,22	1414,88±294,22
ET-carrot-DASP	61,50±13,61	51,97±8,78
AH-carrot-DASP	17,40±7,74	3,98±0,17
D-apple-DASP	213,33±5,69	1791,27±127,03
ET-apple-DASP	5,92±0,49	2,18±0,10
AH-apple-DASP	13,17±2,54	2,42±0,12

D, demineralizacja; ET, traktowanie enzymatyczne (GAL+RGAE+ABF+RGL); AH, hydroliza kwasowa.

Dla próbek DASP po hydrolizie kwasowej (próbki AH) obserwowano bimodalny rozkład masy cząsteczkowej dla obu próbek. Pierwszy pik z maksimum przy 55 minutach wskazywał na obecność małych i wysoce liniowych fragmentów pektyn (Neckebroek i in., 2020), co potwierdza wysoka zawartość GalA i niższa zawartość głównych cukrów obojętnych.

Drugi pik na profilu stężenia, przy 68 minucie, pokrywa się z tym uzyskanym dla modyfikacji enzymatycznych, jednak stężenie monomerów jest w tym przypadku niższe. Uzyskane wyniki wskazują na obecność zarówno polimerów kwasu galakturonowego, jak i krótkich łańcuchów arabinozy i/lub galaktozy wraz z resztami ramnozy, które pozostały w próbce po procesie dializy.

Jak sugerują wcześniejsze badania, lepkość roztworów pektyn silnie zależy od długości łańcucha pektynowego (Cuevas-Bernardino i in., 2016; Hua i in., 2018; Humerez-Flores, Verkempinck, i in., 2022). Depolimeryzacja łańcuchów powoduje zmiany w oddziaływaniach międzycząsteczkowych pomiędzy ich łańcuchami. W przypadku badanych polisacharydów, zmiana lepkości w wyniku zastosowanych modyfikacji frakcji jest wyraźna dla obu źródeł. Zarówno modyfikacje enzymatyczne, jak i hydroliza kwasowa spowodowały znaczny spadek lepkości na skutek spadku średniej masy cząsteczkowej (Tabela 10). Podobne wyniki uzyskano wcześniej dla otrzymanych w wyniku reakcji β -eliminacji, pektyn bogatych w RG-I, gdzie fragmentacja łańcucha poprzez hydrolizę kwasową prowadziła do zmniejszenia lepkości próbek pektyn, co miało istotne znaczenie w kontekście obniżenia właściwości emulgujących i stabilizujących emulsje (Humerez-Flores i in., 2021). Na podstawie wyników średniej masy cząsteczkowej zestawionych w Tabeli 10 nie można wykazać liniowej zależności między masą molową a lepkością próbek o natywnej strukturze. D-apple-DASP wykazała niemal trzykrotnie niższą masę cząsteczkową w porównaniu do pektyn z marchwi D-carrot-DASP, przy jednoczesnym zachowaniu wyższej lepkości. Można podejrzewać, że masa cząsteczkowa dla natywnego DASP z jabłka jest w rzeczywistości wyższa, a uzyskany wynik jest efektem użycia filtra o porowatość 0,45 μm , co z dużym prawdopodobieństwem zatrzymało najdłuższe polimery przed dozowaniem do systemu chromatograficznego.

Najniższa lepkość jest obserwowana dla próbek ET-apple-DASP i AH-apple-DASP, co jest zgodne z uzyskanymi niskimi wartościami średniej masy cząsteczkowej ($5,92 \pm 0,49$ kDa dla ET-apple-DASP oraz $13,17 \pm 2,54$ kDa dla AH-apple-DASP). Zarówno niższa średnia MM, jak i lepkość dla ET-apple-DASP, w porównaniu do ET-carrot-DASP, może wynikać ze znacznie mniejszej zawartości kwasu galakturonowego w próbce z jabłka modyfikowanego enzymami, co przekłada się na niską zawartość HG, mającego znaczny wpływ na lepkość pektyn (Chan i in., 2016; Ngouémazong i in., 2015).

5.2.4. Podsumowanie

Dalsze badania frakcji DASP wykazały, że modyfikacja segmentów RG-I ma znaczący wpływ na właściwości funkcjonalne tej frakcji. Przeprowadzone analizy przy pomocy wysokosprawnej chromatografii jonowymiennej sprzężonej z detektorem pulsacyjno-amperometrycznym (HPAEC-PAD) próbek DASP z jabłek i marchwi z uwzględnieniem demineralizacji potwierdziły wyniki uzyskane w publikacji P3, że frakcja ta jest bogata w RG-I z pewnymi różnicami wynikającymi ze źródła pektyn. Przeprowadzono również odmienne modyfikacje frakcji DASP mające na celu bardziej znaczące zmiany w domenie RG-I w stosunku do zmian obserwowanych w pracy P3. W wyniku procesu demineralizacji zredukowano zawartość takich jonów jak Fe^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , oraz Ca^{2+} . Frakcja pektynowa z jabłek zawierała więcej kwasu galakturonowego i arabinozy, podczas gdy pektyny z marchwi charakteryzowały się wyższą zawartością galaktozy i ramnozy, co wskazuje na większy udział RG-I w pektynach marchwi.

Degradacja enzymatyczna próbek po demineralizacji prowadzona w sposób sekwencyjny z dodaniem kolejnego enzymu degradującego galaktozę spowodowało znaczące skrócenie molekuł na obrazach AFM. Analizy HPAEC-PAD pokazały spadek stopnia rozgałęzienia molekuł próbek ze zdegradowanym RG-I w stosunku do próbek po demineralizacji.

Hydroliza kwasowa nie spowodowała znaczących zmian w parametrach związanych z długością włókien w przypadku próbek z marchwi, natomiast dla próbek z jabłek zaobserwowano włókna wyraźnie dłuższe. Jednak analiza rozkładu długości pokazała, że w wyniku hydrolizy kwasowej rozkład długości szkieletu dla obu materiałów przesunął się w stronę wyższych wartości, wskazując na obecność głównie cząsteczek o długości 20-100 nm, pomimo braku zmiany wartości średniej dla zhydrolizowanej próbki DASP z marchwi. Wydłużenie włókien po hydrolizie kwasowej koresponduje z wcześniejszym wnioskiem, że hydroliza kwasowa spowodowała zwiększenie udziału HG w próbce. Wynik ten można tłumaczyć tym, że w natywnej strukturze DASP, bogatszej w RG-I, interakcje między sąsiadującymi łańcuchami zachodzą prawdopodobnie przez łańcuchy boczne, podczas gdy w strukturze złożonej w większości z liniowego HG interakcje nabierają charakteru oddziaływań pomiędzy łańcuchami głównymi.

Również profil elucji HPSEC-MALLS potwierdził zmiany rozkładu masy cząsteczkowej zmodyfikowanych pektyn, z tendencją do wzbogacania frakcji w oligomery

o niskiej masie. Modyfikacje enzymatyczne i hydroliza kwasowa prowadziły do depolimeryzacji łańcuchów pektynowych, szczególnie łańcuchów bocznych domeny RG-I, co skutkowało zmniejszeniem lepkości próbek DASP.

6. Podsumowanie i wnioski

W niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono szereg eksperymentów, w których badano frakcję pektyn rozpuszczalną w słabych alkaliach (DASP), bogatą w RG-I, ekstrahowaną z dwóch różnych źródeł (jabłko i marchew). Głównym celem było zrozumienie mechanicznej roli jednostek ramnozy w łańcuchu głównym pektyn. Dlatego badania obejmowały analizy składu monosacharydowego próbek, nanostruktury oraz właściwości reologicznych pektyn w roztworze i właściwości mechanicznych ścian i analogów ścian komórkowych. By ocenić rolę ramnozy, do której przyłączone są pozostałe cukry proste, dokonywano modyfikacji enzymatycznych ukierunkowanych na degradację pektyn domeny RG-I oraz hydrolizę kwasową powodującą degradację łańcuchów bocznych RG-I.

W wyniku przeprowadzonych badań udowodniono, że struktura domeny RG-I, w szczególności wiązanie w łańcuchu głównym ramnozy z kwasem galakturonowym oraz obecność łańcuchów bocznych przyłączonych do ramnozy, szczególnie arabinozy, kształtuje właściwości reologiczne w roztworze oraz właściwości mechaniczne ścian komórkowych.

Wyniki przeprowadzonych badań mogą zostać wykorzystane w praktyce. Wykazano, że jednostki ramnozy umieszczone naprzemiennie pomiędzy pojedynczymi jednostkami kwasu galakturonowego lub ich polimeru (homogalakuronanu) mają kluczowe znaczenie dla elastyczności i zdolności żelujących pektyn frakcji DASP. Wykazano również, że modyfikacje enzymatyczne i chemiczne RG-I znacząco wpływają na strukturę i właściwości reologiczne frakcji DASP. Wiedza ta może być wykorzystana do modyfikacji pektyn w celu specyficznych zastosowań w przemyśle. Badania wykazały również istotną rolę RG-I w mechanice kompozytów z celulozą i hemicelulozą. Wynik ten może być wykorzystany do projektowania inspirowanych ścianą komórkową naturalnych kompozytów o różnych właściwościach mechanicznych.

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące główne wnioski:

1. Frakcja pektyn rozpuszczalna w słabych alkaliach (DASP) jest bogata w domenę RG-I, przy czym jej udział jest znacznie większy w próbkach z marchwi niż jabłka. DASP z marchwi zawiera znacznie więcej ramnozy, za to mniej arabinozy niż DASP z jabłka.
2. Roztwory pektyn DASP z dwóch badanych źródeł wykazują właściwości elastyczne, przy czym obecność arabinozy sprzyja tworzeniu silniejszych żeli (próbki DASP

z jabłek), natomiast obecność ramnozy może być związana z większą odpornością na odkształcenia mechaniczne (próbki DASP z marchwi).

3. Arabinoza w łańcuchach bocznych RG-I uczestniczy w tworzeniu sieci pektynowej i wpływa na właściwości pseudoplastyczne oraz lepkość roztworu pektyn DASP. Znaczący wzrost długości łańcuchów po usunięciu arabinozy wskazuje, że w pewnych konformacjach, mogą one ograniczać interakcje łańcuchów polimerowych.
4. Wtrącenie ramnozy, obecność przyłączonej do ramnozy arabinozy oraz stopień acetylacji są parametrami strukturalnymi domeny RG-I odpowiedzialnymi za różnice we właściwościach reologicznych roztworów pektyn DASP pochodzących z owoców jabłoni i korzenia marchwi.
5. Lepkość roztworów pektyn DASP zmniejsza się wraz ze stopniem degradacji domeny RG-I i zależy proporcjonalnie od masy cząsteczkowej. Zmniejszeniu lepkości towarzyszyło powstanie polimerów o krótszych łańcuchach, jednak o wysokim stopniu liniowości w wyniku hydrolizy kwasowej lub powstanie polimerów o liniowym charakterze w wyniku selektywnej degradacji enzymatycznej domeny RG-I.
6. Pektyny frakcji DASP, bogatej w RG-I, odgrywają istotną rolę we właściwościach mechanicznych ściany komórkowej roślin. Degradacja domeny RG-I w postaci depolimeryzacji łańcucha głównego Rha-GalA oraz degradacji przyłączonych do ramnozy łańcuchów arabinozy powodują zmniejszenie modułu Younga zarówno naturalnej ściany komórkowej jak i analogów ścian komórkowych opartych na celulozie bakteryjnej.

7. Tekst publikacji P.1

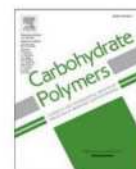
Carbohydrate Polymers 278 (2022) 118909



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol



Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review

Adrianna Kaczmarek, Piotr M. Pieczywek, Justyna Cybulska, Artur Zdunek*

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Rhamnogalacturonan I
Rhamnose
Pectin
Structural characteristics

ABSTRACT

Rhamnogalacturonan I (RG-I) belongs to the pectin family and is found in many plant cell wall types at different growth stages. It plays a significant role in cell wall and plant biomechanics and shows a gelling ability in solution. However, it has a significantly more complicated structure than smooth homogalacturonan (HG) and its variability due to plant source and physiological state contributes to the fact that RG-I's structure and function is still not so well known. Since functionality is a product of structure, we present a comprehensive review concerning the chemical structure and conformation of RG-I, its functions in plants and properties in solutions.

1. Introduction

Pectins are the major component of the primary cell wall and middle lamella in higher plants (Posé, Kirby, Mercado, Morris, & Quesada, 2012; Redgwell, Fischer, Kendal, & MacRae, 1997). For dicotyledons and non-graminaceous monocots its content may even reach 30–35% of the dry weight. Smaller amounts of those polysaccharides (2–10%) may be found in the cell walls of grasses and also in wood tissue (5%) (Voragen, Coenen, Verhoef, & Schols, 2009; Yadav, Yadav, Yadav, & Yadav, 2009; Zavala-Páramo, Villa-Rivera, Lara-Márquez, López-Romero, & Cano-Camacho, 2020). Pectin is a complex of several polysaccharides, it is rich in galacturonic acid (Mierczyńska, Cybulska, Pieczywek, & Zdunek, 2015; Voragen et al., 2009). The most important pectin domains are homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan I (RG-I) and rhamnogalacturonan II (RG-II) (Cornuault, Posé, & Knox, 2018; Mohnen, 2008; O'Neill, Albersheim, & Darvill, 1990). Homogalacturonan (HG) is a linear polymer consisting of 1,4-linked α -D-galacturonic acid residues which can be methyl-esterified and acetylated. Due to its unsubstituted backbone, HG is regarded as a "smooth" region of pectins (Mao et al., 2019). Rhamnogalacturonan II has a highly conserved structure with the same backbone as HG, however, it also has four complex side chains, containing more than ten different sugars.

The backbone of RG-I is different: it is composed of repeating units of galacturonic acid (GalA) residues and rhamnose (Rha) which are linked as follows; $[\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1} \rightarrow 2\text{)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1} \rightarrow)]$ (Renard, Lahaye, Mutter, Voragen, & Thibault, 1997). RG-I has numerous side chains, which are mainly linked to the O-4 rhamnose units, and contain neutral sugars like arabinans, galactans and/or arabinogalactans (Yapo, Lerouge, Thibault, & Ralet, 2007). Rhamnogalacturonan I is found in many cell wall types and plant growing stages. It is most commonly found in primary cell walls and middle lamellae, although the presence of this polymer in gelatinous-type secondary cell walls has been reported (Mikshina et al., 2012). Table 1 presents examples of RG-I contents in relation to the cell wall and pectic polysaccharides for different plant sources. In relation to cell wall material, RG-I makes up a range of 5–36% of cell wall content. In relation to pectic polysaccharides in cell walls, RG-I comprises from 11% to 85% depending on the source plant and the extraction method. The RG-I content may also vary depending on the part of the plant that it originates from, this was observed for the pectin fraction extracted from broccoli with water and chelator, where the florets were enriched in branched RG-I and the stem was composed of more linear polysaccharides (Houben, Jolie, Fraeye, Van Loey, & Hendrickx, 2011).

HG is the simplest pectin and therefore its functionality is the best

Abbreviations: AFase, α -L-arabinofuranosidase; Ara, arabinose; AFM, atomic force microscopy; β -Gal, β -galactosidase; CSP, chelator-soluble pectin fraction; DA, degree of acetylation; DASP, diluted alkali-soluble pectin fraction; DM, degree of methyl esterification; GalA, galacturonic acid; (Gal+Ara)/UA, molar ratio of total galactose and arabinose molar content to uronic acids molar content; Gal, galactose; GlcA, β -D-glucuronic acid; HG, homogalacturonan; HM, high-methyl esterified; LM, low-methyl esterified; RG-I, rhamnogalacturonan I; RG-II, rhamnogalacturonan II; Rha, rhamnose; RGL, Rhamnogalacturonan lyase; UA, uronic acids; WSP, water-soluble pectin fraction.

* Corresponding author.

E-mail address: a.zdunek@ipan.lublin.pl (A. Zdunek).

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118909>

Received 10 August 2021; Received in revised form 13 November 2021; Accepted 13 November 2021

Available online 18 November 2021

0144-8617/© 2021 The Authors.

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

understood due to experimental and theoretical studies. The HG backbone is relatively stiff and may change helical conformation due to the degree of methylation (Voragen et al., 2009; Zdunek et al., 2021). In contrast to HG, the RG-I sections are more flexible creating so called “hairy” regions of pectin (Pieczywek, Kozioł, Plaziński, Cybulska, & Zdunek, 2020; Zdunek et al., 2021). Moreover, neutral sugars are linked to the RG-I backbone at the rhamnose unit. A significantly more complicated structure and variability due to plant species and the physiological state of the plant or extraction method have resulted in RG-I being less well understood. In this review we shall focus exclusively on RG-I. Since functionality is a product of structure, we present a comprehensive view concerning chemical structure and conformation in solutions of RG-I molecules, and the resulting functions of the polysaccharide in the plant and its properties in *in vitro* conditions in solutions.

2. Chemical structure of RG-I

2.1. The backbone of RG-I

The rhamnogalacturonan I backbone is composed of repeating units of galacturonic acid (GalA) and rhamnose (Rha) [$\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-GalP}A\text{-(1}\rightarrow 2\text{)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow$] (Renard et al., 1997) (Fig. 1). The molar ratio of GalA to Rha equals 1 and indicates the alternation of those saccharides in the RG-I backbone. The average number of GalA-Rha disaccharide units constituting the RG-I backbone is 100 (Albersheim et al., 1996; Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001), although the values obtained vary depending on the source. The data obtained from suspension-cultured sycamore cell wall indicated that the RG-I backbone may be composed of 300 disaccharide repeating units (McNeil et al., 1980) while for soybean pectins it was estimated as 15, 28 and 100 GalA-Rha units (Nakamura

et al., 2001). Acid hydrolysis of de-esterified apple, beet and citrus pectins led to the attainment of oligomers consisting of 3–10 disaccharides repeating units, as determined by gel permeation chromatography (Renard, Crépeau, & Thibault, 1995). The molecular weight of RG-I varies for different plants: for suspension-cultured sycamore cells, linseed and flax stems, a molecular weight of 200, 600 and 700–900 kDa was estimated, respectively (Gur'janov, Gorshkova, Kabel, Schols, & van Dam, 2007; Muralikrishna et al., 1987; Lau et al., 1985). The molecular weight of the non-fragmented RG-I from potato was estimated as 64 kDa, while fragments obtained with RG lyase were 20 and 16 kDa only (Jiménez-Maldonado et al., 2019). Also, the RG-I domain from ginseng pectin obtained through pectinase digestion and chromatography separation resulted in a molecular weight of 50 kDa (Shi et al., 2017). For sugar beet pulp, autoclave treatment caused the presence of RG-I with high molecular weights of 1300 and 120 kDa (Oosterveld, Beldman, Schols, & Voragen, 2000). Selected properties of RG-I extracted from different plant sources are compared in Table 1.

GalA residues in the backbone of RG-I may be highly O-acetylated on O-2 and/or O-3, but they are not usually methyl esterified (Voragen et al., 2009). O-methylated GalA residues have only been reported for flax, where the degree of methylation (DM) was estimated at 17–40% in CDTA-extracted fractions which were recognized as RG-I (Rihouey et al., 1995) and also, water-extracted tobacco RG-I was found to have a DM of 22% (Sun, Wooten, Ryan, Bokelman, & Åman, 1987). For carrot, cotton, tobacco and tomato treated with anhydrous hydrogen fluoride (HF) at -23°C , no methylesterification of RG-I was detected and the degree of acetylation (DA) was calculated to be approximately 30% on the O-3 position of GalA (Komalavilas & Mort, 1989). Different studies have shown DA to range from 33% to 90% for modified pectic “hairy” regions obtained from potato fibre, pear, carrot, leek, and onion tissue through the liquefaction process (Schols & Voragen, 1994). 2-O-acetyl-GalA has

Table 1
Comparison of selected properties of RG-I extracted from different plant sources.

Plant source		RG-I content		Number of repeating GalA and Rha units	Branched rhamnose residues [%]	Mw [kDa]	References
		In pectic fraction [%]	In the cell wall [%]				
Okra pods	Hot buffer soluble solids	85	–	–	89	–	(Sengkhamporn, Verhoef, Schols, Sajjanantakul, & Voragen, 2009)
	Chelating agent soluble solids	26	–	–	66	–	
<i>Arabidopsis thaliana</i> Leaves	Dilute alkaline soluble solids	43	–	–	–	–	
	Pectic polysaccharides of the purified cell walls	11	–	–	–	–	(Zabackis, Huang, Müller, Darvill, & Albersheim, 1995)
Suspension-cultured sycamore cells		–	–	–	36–89	–	(Ishii, Thomas, Darvill, & Albersheim, 1989)
	Endopolygalacturonase-extracted pectic polysaccharides	23	7	300	–	200	(Michael McNeil, Darvill, & Albersheim, 1980)
Sugar beet pulp		–	–	200	–	–	(Lau, McNeil, Darvill, & Albersheim, 1985)
		–	5	3–10	–	–	(Renard et al., 1997)
Soybean cotyledons		–	–	15–100	–	550	(Nakamura, Furuta, Maeda, Nagamatsu, & Yoshimoto, 2001)
		–	36	–	–	50–500	(Øbro, Harholt, Scheller, & Orfila, 2004)
Potato (<i>Solanum tuberosum</i>) tubers		–	–	–	37–45	–	(Hachem, Benabdesslem, Ghomari, Hasnaoui, & Kaid Harche, 2016)
<i>Argania spinosa</i> leaves		–	–	–	–	–	(Oomen et al., 2003; Jean Paul Vincken et al., 2000)
Potato	Total potato tubers pectin fraction	50–75	–	–	–	–	(Jin Shu Yang, Mu, & Ma, 2018)
Potato pulp	Potato pectins extracted by different acids	61–66	–	–	–	–	
<i>Cerasus humilis</i> fruits	RG-I enriched pectic polysaccharide	74	–	–	–	–	(Zhang et al., 2021)
Pea (<i>Pisum sativum</i> L.)		–	–	120	60	67	(Noguchi et al., 2020)

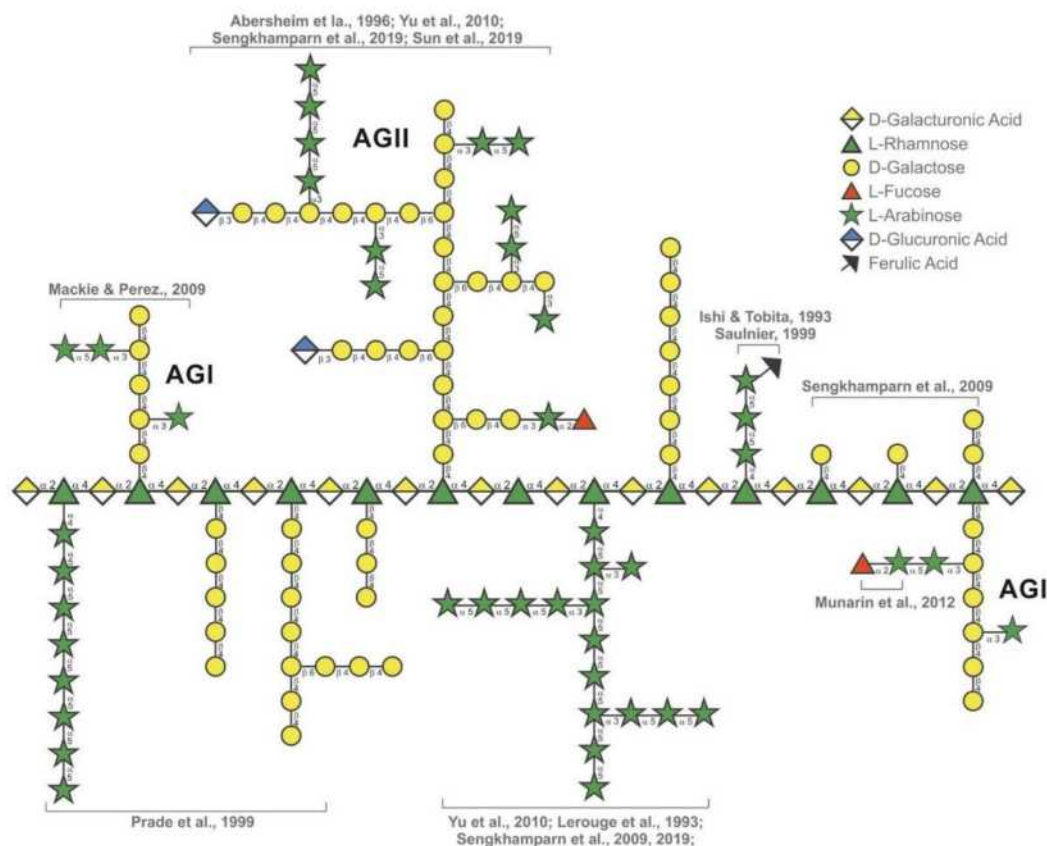


Fig. 1. Schematic representation of rhamnogalacturonan-I structure. The specific number, type and order of side chain substitutions shown in the figure were chosen to represent the types of side chains possible. It should be emphasized that the amount and location of side chain substitution is highly tissue-dependent and not known *in vivo*.

been reported for two RG-I oligomers obtained from potato tuber by digestion with Driselase (a mixture of glycosyl hydrolases). Some of the GalA residues had acetyl groups at both the O-2 and O-3 positions (Ishii, 1997), while for the Driselase-digested spinach cell wall, major O-acetylation was found on O-3 of RG-I-derived polysaccharides (Perrone et al., 2002). Despite the fact that GalA units are usually not substituted, Renard and Jarvis (1999) reported the presence of GlcA-substituted GalA in the backbone of sugar beet RG-I.

2.2. Side chains of RG-I

The side chains of RG-I are mainly linked to the O-4 rhamnose units and comprise neutral sugars like arabinans, galactans and/or arabinogalactans (Yapo et al., 2007). Depending on the plant source, 20–90% of rhamnose units are decorated with neutral sugars (O'Neill et al., 1990; Ridley et al., 2001; Sengkhamparn et al., 2009). The length of the side chains varies between plant sources from 1 to 50, or even more residues (Vincken et al., 2003). The “hairy” region content and degree of branching depends not only on the plant source, but also on the extraction method (Kaya, Sousa, Crépeau, Sørensen, & Ralet, 2014) and the ripening stage (Posé et al., 2012). For instance, the degree of branching for olive fruit pectin increased with higher solvent concentration and length of extraction times (Vierhuis, Schols, Beldman, & Voragen, 2000). Surprisingly, for olive fruit, the degree of branching was higher for the ripe fruits when compared with the unripe ones. The rhamnose content in AIS (alcohol-insoluble solids) was higher in ripe olives. The calculated Rha/UA molar ratio for immature green olives

and purple ones amounted to approximately 0.04 and 0.13, respectively (Vierhuis et al., 2000). However, more often during the ripening process, a reduction in branching occurs, which is caused by the degradation of neutral sugars (Brummell, 2006; Brummell & Harpster, 2001; Goulao & Oliveira, 2008; Paniagua et al., 2014).

Arabinose occurs mainly in the form of α -(1 $\rightarrow$ 5)-linked arabinofuranans (1,5- α -Araf) while galactose usually appears as single residue or β -(1 $\rightarrow$ 4)-linked galactopyranose (1,4- β -Galp) chains, including galactose or arabinose side branches (Prade, Ayoubi, Zhan, & Mort, 1999). Short galactan side chains composed of 1–2 galactosyl residues have been detected in a hot buffer extracted fraction from okra pods, where 65% of the total galactose was present as terminal Galp and 23% as 1,4-Galp (Sengkhamparn et al., 2009). RG-I obtained from different plants confirmed the presence of branched side chains composed of terminal α -Araf, 1,5- α -Araf, 1,3-, 1,2,5-, 1,3,5- and 1,2,3,5-linked α -Araf residues. Apart from highly branched arabinans, arabinogalactan type I segments, represented by 1,4- β -Galp chains with α -1-Araf units attached to the O-3 position of galactosyl units (Engelsen et al., 1996) are also components of the RG-I domain due to the presence of 1,4- β -Galp and 1,3,4- β -Galp residues (Sengkhamparn et al., 2009; Shakhmatov, Makarova, & Belyy, 2019; Shakhmatov, Toukach, & Makarova, 2020; Yu et al., 2010). For potato, arabinogalactan type I containing 1,3- β -Galp is an integral part of the backbone (Hinz, Verhoef, Schols, Vincken, & Voragen, 2005). Arabinan-rich pectins, which constituted 50% of the total pectic polysaccharides, have been obtained from pea (*Pisum sativum* L.) (Noguchi et al., 2020). Highly branched arabinans were present mainly in the form of α -1,5-arabinan. Approximately 60%

of the rhamnose units in the main chain were substituted by Ara side chains, which were directly linked to RG-I. Moreover, single galactose units and galactooligosaccharides were attached to 35% of the rhamnose residues. Similar results were obtained from secondary cell walls of flax phloem fibre pectins, treated with rhamnogalacturonan hydrolase (Mikshina et al., 2012). Single terminal galactose units substituted 47% of rhamnose residues. The average length of the oligomeric galactose chains amounted to 14 monomers. The release of β -1-4-galactans by arabinanase treatment indicated the hypothesis that galactans could be present in the form of side chains or extensions of arabinans (Øbro et al., 2004). Arabinogalactan type II, represented by the presence of 1,3- β -D-Galp, 1,6- β -D-Galp, 3,6-di-O-substituted β -D-Galp, 1,4- β -D-GlcA, terminal α -L-Araf and terminal α -L-Rhap residues, which was identified as the carbohydrate portion of arabinogalactan proteins, has been reported as a minor component of pectin-containing polysaccharides of pomegranate (Shakhmatov et al., 2019) as well being found in RG-I side chains extracted from ginseng (Lin Sun et al., 2019). On the basis of antibody-based approaches associated with epitope detection chromatography (EDC), the variability of RG-I side chains determined by different fruits and solubilization solvents has also been demonstrated (Cornuault, Pose, & Knox, 2018). For tomato and strawberry, arabinan was the most abundant RG-I side chain in phenol and water extracts, while for aubergine, the galactan side chain was detected in fractions extracted with water, as well as alkali and acid media. Furthermore, arabinan signals independent of the RG-I backbone were detected in tomato. It was also demonstrated that RG-I epitopes are not always associated with HG, which indicates that RG-I chains exist in cell walls in both HG-associated and non-HG-associated forms.

Ferulic acid groups in RG-I may be ester-linked to O-2 of the arabinose residues and to O-6 of the galactose residues (Ishii & Tobita, 1993; Saulnier & Thibault, 1999). Occasionally the side chains are terminated by fucosyl, glucuronosyl, or 4-O-methyl glucuronosyl residues (Munarin, Tanzi, & Petrini, 2012).

Tan et al. (2013) employed multiple and diverse methods to show that diversity of RG-I complexes with other PCW compounds expands beyond prevailing cell wall models that depict separate protein, pectin, and hemicellulose polysaccharide networks. The authors suggested RG-I covalent links with the rhamnosyl residues of the arabinogalactan protein (AGP) and with arabinoxylan attached to either a rhamnosyl residue in the RG I domain or directly to an arabinosyl residue in the AGP. Links were mediated by two isoforms of a purified *Arabidopsis thaliana* arabinogalactan protein named ARABINOXYLAN PECTIN ARABINOGLACTAN PROTEIN1 (APAP1). Cross-linker role of some AGPs highlighted the possibility of forming a continuous network between wall polysaccharides and wall structural proteins (as proposed by Keegstra, Talmadge, Bauer, & Albersheim, 1973), expanding our understanding of wall architecture.

3. Physical structure (conformation) of RG-I

RG-I has a helical secondary conformation similar to HG. Molecular modelling simulations of the pentasaccharide fragment of the RG-I backbone with galactan side chain, indicated the presence of five major conformation families (Broadhurst et al., 1996; Engelsen, Cros, Mackie, & Pérez, 1996). However, the most energetically favourable RG-I conformation is the three-fold (3_1) helix with an GalA-Rha extension of 0.778 nm (Engelsen et al., 1996). Kouwijzer et al. (1996) obtained conformations of RG-I backbone disaccharide as left-handed three-fold and two-fold helix with an advance per repeat of 0.675 nm and 0.748 nm, respectively. For RG-I from flax tertiary cell wall, a favourable energy minimum was found for the extended right-handed three-fold helix conformation with six residues per one helix turn, with the galactan side chain helping to stabilize the backbone. Other moieties found were: an extended two-fold helix, a left-handed four-fold helix and an extended right-handed nine-fold helix (Makshakova, Gorshkova, Mikshina, Zuev, & Perez, 2017). Molecular dynamic

simulations showed that the RG-I helix has an average diameter of 1.1 nm and a full helical turn length was estimated to be 2.7 nm (Zdunek et al., 2021). A comparison between the native, de-esterified and debranched RG-I domains from sugar beet indicated a similar behaviour for all fractions with an average persistence length value of about 1.4 nm (2 GalA + 2 Rha units) (Ralet et al., 2008). It has been suggested that the higher flexibility of RG-I when compared to the stiffer HG macromolecules, is caused by the rhamnose content. Moreover, a higher degree of flexibility leads to the lower intrinsic viscosity of molecules for equivalent molar masses. However, the incorporation of an increasing number of rhamnose units (5–25%) in the main chain had no relevant effect on the overall configurational properties with only slight local perturbations, it did not affect global conformation (Cros, Garnier, Axelos, Imberty, & Pérez, 1996) due to self-cancellation of the “kinking” effects of successive paired rhamnose residues (Pérez, Mazeau, & Hervé du Penhoat, 2000). However, the described kinks are the reason for the thickening of the RG-I backbone diameter, as well as the presence of neutral sugar side chains (Zdunek et al., 2021). The acetylation and methylation of GalA units have no significant influence on the RG-I backbone helical conformation, since no notable changes were observed between the energy maps illustrating GalA-Rha disaccharide with and without the methoxyl group (Cros et al., 1996). However, DM of RG-I can effectively modify the intermolecular ionic repulsion strength, as well as introducing changes in the attractive forces between the chains (Fishman, Pfeffer, Barford, & Doner, 1984). Similarly, molecular interactions between acetyl groups and Rha and GalA units influence the stabilizing energy (Kouwijzer et al., 1996).

4. RG-I functions in plants

4.1. Linking of RG-I in the cell wall

The mechanism of the structural organization and bonding of highly branched polysaccharides in cell walls is still not clear. In the generally accepted linear contiguous model of pectic polysaccharides, sections of HG are interspersed with RG-I, creating an ensemble of alternating “smooth” and “hairy” regions of pectin (Albersheim et al., 1996). However, AFM analyses by Round, Rigby, MacDougall, and Morris (2010) have shown that the removal of almost the whole initial amount of rhamnose residues by mild acid hydrolysis does not change the mean length of the polysaccharide backbone (Fig. 2A). An alternative hypothetical model suggested that homogalacturonan and xylogalacturonans are side chains of RG-I linked to neutral sugars (Vincken et al., 2003), however no direct evidence has been found to support this hypothesis so far (Coenen, Bakx, Verhoef, Schols, & Voragen, 2007). In both theories it is assumed that homogalacturonan and xylogalacturonan are covalently linked to RG-I, since they cannot be separated easily without the use of enzymatic or chromatographic methods (Albersheim et al., 1996; Coenen et al., 2007; Round et al., 2010). More recent studies led to yet another hypothesis of pectin spatial organization, according to which RG-I forms associates with the backbone located at the periphery (Mikshina et al., 2015) and interactions are mediated through anti-parallel pairs of galactan side chains. However, it has not been confirmed by glycan sequence data supporting that model. The existence of homogalacturonan regions separated by single rhamnose units was proposed by Powell, Morris, Gidley, and Rees (1982), based on molecular weight measurements of the partially hydrolysed pectin. Authors estimated the length of 1,4-linked-D-galacturonic acid blocks in such structures to be equal to ~25 residues. Molecular modelling showed the inclusion of a single rhamnose unit in the HG backbone to cause the “kinking” of the chain by about 118 degrees, as observed with atomic force microscope (Pieczywek et al., 2020). However, due to ambiguity of the results provided so far and lack of glycan sequencing data the existence of single rhamnosyl residues within pectin remains speculative.

In the canonical image of the plant cell wall, the coexisting pectic and the hemicellulose/cellulose networks are believed to be separated from

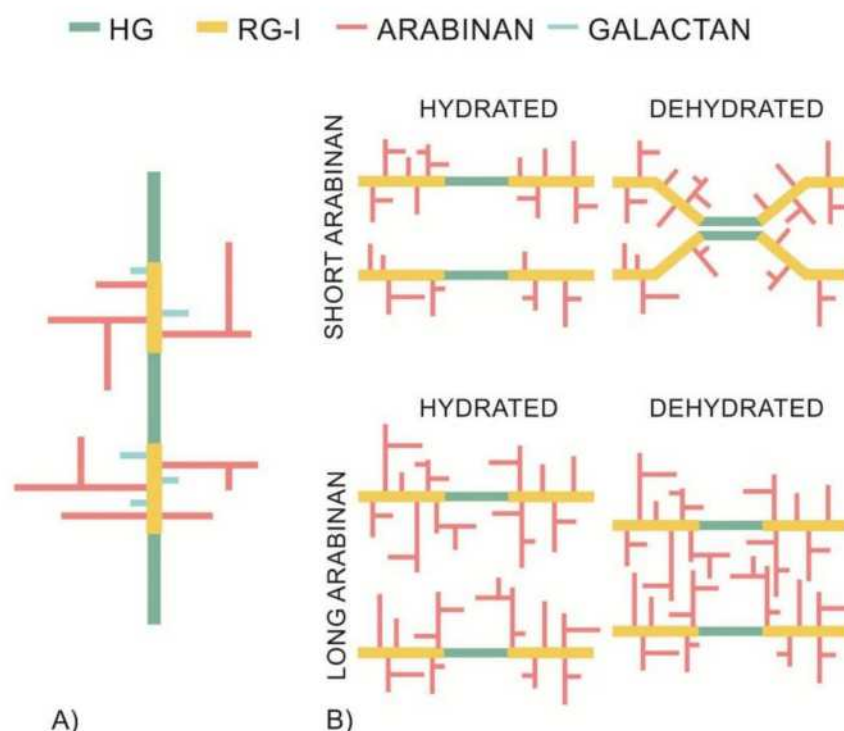


Fig. 2. Schematic representation of major models of HG and RG-I linkage and interactions: A) linear contiguous model of pectic polysaccharides (Round et al., 2010); B) hypothesized effect of the branching of arabinan side chains as a limiting factor in the homogalacturonan binding process, as a result of steric hindrance (Moore, Farrant, & Drionich, 2008; Zykwiniska, Ralet, Garnier, & Thibault, 2005).

each other. However, Zykwiniska, Rondeau-Mouro, Garnier, Thibault, and Ralet (2006) reported that pectins may interact with other polysaccharides in the cell wall such as cellulose or xyloglucan via covalent and/or non-covalent linkages with the formation of e.g. hydrogen bonds (Zykwiniska et al., 2006). Pectin binding with cellulose occurs mainly through xylans, but also, with a lower affinity, through arabinan and galactan side chains of RG-I (Höfte & Voxeur, 2017). It has been hypothesized that the branching of arabinan and galactan side chains could be a limiting factor in the binding process, as a result of steric impediments (Fig. 2B) (Zykwiniska et al., 2005).

4.2. Structural changes and function of RG-I in the cell wall

Due to their unique physicochemical properties, pectins play an important role in controlling cell wall porosity, pH and charge, internal signaling, cell-to-cell adhesion at the middle lamella and stiffness of the cell wall. (Renard & Jarvis, 1999). With regard to RG-I, there are numerous examples of evidence that side chain modifications, along with backbone solubilization and polymerization determine the structural integrity of plants, from the middle lamella and cell walls up to the level of the whole tissue. Arabinans and galactans present in RG-I side chains have been shown to be highly mobile with the ability to interact with each other, forming a temporarily entangled matrix. Arabinan chains with ferulate residues are also able to oxidatively crosslink through diferulate bridges, thereby binding associated separate RG-I polysaccharides. Due to the wide range of possible interactions RG-I neutral sidechains have a significant influence on both the integrity and polymer organization in plant cell walls (Moore et al., 2008). Major structural changes within pectins include RG-I neutral side chain loss and the rearrangement of their associations, which was shown to have an important influence over fruit firmness and textural properties (Peña & Carpita, 2004). Neutral sugar loss is one of the earliest modifications

of the cell wall during the ripening process (Ortiz, Graell, & Lara, 2011). Ripening-related cell wall modifications and their extent among various plant types are highly diverse, as shown in the summary Table 2 (Brummell & Harpster, 2001; Goulao & Oliveira, 2008). In general, neutral sugar depletion during ripening is associated with β -galactosidase (β -Gal) and α -L-arabinofuranosidase (AFase) enzyme activity, which remove galactose and arabinose units, respectively (Goulao, Santos, de Sousa, & Oliveira, 2007). The debranching of galactan side

Table 2
Ripening-related RG-I modifications among various species and their extent.

Cell wall modification	Plant type		References
	Low extent	High extent	
Galactose content loss	Plum, raspberry, cucumber, apricot, European pear, berries	Tomato, peach, apple, muskmelon, nashi pear	(Brummell, 2006; Gross & Sams, 1984; Redgwell et al., 1997)
Arabinose content loss	Apple, plum, tomato	Pear, apricot	(Brummell, 2006; Gross & Sams, 1984; Redgwell et al., 1997)
Depolymerization of ionically-bound pectin	Strawberry, banana, apple, blueberry, melon	Avocado, watermelon, tomato, peach, kiwifruit	(Huber, 1984; Karakurt & Huber, 2002; Paniagua et al., 2014)
Solubilization of pectin	Apple, watermelon, nashi pear	Kiwifruit, tomato, plum, melon, peach, strawberry, avocado, persimmon	(Brummell, Dal Cin, Crisosto, & Labavitch, 2004; Paniagua et al., 2014; Redgwell et al., 1997)

chains has been associated with the stage before fruit maturity, during the cell enlargement phase of 'Red Delicious' apples (Peña & Carpita, 2004). This result is also in agreement with the observed increase in β -Gal activity throughout the ripening and softening period of 'Jonagold' and 'Mondial Gala' apples (Goulao et al., 2007; Gwanpua et al., 2014). The increase in AFase activity and loss of arabinose was observed at the early over-ripened (or late ripening) stages of apples and pears (Goulao et al., 2007; Tateishi, Kanayama, & Yamaki, 1996). An increase in the activity of both enzymes was also observed during the three-month storage period of carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*). The increase in enzymatic activity was associated with structural changes in the pectin molecules (shortening and debranching detected with AFM), which included the fraction extracted with sodium carbonate (Cybulska, Zdunek, & Kozioł, 2015). The great majority of ripening-related changes in arabinans and galactans, are observed in firmly bound polymers, extracted by 0.05 M Na_2CO_3 , when no changes occur in the loosely bound fractions extracted by chelating agent – 0.05 M CDTA (Brummell, 2006; Seymour, Colquhoun, Dupont, Parsley, & Selvendran, 1990). The loss of neutral sugars from RG-I side chains is not equal for all types of plants (Gross & Sams, 1984; Redgwell et al., 1997) and also varies according to their development stage (Peña & Carpita, 2004). For tomato, bell pepper and hot pepper fruit, the loss of neutral sugars, mainly galactose, but also arabinose in the range of 39–56% has been reported, when, for various berries, the loss level of those sugars was low and amounted to a range of 6–30%. Decreases in xylose and glucose content in the amount of 30% have been observed for apricot. No significant loss of neutral sugars have been reported for plum and cucumber (Gross & Sams, 1984; Redgwell et al., 1997).

In muro fragmentation of the RG-I backbone from transgenic potato with the rhamnogalacturonan lyase (RGL) enzyme from *Aspergillus aculeatus* showed a large reduction in the Gal and Ara side-chains and altered location of those residues in the parenchyma cell wall. The resulting abnormal periderm development indicated the important role of RG-I for correct periderm evolution (Oomen et al., 2002). Moreover, RGL activity has been correlated with firmness reduction during the ripening process of tomato fruit (Ochoa-Jiménez et al., 2018). Silencing *FaRGLase1* – the putative RGL gene, in strawberry resulted in the lower dissolution of the middle lamella, suggesting that the RG-I backbone could play a role in linking HG in the middle lamella (Molina-Hidalgo et al., 2013). This effect has been confirmed for poplar wood, where RG treatment caused enhanced cell–cell separation (Yang et al., 2020). The role of RG-I neutral side chains in intercellular attachment was also demonstrated for embryonic and non-embryonic carrot calluses in studies of its response to changes in the arabinose to galactose ratio (Kikuchi, Edashige, Ishii, Fujii, & Satoh, 1996).

The presence of neutral side chains containing Gal and Ara residues was also correlated with the preservation of the mechanical functions of cells and tissues. The appearance of (1 → 4)- β -D-galactan in pea cotyledons has been linked to firm texture in fruits (McCartney, Ormerod, Gidley, & Knox, 2000) and a higher degree of brittleness has been reported for transgenic potato tubers with reductions in linear galactans and branched arabinans (Ulvskov et al., 2005). Moore et al. (2008) proposed a model in which arabinan side chains would be responsible for overcoming water deficit stress and assumed their significant role in the preservation of cell wall flexibility during plant growth (Fig. 2B). In experiments with epidermal strips from *C. communis* leaves treated with arabinanase, difficulties with stomatal pore opening and closing were reported (Jones, Milne, Ashford, & McQueen-Mason, 2003). It was concluded that arabinans play a role in maintaining the flexibility in guard cell walls as polysaccharide proximity regulators, preventing the formation of Ca^{2+} bridges between HG domains, which stiffens the cell wall and prevents guard cells from deforming in response to cell turgor. In the cell walls of *Nicotiana plumbaginifolia* arabinan-rich side chains contributed to the association of pectin molecules with cellulose-hemicellulose complex in the normal callus, while for the line of *nolac-H14* mutants with loosely attached constituent cells, no arabinose

was detected (Iwai, Ishii, & Satoh, 2001). An investigation of the pectic epitopes level in potato during the tuberization process indicated that galactans and arabinans are involved in the primary cell wall elongation and proliferation process (Bush, Marry, Huxham, Jarvis, & McCann, 2001).

In addition to debranching, solubilization and depolymerization, other important RG-I structure modifying processes also take place (Gwanpua et al., 2014). Solubilization takes place in most species, while depolymerization occurs in a smaller number of plants (Brummell, 2006; Goulao & Oliveira, 2008). Solubilization is usually caused by the enzyme polygalacturonase, which is responsible for the hydrolysis of glycosidic linkages in pectins. Studies show that the amount of polygalacturonase in fruit significantly increases during the early stages of ripening (Pressey & Avantis, 1982). Solubilization results in an increase in water-soluble or chelator-soluble polyuronide, thereby reducing the degree of pectin binding to the cell wall structure (Brummell, 2006; Redgwell, Melton, & Brasch, 1992). Solubilization was also related to the degree of cell wall swelling, which causes fruit softening (Redgwell et al., 1997). No correlation between neutral sugars loss and solubilization has been confirmed. Nevertheless, it is thought that the loss of arabinans and galactans may promote pectin solubilization due to the weakening of pectin bonds with the cell wall (Paniagua et al., 2014). For instance, the transgenic silencing of the β -galactosidase gene in tomato resulted in a reduction in galactose loss at the early ripening stages and hence increased fruit firmness. It is suspected that Gal loss contributes to an increase in wall porosity, thereby providing easy access to wall components for other hydrolases (Smith, Abbott, & Gross, 2002).

5. RG-I properties *in vitro*

Pectin rheological properties such as gelling, viscosity or solubility relate to native pectin structure and the properties of the solution (Zdunek et al., 2021). The degree of methylesterification (DM) together with the molecular weight and chain length, concentration of the solution, pH and the presence of counter ions determine the gelation mechanism of pectin (Ciesla, Koczańska, Pieczywek, Cybulska, & Zdunek, 2021; Gawkowska, Ciesla, Zdunek, & Cybulska, 2019; Gawkowska, Ciesla, Zdunek, & Cybulska, 2019; Gawkowska, Cybulska, & Zdunek, 2018; Zheng et al., 2020). According to studies on RG-I rich citrus pectic polysaccharides, pectins with higher amount of RG-I and HG with lower DM, adapted irregular and dispersed structure, when compared to regions with higher HG content and higher DM, where pectin network is more dense and compact (Chen et al., 2021).

It has been shown that RG-I takes an active role in the gelling mechanism, thereby shaping pectin rheological properties, especially in concentrated solutions. An increased number of RG-I side chains reinforced the formation of gelling networks, promoting entanglement and tighter conformations of polymeric dispersions (Hwang & Kokini, 1992; Sousa, Nielsen, Armagan, Larsen, & Sørensen, 2015; Zheng et al., 2020). The lack of consecutive residues of galacturonic acid in the RG-I backbone (HG interruptions) prevents the formation of Ca^{2+} mediated junction zones, which are typical for the gelation of homogalacturonan rich pectin (Mikshina et al., 2017). Studies have shown that the RG-I-rich pectin fraction with a high amount of arabinose side-chains can form gels in the presence of divalent cations and under acidic conditions, which corresponds to known mechanisms of gelation for low- and high-methoxyl pectin (Table 3). Hydroxyl groups in arabinose chains are attached with hydrogen bonds, which improves the formation of the gel network.

RG-I side-chain entanglements create tighter conformations, making the gel network stronger (Gawkowska et al., 2018; Thibault, Renard, Axelos, Roger, & Crépeau, 1993). The arabinose side-chains in RG-I increase the contact area and decrease the distance between adjacent pectin chains (Zheng et al., 2020). A decrease in the amount and/or length of galactan side chains prevents the formation of junction zones, thereby indicating that Gal side chains play an important role in RG-I

Table 3

Gelling conditions and properties of gels for high- and low-ester pectin. Based on (Cao, Lu, Mata, Nishinari, & Fang, 2020; Espitia, Du, Avena-Bustillos, Soares, & McHugh, 2014; Gawłowska et al., 2018).

	High-ester pectin (DE > 50%)	Low-ester pectin (DE < 50%)
Gelling conditions	pH < 3.5 sugar concentrations >55%	pH 2–6 presence of divalent cations such as Ca ²⁺ sugar not required
Intermolecular interactions	Hydrogen bonds, hydrophobic forces	Electrostatic interactions between the cations and the negatively charged cavities formed by polymer chains
Properties of gels	Elastic, not thermo-reversible and shear-reversible	Rigid, highly viscous, thermo-reversible

gelation (Mikshina et al., 2017). Compared to homogalacturonan, RG-I is characterized by a higher molecular mass and exhibits a greater degree of flexibility, assuming a random coil conformation in solution, as indicated by the intrinsic viscosity and persistence length measurements (Alba, Laws, & Kontogiorgos, 2015; Morris, Ralet, Bonnin, Thibault, & Harding, 2010). This was confirmed for lime and lemon extracted pectin, where a high HG/RG-I ratio corresponded to the higher degree of rigidity and intrinsic viscosity of the macromolecules, as compared to the more flexible grapefruit and orange extracts with a higher RG-I content (Kaya et al., 2014). The sodium carbonate pectin fraction, enriched with RG-I-type polysaccharides, shows the lowest viscosity values when compared to water and calcium chelator-soluble fractions (Mierczyńska et al., 2015). Studies with RG-I mucilage polysaccharides from lacebark leaves revealed a significant increase in apparent viscosity and a greater shift in fluid behaviour towards pseudoplasticity along with an increase in the concentration in solution (Sims, Smith, Morris, Ghorl, & Carnachan, 2018). Studies concerning pectin interfacial activity showed that due to protein and ferulic acid attached to side chains working as anchors, branched RG-I can improve the adsorption process at the oil-water interface as opposed to pectins with a linear backbone (Alba & Kontogiorgos, 2017). Viscosity and gel strength decrease was also observed along with the long storage time induced by the depolymerization of pectic polysaccharides. This effect was accompanied by a temperature dependency resulting in the lower viscosities of pectic solutions extracted from fruits stored at 40 °C as compared to 25 °C during the same storage time (Morris, Castile, Smith, Adams, & Harding, 2010). The effect was attributed to a decrease in coil expansion (swelling) and pectin chain extension with the increase in temperature. Hot sodium acetate extract from okra pods, consisting of highly branched RG-I has been studied in the context of its impact on the stability and rheology of oil-in-water emulsions. The addition of the extract caused extensive flocculation and significant shear-thinning rheology, which increased with concentration. In the range of low concentrations (0.125%), fast creaming was observed, however, at higher values (1.25–2.50%), this process was significantly reduced. It is caused by the ability of pectic large polymers (Mw >> 1.4 MDa) contained in this fraction, to increase in continuous phase viscosity (Georgiadis et al., 2011).

6. Summary and future perspectives

Given the current state of research there is no doubt that besides forming fundamental structures – namely the cellulose/hemicellulose network – pectin constitutes another important piece of the plant cell wall puzzle. Among this rich and versatile family of polysaccharides, RG-I has been recognized as a key component of plant biomechanics whose properties and role have been demonstrated *in vitro* and *in vivo* studies. Much information has already been gathered establishing the link between RG-I structural features and changes in fruit ripening and softening, textural changes and plant cell wall mechanics, as well as demonstrating its crosslinking and gelling abilities in solutions. On the

other hand, *in vivo* research is still a challenging task, therefore our degree of understanding is still lacking in fundamental concepts regarding the structure of RG-I and its relationship to other major pectin polysaccharides. *In vitro* studies in aqueous solutions have made it possible to carry out experimental procedures under controlled conditions, thereby limiting the bias associated with sample bio-variability. However, research conducted under certain conditions, which in some cases are physiologically irrelevant, may lead to misleading conclusions, thereby slowing down our pursuit of the full understanding of the structure-property relationship for RG-I.

Below we emphasize the most important structural features, functions and functionalities of RG-I which have been discovered to date.

- The backbone of RG-I is composed of GalA-Rha repeats. Rha units are usually functionalized with arabinan and/or galactan side chains and rarely, arabinogalactans and other groups. The lengths of RG-I domains, as well as the degree of branching varies among different plants.
- RG-I exhibits random coil conformation in solution and high intrinsic viscosity, forming networks under certain conditions. It has an influence on the rheological properties of RG-I in solution. Neutral sugars are also correlated with network formation during gelation.
- Significant structural changes in RG-I during the ripening and storage of the pectin source are observed. Galactan and arabinan side chains are associated with tissue firmness as well as with the physical and functional properties of cell walls.

Since RG-I accounts for up to 20–35% of the whole pectic polysaccharides in plant cell walls, this group largely affects the properties of the extracted pectin. Such unique structural features of RG-I like a thicker backbone, the bending of the backbone and functionalization with neutral sugars may be considered in order to better understand and tailor the functionality of pectin.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by the National Science Centre, Poland [grant number 2019/35/O/NZ9/01387].

References

- Alba, K., & Kontogiorgos, V. (2017). Pectin at the oil-water interface: Relationship of molecular composition and structure to functionality. *Food Hydrocolloids*, 68, 211–218.
- Alba, K., Laws, A. P., & Kontogiorgos, V. (2015). Isolation and characterization of acetylated LM pectins extracted from okra pods. *Food Hydrocolloids*, 43, 726–735.
- Albersheim, P., Darvill, A. G., O'Neill, M. A., Schols, H. A., & Vorreuter, A. G. J. (1996). An hypothesis: The same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. *Progress in Biotechnology*, 14, 47–55.
- Broadhurst, M., Crox, S., Hoffmann, R., Mackie, W., & Pérez, S. (1996). Modelling a pentasaccharide fragment of rhamnogalacturonan I. *Progress in Biotechnology*, 14, 517–525.
- Brunnell, D. A. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*, 33(2), 103–119.
- Brunnell, D. A., Dal Cin, V., Crisosto, C. H., & Labavitch, J. M. (2004). Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany*, 55(405), 2029–2039.
- Brunnell, D. A., & Harpster, M. H. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 47(1–2), 311–340.
- Bush, M. S., Marry, M., Hushum, M. L., Jarvis, M. C., & McCann, M. C. (2001). Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation. *Planta*, 213(6), 869–880.
- Cao, L., Lu, W., Mata, A., Nishinari, K., & Fang, Y. (2020). Egg box model based gelation of alginate and pectin: A review. *Carbohydrate Polymers*, 242, Article 116389.

- Chen, S., Zheng, J., Zhang, L., Cheng, H., Orfila, C., Ye, X., & Chen, J. (2021). Synergistic gelling mechanisms of RG-1 rich citrus pectic polysaccharide at different esterification degree in calcium induced gelation. *Food Chemistry*, 350, Article 129177.
- Ciesla, J., Koczaniska, M., Pieczywek, P., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2021). The concentration-modified physicochemical surface properties of sodium carbonate-soluble pectin from pears (*Pyrus communis* L.). *Food Hydrocolloids*, 113, Article 106524.
- Coenen, G. J., Bakx, E. J., Verhoef, R. P., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2007). Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydrate Polymers*, 70(2), 224–235.
- Gornauil, V., Pose, S., & Knox, J. P. (2018a). Extraction, texture analysis and polysaccharide epitope mapping data of sequential extracts of strawberry, apple, tomato and aubergine fruit parenchymas. *Data in Brief*, 17, 314–320.
- Gornauil, V., Pose, S., & Knox, J. P. (2018b). Disentangling pectic homogalacturonan and rhamnogalacturonan-I polysaccharides: Evidence for sub-populations in fruit parenchyma systems. *Food Chemistry*, 246, 275–285.
- Cros, S., Garnier, C., Axelos, M. A. V., Imbert, A., & Pérez, S. (1996). Solution conformations of pectin polysaccharides: Determination of chain characteristics by small angle neutron scattering, viscometry, and molecular modeling. *Biopolymers*, 39(3), 339–351.
- Cybulska, J., Zdunek, A., & Koziol, A. (2015). The self-assembled network and physiological degradation of pectins in carrot cell walls. *Food Hydrocolloids*, 43, 41–50.
- Engelsen, S. B., Cros, S., Mackie, W., & Pérez, S. (1996). A molecular builder for carbohydrate: Application to polysaccharides and complex carbohydrates. *Biopolymers*, 39(3), 417–433.
- Epitita, P. J. P., Du, W. X., Avena-Bustillos, R. J., Soares, N. D. F. F., & McHugh, T. H. (2014). Edible films from pectin: physical-mechanical and antimicrobial properties - a review. *Food Hydrocolloids*, 35, 287–296.
- Fishman, M. L., Pfeffer, P. E., Burford, B. A., & Dooner, L. W. (1984). Studies of pectin solution properties by high-performance size exclusion chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(2), 372–378.
- Gawłowska, D., Ciesla, J., Zdunek, A., & Cybulska, J. (2019a). The effect of concentration on the cross linking and gelling of sodium carbonate soluble apple pectins. *Molecules*, 24(8), Article 1635.
- Gawłowska, D., Ciesla, J., Zdunek, A., & Cybulska, J. (2019b). Cross linking of diluted alkali-soluble pectin from apple (*Malus domestica* fruit) in different acid-base conditions. *Food Hydrocolloids*, 92, 285–292.
- Gawłowska, D., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2018). Structure-related gelling of pectins and linking with other natural compounds: A review. *Polymers*, 10(7), 762.
- Georgiadis, N., Ritzoulis, C., Siorra, G., Korteziou, P., Vasiladiou, C., & Tsiptsias, C. (2011). Contribution of okra extracts to the stability and rheology of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 991–999.
- Goulão, L. F., & Oliveira, C. M. (2008). Cell wall modifications during fruit ripening: When a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science and Technology*, 19(1), 4–25.
- Goulão, L. F., Santos, J., de Sousa, L., & Oliveira, C. M. (2007). Patterns of enzymatic activity of cell wall modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Postharvest Biology and Technology*, 43(3), 307–318.
- Gross, K. C., & Sans, C. E. (1984). Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: A species survey. *Phytochemistry*, 23(11), 2457–2461.
- Gurjanov, O. P., Gorskova, T. A., Kabel, M., Schols, H. A., & van Dam, J. E. G. (2007). MALDI-TOF MS evidence for the linking of flax bast fibre galactan to rhamnogalacturonan backbone. *Carbohydrate Polymers*, 67(1), 86–96.
- Gwanjusa, S. G., Van Buggenhout, S., Verlinden, B. E., Christiaens, S., Spigelman, A., Vicent, V., Kermann, Z. J., Nicolai, B. M., Hendrickx, M., & Geeraerd, A. (2014). Pectin modifications and the role of pectin degrading enzymes during postharvest softening of jonagold apples. *Food Chemistry*, 158, 283–291.
- Hachem, K., Benabdellou, Y., Ghomri, S., Hachem, O., & Kaid Hachem, M. (2016). Partial structural characterization of pectin cell wall from *Argania spinosa* leaves. *Heliyon*, 2(2), Article e00076, 1–16.
- Hinz, S. W. A., Verhoef, R., Schols, H. A., Vincken, J. P., & Voragen, A. G. J. (2005). Type I arabinogalactan contains β -D-Galp (1 $\rightarrow$ 3) β -D-Galp structural elements. *Carbohydrate Research*, 340(13), 2135–2143.
- Höfe, H., & Voxeur, A. (2017). Plant cell walls. *Current Biology*, 27(17), R865–R870.
- Houben, K., Jolie, R. P., Frayre, L., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2011). Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: Structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. *Carbohydrate Research*, 346(9), 1105–1111.
- Huber, D. J. (1984). Strawberry fruit softening: The potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *Journal of Food Science*, 49(5), 1310–1315.
- Hwang, J., & Kokini, J. L. (1992). Contribution of the side branches to rheological properties of pectins. *Carbohydrate Polymers*, 19(1), 41–50.
- Ishii, T. (1997). O-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls. *Plant Physiology*, 113(4), 1265–1272.
- Ishii, T., Thomas, J., Darvill, A., & Albersheim, P. (1989). Structure of plant cell walls. *Plant Physiology*, 89(2), 421–428.
- Ishii, T., & Tobita, T. (1993). Structural characterization of feruloyl oligosaccharides from spinach leaf cell walls. *Carbohydrate Research*, 248(C), 179–190.
- Iwai, H., Ishii, T., & Satoh, S. (2001). Absence of arabinan in the side chains of the pectic polysaccharides strongly associated with cell walls of *Nicotiana glauca* folia non organogenic callus with loosely attached constituent cells. *Planta*, 213(6), 907–915.
- Jirunez Maldonado, M. L., Tiznado Hernández, M. E., Rascón Gm, A., Carvajal Millán, E., Lizardi-Mendoza, J., & Troncoso-Rojas, R. (2018). Analysis of rhamnogalacturonan I fragments as elicitors of the defense mechanism in tomato fruit. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 78(3), 339–349.
- Jones, L., Milne, J. L., Ashford, D., & McQueen-Mason, S. J. (2003). Cell wall arabinan is essential for guard cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11783–11788.
- Kandakurt, Y., & Huber, D. J. (2002). Cell wall degrading enzymes and pectin solubility and depolymerization in immature and ripe watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit in response to exogenous ethylene. *Physiologia Plantarum*, 116(3), 398–405.
- Kaya, M., Sousa, A. G., Crépau, M. J., Sørensen, S. O., & Ralet, M. C. (2014). Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: Influence of acid type and pH of extraction. *Annals of Botany*, 114(6), 1319–1326.
- Keechra, K., Talmadge, K. W., Bauer, W. D., & Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiology*, 51(1), 188–197.
- Kikuchi, A., Edashige, Y., Ishii, T., Fujii, T., & Satoh, S. (1996). Variations in the structure of neutral sugar chains in the pectic polysaccharides of morphologically different carrot calli and correlations with the size of cell clusters. *Planta*, 198(4), 634–639.
- Konalašvilas, P., & Mort, A. J. (1989). The acetylation of O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. *Carbohydrate Research*, 189, 261–272.
- Konwizer, M., Schols, H., & Pérez, S. (1996). Acetylation of rhamnogalacturonan I and homogalacturonan: Theoretical calculations. *Progress in Biotechnology*, 14, 57–65.
- Lau, J. M., McNeil, M., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1985). Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Research*, 137, 111–125.
- Makshakova, O. N., Gorskova, T. A., Mikshina, P. V., Zuev, Y. F., & Pérez, S. (2017). Metrics of rhamnogalacturonan I with β (1 $\rightarrow$ 4) linked galactan side chains and structural basis for its self aggregation. *Carbohydrate Polymers*, 158, 93–101.
- Mao, Y., Lei, R., Ryan, J., Arratia Rodriguez, F., Rastall, B., Chatzifragkou, A., ..., Binner, E. (2019). Understanding the influence of processing conditions on the extraction of rhamnogalacturonan-I "fatty" pectin from sugar beet pulp. *Food Chemistry*, X, 2, Article 100026.
- McCartney, L., Ormerod, A. P., Gidley, M. J., & Knox, J. P. (2000). Temporal and spatial regulation of pectic (1 $\rightarrow$ 4) β -D galactan in cell walls of developing pea cotyledons: Implications for mechanical properties. *Plant Journal*, 22(2), 105–113.
- McNeil, M., Darvill, A., & Albersheim, P. (1980). Structure of plant cell walls: X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiology*, 66(6), 1128–11234.
- Mierczyńska, J., Cybulska, J., Pieczywek, P. M., & Zdunek, A. (2015). Effect of storage on rheology of water soluble, chelate soluble and diluted alkali soluble pectin in carrot cell walls. *Food and Bioprocess Technology*, 8(1), 171–180.
- Mikshina, P. V., Gurjanov, O. P., Mikshikova, F. K., Petrova, A. A., Shashkov, A. S., & Gorskova, T. A. (2012). Structural details of pectic galactan from the secondary cell walls of flax (*Linum usitatissimum* L.) phloem fibres. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 853–861.
- Mikshina, P. V., Idiyatullin, B. Z., Petrova, A. A., Shashkov, A. S., Zuev, Y. F., & Gorskova, T. A. (2015). Physicochemical properties of complex rhamnogalacturonan I from gelatinous cell walls of flax fibers. *Carbohydrate Polymers*, 117, 853–861.
- Mikshina, P. V., Makshakova, O. N., Petrova, A. A., Gaifullina, I. Z., Idiyatullin, B. Z., Gorskova, T. A., & Zuev, Y. F. (2017). Gelation of rhamnogalacturonan I is based on galactan side chain interaction and does not involve chemical modifications. *Carbohydrate Polymers*, 171, 143–151.
- Molnau, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 266–277.
- Molina Hidalgo, F. J., Franco, A. R., Villatoro, C., Medina-Puche, L., Mercado, J. A., Hidalgo, M. A., Monfort, A., Caballero, J. L., Muñoz-Blanco, J., & Blanco-Portales, R. (2013). The strawberry (*Fragaria ananassa*) fruit specific rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLase1) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. *Journal of Experimental Botany*, 64(6), 1471–1483.
- Moore, J. P., Farrant, J. M., & Driscoll, A. (2008). A role for pectin associated arabinans in maintaining the flexibility of the plant cell wall during water deficit stress. *Plant Signaling and Behavior*, 3(2), 102–104.
- Morris, G. A., Castle, J., Smith, A., Adams, G. G., & Harding, S. E. (2010). The effect of different storage temperatures on the physical properties of pectin solutions and gels. *Polymer Degradation and Stability*, 95(12), 2670–2673.
- Morris, G. A., Ralet, M. C., Bonnin, E., Thibault, J. F., & Harding, S. E. (2010). Physical characterisation of the rhamnogalacturonan and homogalacturonan fractions of sugar beet (*Beta vulgaris*) pectin. *Carbohydrate Polymers*, 82(4), 1161–1167.
- Munari, F., Tuzzi, M. C., & Petrucci, P. (2012). Advances in bioanalytical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(4), 681–689.
- Muralikrishna, G., Salimath, P. V., & Tharanathan, R. N. (1987). Structural features of an arabinoxylan and a rhamno galacturonan derived from limeed mucilage. *Carbohydrate Research*, 161(2), 265–271.
- Nakamura, A., Furuta, H., Maeda, H., Nagamatsu, Y., & Yoshimoto, A. (2001). Analysis of structural components and molecular construction of soybean soluble polysaccharides by stepwise enzymatic degradation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(10), 2249–2258.
- Noguchi, M., Hasegawa, Y., Suzuki, S., Nakazawa, M., Ueda, M., & Sakamoto, T. (2020). Determination of chemical structure of pea pectin by using pectinolytic enzymes. *Carbohydrate Polymers*, 231, Article 115738.
- O'Neill, M., Albersheim, P., & Darvill, A. (1990). The pectic polysaccharides of primary cell walls. In P. M. Dey (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Volume 2: Carbohydrates* (pp. 415–441). Academic Press Limited.
- Öbro, J., Harholt, J., Scheller, H. V., & Orfila, C. (2004). Rhamnogalacturonan I in Solanum tuberosum tubers contains complex arabinogalactan structures. *Phytochemistry*, 65(10), 1429–1438.

- Ochoa Jiménez, V. A., Bermann Varela, G., Burgara Estrella, A., Ordoñez Avitia, J. A., Ojeda-Contreras, A. J., Trillo-Hernández, E. A., ... Tiznado-Hernández, M. E. (2018). Functional analysis of tomato rhamnogalacturonan lyase gene Solyc11g011300 during fruit development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, 231, 31–40.
- Oomen, R. J. F. J., Doeswijk-Voragen, C. H. L., Bush, M. S., Vincken, J. P., Borkhardt, B., Van Den Broek, L. A. M., Corsar, J., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J., McCann, M. C., & Visser, R. G. F. (2002). In vitro fragmentation of the rhamnogalacturonan I backbone in potato (*Solanum tuberosum* L.) results in a reduction and altered location of the galactan and arabinan side-chains and abnormal periderm development. *Plant Journal*, 30(4), 403–413.
- Oomen, R. J. F. J., Vincken, J. P., Bush, M. S., Skjot, M., Voragen, C. H. L., & Ulvskov, P. (2003). Towards unravelling the biological significance of individual components of pectic hairy regions in plants. In F. Voragen, H. Schols, & B. Visser (Eds.), *Advances in pectin and pectinase research: 2nd international symposium on pectin and pectinases* (pp. 15–34).
- Oosterveld, A., Beldman, G., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2000). Characterization of arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides and hemicelluloses from sugar beet pulp. *Carbohydrate Research*, 328(2), 185–197.
- Ortiz, A., Graells, J., & Lara, I. (2011). Cell wall modifying enzymes and firmness loss in ripening “Golden reiners” apples: A comparison between calcium dips and ULO storage. *Food Chemistry*, 128(4), 1072–1079.
- Paniagua, C., Posé, S., Morris, V. J., Kirby, A. R., Quesada, M. A., & Mercado, J. A. (2014). Fruit softening and pectin disassembly: An overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Annals of Botany*, 114(6), 1375–1383.
- Peist, M. J., & Carpita, N. C. (2004). Loss of highly branched arabinans and debranching of rhamnogalacturonan I accompany loss of firm texture and cell separation during prolonged storage of apple. *Plant Physiology*, 135(3), 1305–1313.
- Pérez, S., Mazou, K., & Hervé du Penhoat, C. (2000). The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1–2), 37–55.
- Perrone, P., Hewage, C. M., Thomson, A. R., Bailey, K., Sadler, I. H., & Fry, S. C. (2002). Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: New complexity. *Phytochemistry*, 60(1), 67–77.
- Pieczyszek, P. M., Kozioł, A., Plazinski, W., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2020). Resolving the nanostructure of sodium carbonate extracted pectins (DASP) from apple cell walls with atomic force microscopy and molecular dynamics. *Food Hydrocolloids*, 104, Article 105726.
- Posé, S., Kirby, A. R., Mercado, J. A., Morris, V. J., & Quesada, M. A. (2012). Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. *Carbohydrate Polymers*, 88(3), 882–890.
- Powell, D. A., Morris, E. R., Gidley, M. J., & Rees, D. A. (1982). Conformations and interactions of pectins. II. Influences of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. *Journal of Molecular Biology*, 155(4), 517–531.
- Prade, R. A., Ayoubi, P., Zhao, D., & Mort, A. J. (1999). Pectins, pectinases and plant-microbe interactions. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 16(1), 361–392.
- Pressey, R., & Avants, J. K. (1982). Solubilization of cell walls by tomato polygalacturonases: Effects of pectinesterases. *Journal of Food Biochemistry*, 6(1), 57–74.
- Ralet, M. C., Crépéau, M. J., Lefebvre, J., Monille, G., Hofte, H., & Thibault, J. F. (2008). Reduced number of homogalacturonan domains in pectins of an arabidopsis mutant enhances the flexibility of the polymer. *Biomacromolecules*, 9(5), 1454–1460.
- Redgwell, R. J., Fischer, M., Kendall, E., & MacRae, E. A. (1997). Galactose loss and fruit ripening: High molecular weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta*, 203(2), 174–181.
- Redgwell, R. J., Melton, L. D., & Brasch, D. J. (1992). Cell wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidia deliciosa*): Solubilization of the pectic polymers. *Plant Physiology*, 98(1), 71–81.
- Renard, C. M. G. C., Crépéau, M. J., & Thibault, J. F. (1995). Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus pectins. *Carbohydrate Research*, 275(1), 155–165.
- Renard, C. M. G. C., & Jarvis, M. C. (1999). A cross-polarization, magic angle spinning, 13C nuclear magnetic resonance study of polysaccharides in sugar beet cell walls. *Plant Physiology*, 119(4), 1315–1322.
- Renard, C. M. G. C., Labaye, M., Mitter, M., Voragen, F. G. J., & Thibault, J. F. (1997). Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. *Carbohydrate Research*, 305(2), 271–280.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Molven, D. (2001). Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929–967.
- Rihouey, C., Morvan, C., Borissova, L., Jaumeau, A., Denauty, M., & Jarvis, M. (1995). Structural features of CDTA soluble pectins from flax hypocotyls. *Carbohydrate Polymers*, 28(2), 159–166.
- Round, A. N., Rigby, N. M., MacDougall, A. J., & Morris, V. J. (2010). A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydrate Research*, 345(4), 487–497.
- Saulnier, L., & Thibault, J. F. (1999). Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar beet pectins and maize bran heteroxylans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 396–402.
- Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (1994). Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Research*, 256(1), 83–95.
- Sengkharnpan, N., Verhoef, R., Schols, H. A., Sajjanantakul, T., & Voragen, A. G. J. (2009). Characterisation of cell wall polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Carbohydrate Research*, 344(14), 1824–1832.
- Seymour, G. B., Golubovici, I. J., Dupont, M. S., Parsley, K. R., & Selvendran, R. (1990). Composition and structural features of cell wall polysaccharides from tomato fruits. *Phytochemistry*, 29(3), 725–731.
- Slukhantov, E. G., Makarova, E. N., & Belyy, V. A. (2019). Structural studies of biologically active pectin-containing polysaccharides of pomegranate *Punica granatum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 29–36.
- Slukhantov, E. G., Tonkach, P. V., & Makarova, E. N. (2020). Structural studies of the pectic polysaccharide from fruits of *Punica granatum*. *Carbohydrate Polymers*, 235, Article 115978.
- Slit, H., Yu, L., Shi, Y., Li, J., Teng, H., Zhou, Y., & Sun, L. (2017). Structural characterization of a rhamnogalacturonan I domain from ginseng and its inhibitory effect on galectin-3. *Molecules*, 22(6), 11–14.
- Sinas, I. M., Ståhl, A. M., Morris, G. A., Ghori, M. U., & Cartuchian, S. M. (2018). Structural and rheological studies of a polysaccharide nodule from larch bark leaves (*Hoheria populnea* A. Cunn.). *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 839–847.
- Smith, D. L., Abbott, J. A., & Gross, K. C. (2002). Down-regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiology*, 129(4), 1755–1762.
- Soma, A. G., Nielsen, H. L., Armagan, L., Larsen, J., & Sørensen, S. O. (2015). The impact of rhamnogalacturonan-I side chain monosaccharides on the rheological properties of citrus pectin. *Food Hydrocolloids*, 47, 130–139.
- Sun, H. H., Wooten, J. B., Ryan, W. S., Bokschun, G. H., & Aunai, P. (1987). Structural characterization of a tobacco rhamnogalacturonan. *Carbohydrate Polymers*, 7(2), 143–158.
- Sun, L., Ropartz, D., Cui, L., Shi, H., Ralet, M. C., & Zhou, Y. (2019). Structural characterization of rhamnogalacturonan domains from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Carbohydrate Polymers*, 200, 119–127.
- Tan, L., Eberhard, S., Pattathil, S., Warder, C., Glushko, J., Yuan, C., Hao, Z., Zhu, X., Ayçi, U., Miller, J. S., Baldwin, D., Phana, C., Orlando, R., Darvill, A., Hahn, M. G., Kieliszewski, M. J., & Molven, D. (2013). An arabidopsis cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein. *Plant Cell*, 25(1), 270–287.
- Tateishi, A., Katsuyama, Y., & Yamaki, S. (1996). α -L-arabinofuranosidase from cell walls of Japanese pear fruits. *Phytochemistry*, 42(2), 295–299.
- Thibault, J. F., Renard, C. M. G. C., Axelos, M. A. V., Roger, P., & Crépéau, M. J. (1993). Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 238(C), 271–286.
- Ulvskov, P., Wiium, H., Bruce, D., Jørgensen, B., Qvist, K. B., Skjot, M., Hepworth, D., Borkhardt, B., & Sørensen, S. O. (2005). Biophysical consequences of remodeling the neutral side chains of rhamnogalacturonan I in tubers of transgenic potatoes. *Planta*, 220(4), 609–620.
- Vierhuis, E., Schols, H. A., Beldman, G., & Voragen, A. G. J. (2000). Isolation and characterization of cell wall material from olive fruit (*Olea europaea* cv. Koroneiki) at different ripening stages. *Carbohydrate Polymers*, 43(1), 11–21.
- Vincken, J. P., Borkhardt, B., Bush, M., Doeswijk-Voragen, C., Dopico, B., Labrador, E., Lange, L., McCann, M., Morvan, C., Munoz, F., Oomen, R., Peugnet, I., Rudolph, B., Schols, H., Sørensen, S., Ulvskov, P., Voragen, A., & Visser, R. (2000). Remodelling pectin structure in potato. In G. E. de Vries, & K. Meislaaff (Eds.), 2000. *Phytosfere '99 - Highlights in European Plant Biotechnology: Phytosfere '99 - Highlights in European Plant Biotechnology, Rome, 1999* (pp. 245–256). Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Vincken, J. P., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., Beldman, G., Visser, R. G. F., & Voragen, A. G. J. (2003). Pectin — The hairy thing. In *Advances in pectin and pectinase research* (pp. 47–59). Springer Netherlands.
- Voragen, A. G. J., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), 263–275.
- Yadav, S., Yadav, P. K., Yadav, D., & Yadav, K. D. S. (2009). Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry*, 44(1), 1–10.
- Yang, H., Benatti, M. R., Karve, R. A., Fox, A., Meilan, R., Carpita, N. C., & McCann, M. C. (2020). Rhamnogalacturonan-I is a determinant of cell-cell adhesion in poplar wood. *Plant Biotechnology Journal*, 18(4), 1027–1040.
- Yang, J. S., Mu, T. H., & Ma, M. M. (2018). Extraction, structure, and emulsifying properties of pectin from potato pulp. *Food Chemistry*, 244, 197–205.
- Yapo, B. M., Lerouge, P., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2007). Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogeneous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers*, 69(3), 426–435.
- Yu, L., Zhang, X., Li, S., Liu, X., Sun, L., Liu, H., Itoku, J., Zhou, Y., & Tai, G. (2010). Rhamnogalacturonan I domains from ginseng pectin. *Carbohydrate Polymers*, 79(4), 811–817.
- Zabackin, E., Huang, J., Müller, B., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1995). Characterization of the cell wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiology*, 107(4), 1129–1138.
- Zavala Piraño, M. G., Villa Rivera, M. G., Lara Márquez, A., López Romero, E., & Guio Camacho, H. (2020). Applications of fungal pectinases. In *Reference Module in Life Sciences*.
- Zdunek, A., Pieczysek, P. M., & Cybulska, J. (2021). The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20, 1101–1117.
- Zhang, S., He, Z., Cheng, Y., Xu, F., Cheng, X., & Wu, P. (2021). Physicochemical characterization and emulsifying properties evaluation of RG-I enriched pectic polysaccharides from *Cerasus humilis*. *Carbohydrate Polymers*, 260, Article 117824.

Zheng, J., Chen, J., Zhang, H., Wu, D., Ye, X., Linhardt, R. J., & Chen, S. (2020). Gelling mechanism of RG-I enriched citrus pectin: Role of arabinose side-chains in cation- and acid-induced gelation. *Food Hydrocolloids*, 101, Article 105536.

Zykwinska, A., Rondeau-Mouro, C., Garnier, C., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2006). Alkaline extractability of pectic arabinan and galactan and their mobility in sugar beet and potato cell walls. *Carbohydrate Polymers*, 65(4), 510–520.

Zykwinska, A. W., Ralet, M. C. J., Garnier, C. D., & Thibault, J. F. J. (2005). Evidence for in vitro binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiology*, 139(1), 397–407.

8. Tekst publikacji P.2

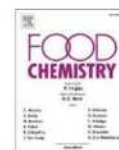
Food Chemistry 403 (2023) 134378



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Review

A mini-review on the plant sources and methods for extraction of rhamnogalacturonan I

Adrianna Kaczmarek, Piotr M. Pieczywek, Justyna Cybulska, Artur Zdunek*

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland



ARTICLE INFO

Keywords:
Rhamnogalacturonan I
Pectin
Extraction

ABSTRACT

Rhamnogalacturonan type I (RG-I) is one of the pectin family member abundant in plant cell walls. Process of RG-I extraction from cell walls, either as a one-step or several-stage process, conditions the structure and properties of obtained polysaccharides. In this paper, we provide comprehensive overview of the factors related to the source and extraction techniques that determine the yield and chemical composition of pectin belonging to RG-I. The role of the source material, solvent, pH, temperature, time and additional factors related to applied techniques, such as microwaves, ultrasounds, high and low pressure or enzymatic treatments are discussed.

1. Introduction

Multiple studies indicate important role for pectin in plant growth, development, signaling, wall structure, defense mechanisms, macroscopic mechanical properties and texture of organs (Bellincampi et al., 1996; Branca, Lorenzo, & Cervone, 1988; Iwai, Ishii, & Satoh, 2001; Jones, Seymour, & Knox, 1997; McCartney, Ormerod, Gidley, & Knox, 2000; Nothnagel, McNeil, Albersheim, & Dell, 1983; O'Neill, Ishii, Albersheim, & Darvill, 2004; Palin & Geitmann, 2012; Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001; Willats et al., 2001; Wolf, Mouille, & Pelloux, 2009). Rhamnogalacturonan type I (RG-I) is one of the pectin family member abundant in plant cell walls. RG-I is composed of alternating residues of galacturonic acid (GalA) and rhamnose (Rha) linked with $[\rightarrow 4-\alpha-D-GalPA-(1 \rightarrow 2)-\alpha-L-Rha-(1 \rightarrow)]$ bond. Due to branched molecular structure RG-I is called "hairy" regions of pectic polysaccharides rich in side chains populated mostly by arabinans, galactans and arabinogalactans, linked with rhamnose residues (Fig. 1). There are numerous evidences that the side chain modifications, along with backbone solubilization and polymerization, determine structural integrity of plants, from middle lamella and cell walls up to a level of the whole tissue (Goulao, Santos, de Sousa, & Oliveira, 2007; Peña & Carpita, 2004; Tateishi, Kanayama, & Yamaki, 1996). Its important function in plant cell wall and gelling properties in solution has been recently extensively reviewed (Kaczmarek, Pieczywek, Cybulska, & Zdunek, 2022).

However, complicated structure and variability due to plant, physiological state of the source plant material and/or the extraction method used cause RG-I properties still hard to unravel. Therefore this mini-review focuses on several pectin extraction methods of RG-I with respect to the source, obtained yields and chemical composition of extracts.

2. Properties of RG-I related to the source

The amount of RG-I is indicated in relation to galacturonic acid as Rha/GalA molar ratio. Since both sugars exist in cell wall in form of linear polysaccharides, this relation is usually considered as representation of the theoretical ratio of the RG-I to HG content (Khodaei & Karboune, 2013; Yujie Mao et al., 2019). Molar ratios of Rha/GalA falling into a range from 0.05 to 1 indicate presence of significant amounts of individual sections of RG-I backbone (Hou, Chen, & Ye, 2021; Schols & Voragen, 1996; Yang, Mu, & Ma, 2018). Alternatively, rough estimation of RG-I content defined as $2Rha + Gal + Ara$ has been used (Popov et al., 2021; Tan et al., 2020).

Detailed information on RG-I sources, extraction efficiency and the content of individual sugars are summarized in Table 1 while the general approach to the extraction process is shown in Fig. 2. The amounts of individual saccharides were recalculated from mass to molar ratios and expressed as molar percentage of pectic extracts. Regardless the method

Abbreviations: AIS, alcohol insoluble solids; Ara, arabinose; CSP, chelator soluble pectin fraction; DASP, diluted alkali soluble pectin fraction; GalA, galacturonic acid; Gal, galactose; HG, homogalacturonan; HM, high methyl esterified; RG-I, rhamnogalacturonan I; RG-II, rhamnogalacturonan II; Rha, rhamnose; WSP, water soluble pectin fraction.

* Corresponding author.

E-mail address: a.zdunek@ipan.lublin.pl (A. Zdunek).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134378>

Received 13 May 2022; Received in revised form 1 September 2022; Accepted 19 September 2022

Available online 21 September 2022

0308-8146/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

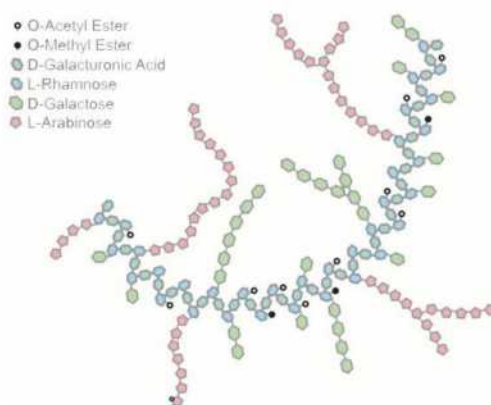


Fig. 1. Simplified structure of rhamnogalacturonan I. Backbone is made of galacturonic acid and rhamnose linked with $\alpha(1\rightarrow3)$ bond. Arabinose and galactose, linked with rhamnose residues, form the side chains.

used for extraction, the highest amounts of RG-I domains in the soluble solids extractable fraction might be obtained from okra pods (86 mol%), that corresponded also with high percentage shares of Gal and Ara (Sengkhamparn, Verhoef, Schols, Sajjanantakul, & Voragen, 2009), and from potato (86.7 mol%) (Khodaei et al., 2013). High proportion of RG-I was reported also in *citrus subcompressa* (62.15–74.15 mol%), cocoa pod husks (26.54–41.19 mol%), blackberries (22.37–37.63 mol%) and *Cerasus humilis* fruits (73.64 mol%) (Harris, 2009; Hou et al., 2021; Muñoz-Almagro et al., 2021; Zhang et al., 2021). Moderate amounts of RG-I (up to 20–30 mol% of pectin extract on average) were reported for grapefruit (19.59–42.13 mol%), citrus unshiu fruit (29.74–37.91), raspberries (15.94–29.91 mol%), strawberries (28.76–29.41 mol%) and sugar beet (28.60–29.31 mol%) (Chen et al., 2021; Yujie Mao et al., 2019; Muñoz-Almagro et al., 2021; Wang et al., 2015).

Due to numerous interconnections between pectic compounds as well as hemicelluloses the presence of monosaccharides which are not specific for RG-I was observed in RG-I extracts (Byg et al., 2012). The presence of non-specific for RG-I monosaccharides indicates that obtaining of pure RG-I without other pectin types is very questionable. Considering RG-I as a whole (backbone and additional side chains) the highest yields reported in Table 1 were as high as 86 % and 86.7 % for Okra plant and potato extracts, respectively (Sengkhamparn et al., 2009; Khodaei & Karboune, 2013). Isolation of the RG-I backbone would require an additional extraction step consisting in the selective degradation of glycosidic bonds of side chains. However, it should be noted, that although enzymatic degradation is a powerful tool, usually the action of enzymes is not limited to the selected type of bond. There is therefore a risk of partial damage to the structure of the RG-I backbone and thus a decrease in the extraction efficiency.

The RG-I content may also vary depending on the plant organ being the source of pectin. For instance, broccoli florets are enriched in branched RG-I pectin while stem is composed of more linear polysaccharides (Houben, Jolie, Fraeye, Van Loey, & Hendrickx, 2011). In citrus, higher amounts of RG-I are extracted from the peel than from the fruit flesh (Chen et al., 2021; Cui et al., 2020; Koubala et al., 2008; Yapo, Lerout, Thibault, & Ralet, 2007).

Apple pomace (10–18 %wt of pectin on a dry apple pomace basis) and citrus peels (15–30 % of pectin on a dry peel basis) are the most common sources for pectin. However, the efficiency of pectin extraction from raspberry, sugar beet and passion fruit peels, and cacao pod husks are comparable with yields reported for apple pomace (Yujie Mao et al.,

2019; Muñoz-Almagro et al., 2021; Wang, Chen, & Lü, 2014; Wikiera, Mika, & Grabacka, 2015; Seixas et al., 2014). Lower yield on fruit dry weight basis were found for strawberry, mango and kiwi fruit (Koubala et al., 2008; Muñoz-Almagro et al., 2021; Yuliarti, Goh, Matia-Merino, Mawson, & Brennan, 2015; Yuliarti, Matia-Merino, et al., 2015).

3. The effect of extraction methods on RG-I

3.1. Traditional extraction methods

Table 2 summarizes the RG-I pectin extraction methods presented in Table 1. Traditional extraction methods (the base methods in Table 2) include conventional solid-liquid extraction with mineral and organic acids (hydrochloric, citric, acetic, nitric, sulfuric, phosphoric), requiring minor adjustments of pH, temperature (mostly in pH 1–3 and at 70–100 °C) and extraction time to achieve desired yields. Mineral acid treatment allows to obtain mostly HG-rich pectic fraction, due neutral side chains degradation (Guizhu Guizhu Mao et al., 2019; May, 1990; Zykwiniska, Rondeau-Mouro, Garnier, Thibault, & Ralet, 2006). Other solvent types such as water, alkalies, chelating agents and buffers are used to obtain pectin fractions of different structure and functionality.

Usually different solvents are applied in the sequence of successive extractions, allowing to obtain specific pectin fractions according to linkage mechanism in cell wall (Chylińska, Szymańska-Chargot, & Zdunek, 2016; Cornuault, Pose, & Knox, 2018; Cybulska, Zdunek, & Koziol, 2015; Gawkowska, Cieśla, Zdunek, & Cybulska, 2019; Liu, Pi, Guo, Guo, & Yu, 2019; Renard et al., 2020). Most commonly, the sequential extraction path consists of water (water soluble pectin fraction-WSP), calcium chelator (chelator soluble pectin fraction-CSP), diluted alkali (sodium carbonate soluble pectin fraction- DASP or SSP) and alkali (Cornuault et al., 2018; Cybulska et al., 2015; Gawkowska, Cieśla, Zdunek, Cybulska, et al., 2019; Szymanska-Chargot & Zdunek, 2013). After sequential extraction substantial portion of insoluble pectins may still remain in cell wall (Zdunek, Koziol, Pieczywek, & Cybulska, 2014). Water extraction can be useful especially for the high methoxylated middle lamella pectins (Taboada et al., 2010). The CSP fraction considered as ionically linked in cell wall is extracted using chelating agents such as CDTA, EDTA, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$, imidazole. Their extraction mechanism is based on calcium ions chelating, allowing to extract low methoxylated pectins loosely attached to the cell wall with high GalA to neutral sugars ratio (Chylińska et al., 2016; Gawkowska, Cybulska, & Zdunek, 2018; Manrique & Lajolo, 2002; Redgwell, Fischer, Kendal, & MacRae, 1997; Yamada, 1996; Yapo et al., 2007). The covalently linked pectin fraction can be extracted with diluted alkali solution, which prevents hydrolysis of neutral side chains, while harsh alkali condition lead to additional degradation of HG backbone by β -elimination and oxidative peeling (Hou et al., 2021; Khodaei & Karboune, 2013; Zykwiniska et al., 2006). Common alkali solutions reported for DASP pectic fraction extraction are NaOH, KOH (Khodaei & Karboune, 2013) and Na_2CO_3 (Cybulska et al., 2015; Pieczywek, Koziol, Płaziński, Cybulska, & Zdunek, 2020; Redgwell et al., 1997). Na_2CO_3 releases pectins from cell wall by breaking ester bounds between solubilized pectin molecules and release low-molecular weight pectins from the cell wall (Posé, Kirby, Mercado, Morris, & Quesada, 2012). Sequential extraction of pectin fractions from apples (deionized water, CDTA and Na_2CO_3 with NaBH_4) showed that the sodium carbonate fraction is rich in galacturonic acid (~60.48 mol %) and neutral sugars. Rhamnose content was ~3.10 mol %, while arabinose and galactose total amount was ~33.29 mol % (Gawkowska, Cieśla, Zdunek, & Cybulska, 2019). The sequential extraction of okra cell wall material carried out using hot buffer (HBSS), chelating agent (CHSS), dilute alkaline (DASS) and concentrated alkaline (CASS) showed that the HBSS fraction is composed mainly of RG-I (85 %), as indicated by the high content of rhamnose (26 mol%) and galactose (34 mol %), while galacturonic acid amount is 35 mol% (Sengkhamparn et al., 2009). Rha/GalA ratio for this fraction was 0.7, which was the highest value among

Table 1

Collective data of RG-I pectin sources, extraction methods and conditions with sugar composition and extraction yield. Abbreviations for extraction techniques: T-traditional, S-supportive, WT-water, MA-mineral acid, OA-organic acid, ALK-alkalis, CH-chelator, EZ-enzymes, MW-microwave, US-ultrasounds, HP-high pressure (See below-mentioned references for further information).

Source	Extraction type	method	Conditions	Yield	GalA	Rha	Gal	Ara	Man	GalA	Ref.
Apple	T	WT	Subcritical water, solid-liquid ratio 1:30, 150 °C	16.68 %wt dry pomace	30.35	0.48	2.54	1.55	5.05	0.02	X. Wang et al., 2014
Apple	T	MA	H2SO4, solid-liquid ratio 1:20 g/mL, 85 °C, pH 2.0, 3 h	14.52 %wt dry pomace	29.07	0.44	2.08	2.99	3.95	0.02	Wilczka et al., 2015
Apple	S	WT/EZ	Cellulase 5001 (g, 50C, 18h, solid-liquid ratio 1:15 g/mL, pH 4.5	18.95 %wt dry pomace	29.13	0.58	1.34	4.10	6.62	0.02	Wilczka et al., 2015
Apple	S	WT/EZ	Ferment 5001 (g, 50-60C, 18h, solid-liquid ratio 1:10 g/mL, pH 4.5	11.79 %wt dry pomace	36.74	0.49	1.15	2.85	4.98	0.02	Wilczka et al., 2015
Apple	S	WT/EZ	Vicoream 5001 (g, 50-60C, 18h, solid-liquid ratio 1:15 g/mL, pH 4.5	17.30 %wt dry pomace	32.12	0.52	1.54	3.70	6.28	0.02	Wilczka et al., 2015
Blackberry	T	OA	solid-liquid 1:4 g/mL, 20% citric acid, 58C, 60 min US bath, pH 3	7.70 g/100g DW	26.68	12.79	2.65	9.99	37.63	0.48	Muñoz-Almagro et al., 2021
Blackberry	S	OA/US	solid-liquid 1:4 g/mL, 20% citric acid, 58C, 60 min US bath, pH 3	8.40 g/100g DW	33.64	10.23	4.66	4.84	28.98	0.30	Muñoz-Almagro et al., 2021
Blackberry	S	CH/EZ	solid-liquid 1:3 g/mL, sodium acetate 0.1 M, pH 5.0, 0.3 mL Cellulase (13 U/g), 40C, 90 min	4.30 g/100g DW	32.45	2.80	2.78	13.99	22.37	0.09	Muñoz-Almagro et al., 2021
Blackberry	S	CH/EZ/US	solid-liquid 1:3 g/mL, sodium acetate 0.1 M, 0.3 mL Cellulase (13 U/g), 40C, 90 min US	4.80 g/100g DW	32.24	3.29	2.83	13.59	23.00	0.10	Muñoz-Almagro et al., 2021
Cacao pod husks	T	MA	HNO ₃ , pH 3.5, 100°C, 30 min	10.70 %wt dry material	29.88	7.07	11.27	1.13	26.54	0.14	Vicennano & de Oliveira Polikawa, 2017
Cacao pod husks	T	WT	Water (1:25, w/v, 90 min) at 50 °C	7.3 %wt of cocoa flour	23.23	13.64	12.05	3.06	41.19	0.34	Vicennano et al., 2011
Cacao pod husks	T	WT	Water (1:25, w/v, 90 min) at 100 °C	12.6 %wt of cocoa flour	22.97	8.77	14.10	3.73	34.97	0.18	Vicennano et al., 2011
Cornus lusitana fruits	T	OA	1 M citric acid, pH 2, 65 °C, 2 h	28.72	10.10	11.23	42.09		33.64	0.33	Zhang et al., 2021
Citrus peel (by-product)	T	ALK	NaOH 0.05 M 4°C, 30 min x3	4.80 % CWM dry weight	71.30	3.90	7.06	12.10	50.90	0.08	Yapo et al., 2007
Citrus peel (by-product)	T	WT	water, liquid-solid ratio 1:30 g/mL, pH 4.5 with 0.1 M DCL, 120 rpm, 30 min, 25 °C	5.8 % CWM dry weight	81.10	1.40	4.70	8.20	15.70	0.02	Yapo et al., 2007
Citrus peel (by-product)	T	CH	1% w/v potassium oxalate, pH 4.5, 25 °C (3x150 mL, 3x30 min)	14.7 % CWM dry weight	86.50	1.30	3.30	6.20	12.10	0.02	Yapo et al., 2007
Citrus peel (by-product)	T	MA	HCl 0.05 M 85°C, 30 min x3	27.30 % CWM dry weight	66.30	2.30	4.60	21.90	31.10	0.03	Yapo et al., 2007
Citrus subcompres	S	MA/HP	0.01 M HCl solution (solid to liquid 1:40 g/mL, pH 2.0, 1000 MPa, 10 min	15.95 %wt dry peel	33.57	5.77	24.77	25.84	62.15	0.17	Bon et al., 2021 (continued on next page)
Citrus subcompres	S	ALK/HP	0.01 M NaOH solution (solid to liquid 1:40 g/mL, pH 12.0, 1000 MPa, 10 min	23.95 %wt dry peel	22.87	6.89	18.92	41.81	34.51	0.30	Bon et al., 2021
Citrus undried fruit	T	MA	Commercial extraction process, powder shape of raw material, pH 1.5, 30 °C, 90 min	21.46 %wt dry husk	74.83	0.91	13.06	1.96	26.74	0.09	Chen et al., 2021
Citrus undried fruit	T	MA	Commercial extraction process, whole shape of raw material, pH 1.0, 25 °C, 40 min	8.81 %wt dry husk	62.74	3.57	2.57	23.20	37.91	0.66	Chen et al., 2021
Gold kiwifruit	T	OA	Citric acid, 1% w/v pomace to acid solution ratio, pH ~2.2, 50 °C, 60 min	3.83 % dry fruit powder	44.70	0.36	3.16	1.91	6.79	0.02	Yildirim, Gök, et al., 2013
Gold kiwifruit	T	WT	water with solid ratio 1:4, 25C, 30 min, pH 3.6	3.27 %wt dry fruit powder	41.90	0.93	4.85	1.86	8.57	0.02	Yildirim, Gök, et al., 2013
Gold kiwifruit	T	WT	Water bath, pomace to water ratio of 1:3 (w/v), 25°C, 30 min	3.62 %wt dry pomace	42.50	1.08	4.51	2.30	9.03	0.03	Yildirim, Maria-Morales, et al., 2013
Gold kiwifruit	T	WT/EZ	Cellulase 1.5 L, concentration of 1.85 mL/kg, 25 °C, 30 min	4.48 %wt dry pomace	43.59	1.04	3.81	3.58	8.47	0.02	Yildirim, Maria-Morales, et al., 2013
Grapefruit	S	MA/EZ	Water (1:30, w/v), pH 2.2, adjusted using 3 M DCL	21.28 %wt dry peel	73.56	1.22	7.06	3.69	19.59	0.04	Cui et al., 2020
Grapefruit	T	MA	Conventional heating extraction (CWE), pH 1.5 adjusted by 0.5M HCl, 80 °C, 90 min	22.50 %wt dry peel	35.20	7.20	13.84	4.43	32.83	0.13	W. Wang et al., 2015
Grapefruit	S	WT/US	Ultrasound-assisted heating extraction (U-AHE), 12.5h W/cm ² , 60 °C, 27.93 min	27.34 %wt dry peel	50.03	7.59	14.25	12.72	42.13	0.11	W. Wang et al., 2015
Green tea leaf	T	MA	HCl (50 mM), 30 min stirring at 70 °C; pH 3 adjusted with 1 M NaOH, 1 h stirring	2.60 %wt of leaf powder	31.27	3.07	7.83	0.64	21.63	0.07	Flo-Flores et al., 2011
Green tea leaf	T	MA	HCl (50 mM), 30 min stirring at 70 °C; pH 3 adjusted with 1 M NaOH, 10 h stirring	1.29 %wt of leaf powder	24.97	4.45	10.49	11.66	11.06	0.04	Flo-Flores et al., 2011
Lime	T	MA	HCl (pH 1.5) at 85 °C for 1 h, solid to liquid 1:40 g/mL	19.8 mg/g dry peel	42.29	0.73	7.16	0.27	8.89	0.02	Karabuda et al., 2008
Lime	T	WT	distilled water at 75 °C for 1h, solid to liquid 1:40 g/mL	6.7 mg/g dry peel	35.59	0.79	1.44	3.40	6.42	0.03	Karabuda et al., 2008
Lime	T	CH	sodium oxalate (0.25%), pH 4.6 (saccharic acid, 85C, 1 h, solid to liquid 1:40 g/mL	22.6 mg/g dry peel	31.47	0.79	1.55	6.59	8.75	0.03	Karabuda et al., 2008
Mandarin orange	T	WT	Subcritical water, solid-liquid ratio 1:30, 120 °C	23.95 %wt dry pomace	33.32	0.29	14.00	2.06	4.04	0.01	X. Wang et al., 2014
Mango	T	MA	HCl (pH 1.5) at 85 °C for 1 h, solid to liquid 1:40 g/mL	10.1 mg/g dry peel	33.34	0.49	7.88	0.48	9.26	0.01	Karabuda et al., 2008
Mango	T	WT	distilled water at 75 °C for 1h, solid to liquid 1:40 g/mL	4.6 mg/g dry peel	13.50	0.91	17.65	6.73	36.21	0.07	Karabuda et al., 2008

Table 1 (continued)

Mango	T	CH	ammonium oxalate (0.25%) pH 4.6 (saccharic acid), 85C, 1 h, solid to liquid 1:40 g/mL	11.6 mg/g dry peel	19.52	0.67	6.99	4.53	12.86	0.03	Karabuda et al., 2008
Okra plant	T	CH	0.05 M EDTA and 0.05 M sodium acetate in 0.05 M sodium oxalate at pH 5.2 and 70 °C	4.50 g/100g AS	63.00	14.00	17.00	3.00	44.00	0.27	Sengchampan et al., 2009
Okra plant	T	CH	0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.2, 70 °C	11.20 g/100g AS	35.00	26.00	34.00	0.00	36.00	0.26	Sengchampan et al., 2009
Okra plant	T	ALK	0.05 M sodium hydroxide, 0 °C, 20 mM NaOH	13.20 g/100g AS	40.00	13.00	19.00	15.00	33.00	0.27	Sengchampan et al., 2009
Okra plant	T	ALK	0.1 M sodium hydroxide at 0 °C and 20 mM NaOH	4.10 g/100g AS	3.00	1.00	8.00	3.00	11.00	0.33	Sengchampan et al., 2009
Parsnip fruit	S	OA/MW	Microwave-induced heating, 150/450/827 9W, pH 2.0, 1/6/9 min + Acetic acid	11.80 %wt dry peel	32.19	2.44	3.77	6.13	14.98	0.08	Seyran et al., 2014
Parsnip fruit	S	OA/MW	Microwave-induced heating, 150/450/827 9W, pH 2.0, 1/6/9 min + Tartaric acid	18.50 %wt dry peel	30.13	3.59	5.11	5.40	17.69	0.12	Seyran et al., 2014
Parsnip fruit	S	OA/MW	Microwave-induced heating, 150/450/827 9W, pH 2.0, 1/6/9 min + Nitric acid	10.40 %wt dry peel	42.39	1.58	2.60	2.73	7.89	0.04	Seyran et al., 2014
Potato	T	ALK	0.3 M NaOH with 0.02 M NaBH ₄ 60 °C, 24 h	24.40 %wt CWM	13.30	3.10	67.40	13.10	46.70	0.23	Kloschek & Karbouna, 2013
Potato	T	ALK	2.0 M NaOH with 0.02 M NaBH ₄ 60 °C, 24 h	33.60 %wt CWM	9.70	3.10	68.00	13.60	79.80	0.32	Kloschek & Karbouna, 2013
Potato	T	ALK	0.3 M KOH with 0.02 M NaBH ₄ 60 °C, 24 h	22.20 %wt CWM	17.10	2.90	62.60	12.90	41.10	0.17	Kloschek & Karbouna, 2013
Potato	T	ALK	2.0 M KOH with 0.02 M NaBH ₄ 60 °C, 24 h	55.70 %wt CWM	16.40	3.10	52.60	15.30	76.30	0.31	Kloschek & Karbouna, 2013
Potato	S	CH/EZ	chondropolygalacturonase from A. Niger, 40 mg/kg cell wall, 35 °C, 24h	37.90 %wt CWM	29.20	3.50	55.80	11.20	112.00	0.12	Kloschek & Karbouna, 2013
Raspberry	T	OA	solid-liquid 1:4 g/mL, 20% citric acid, 58C, 60 min US bath, pH 3	8.80 g/100g DW	31.01	0.36	3.60	8.39	29.91	0.10	Muñoz-Almagro et al., 2021
Raspberry	S	OA/US	solid-liquid 1:4 g/mL, 20% citric acid, 58C, 60 min US bath, pH 3	10.80 g/100g DW	34.56	0.27	3.72	6.39	22.86	0.18	Muñoz-Almagro et al., 2021
Raspberry	S	CH/EZ	solid-liquid 1:3 g/mL, sodium acetate 0.1 M, 0.3 mL Cellulase (13 U/g), 40C, 90 min	9.90 g/100g DW	35.85	1.05	2.65	7.79	15.84	0.08	Muñoz-Almagro et al., 2021
Raspberry	S	CH/EZ/US	solid-liquid 1:3 g/mL, sodium acetate 0.1 M, 0.3 mL Cellulase (13 U/g), 40C, 90 min US bath	10.80 g/100g DW	33.94	0.99	2.16	6.66	21.01	0.18	Muñoz-Almagro et al., 2021
Strawberry	T	OA	solid-liquid 1:4 g/mL, 20% citric acid, 58C, 60 min US bath, pH 3	7.40 g/100g DW	29.36	10.84	1.67	6.06	29.41	0.17	Muñoz-Almagro et al., 2021
Strawberry	S	OA/US	solid-liquid 1:4 g/mL, 20% citric acid, 58C, 60 min US bath, pH 3	8.90 g/100g DW	29.21	8.65	4.23	7.13	28.76	0.30	Muñoz-Almagro et al., 2021
Strawberry	S	CH/EZ	solid-liquid 1:3 g/mL, sodium acetate 0.1 M, pH 5.0, 0.3 mL Cellulase (13 U/g), 40C, 90 min	4.10 g/100g DW	37.60	1.83	2.22	6.73	12.40	0.05	Muñoz-Almagro et al., 2021
Strawberry	S	CH/EZ/US	solid-liquid 1:3 g/mL, sodium acetate 0.1 M, pH 5.0, 0.3 mL Cellulase (13 U/g), 40C, 90 min US	3.90 g/100g DW	38.12	1.46	1.72	6.99	11.64	0.04	Muñoz-Almagro et al., 2021
Sugar beet	T	MA	deionized water (5%, w/v) with 12 M DMSO, pH 1.2, 90 °C, 3h	18.94	21.94	3.04	4.22	2.14	12.38	0.14	Torres Pacheco et al., 2019
Sugar beet	S	CH/MW	1% (w/v) NaPO ₃ 6 chelator, 21.5 mL/g solid-liquid ratio, 900W, microwave, 90C, 10 min	11.00 %wt AS	44.52	0.21	1.95	3.34	5.71	0.00	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	T	CH	1% (w/v) NaPO ₃ 6 chelator, 21.5 mL/g solid-liquid ratio, 90C, 10 min	13.00 %wt AS	44.68	0.38	2.08	3.58	6.42	0.01	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	S	CH/MW	1% (w/v) NaPO ₃ 6 chelator, 21.5 mL/g solid-liquid ratio, 900W, microwave, 90C, 120 min	7.50 %wt AS	39.76	0.27	1.66	5.30	7.41	0.01	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	T	CH	1% (w/v) NaPO ₃ 6 chelator, 21.5 mL/g solid-liquid ratio, 90C, 120 min	7.50 %wt AS	39.08	2.52	1.74	5.38	12.16	0.06	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	S	MA/MW	HCl pH 1.0, 900W, microwave, 90C, 120 min	27.60 %wt AS	44.74	0.46	1.16	3.85	5.92	0.01	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	T	MA	HCl pH 1.0, 90C, 120 min	23.10 %wt AS	44.73	0.46	1.09	3.78	5.79	0.01	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	S	MA/MW	HCl pH 1.3, 900W, microwave, 90C, 120 min	11.00 %wt AS	43.76	0.49	1.43	3.36	7.39	0.01	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	T	MA	HCl pH 1.5, 90C, 120 min	12.00 %wt AS	43.75	0.49	1.57	3.17	7.73	0.01	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	S	MA/MW	HCl pH 2.0, 900W, microwave, 90C, 120 min	3.80 %wt AS	42.45	0.25	2.24	6.19	9.72	0.01	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	T	MA	HCl pH 2.0, 90C, 120 min	5.60 %wt AS	42.36	0.54	2.35	6.46	9.88	0.01	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	S	WT/MW	water, 21.5 mL/g solid-liquid ratio, 900W, microwave, 90C, 120 min	5.60 %wt AS	42.64	0.56	2.28	6.57	10.27	0.01	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	S	WT/MW	water, 21.5 mL/g solid-liquid ratio, 90C, 120 min	6.10 %wt AS	42.83	0.53	2.35	6.86	10.27	0.01	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	S	WT/MW	water, 21.5 mL/g solid-liquid ratio, microwave, 180C, 10 min	10.80 %wt AS	42.63	0.58	2.67	7.62	11.46	0.01	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	S	ALK/MW	NaOH, pH 11, 900W, microwave, 90C, 120 min	2.00 %wt AS	41.18	0.65	2.59	7.73	11.62	0.02	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	T	ALK	NaOH, pH 11, 90C, 120 min	1.70 %wt AS	40.77	0.61	2.73	7.62	11.58	0.02	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	S	ALK/MW	NaOH, pH 12, 900W, microwave, 90C, 120 min	9.40 %wt AS	36.32	1.05	4.05	9.79	15.91	0.03	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	T	ALK	NaOH, pH 12, 90C, 120 min	10.80 %wt AS	36.39	0.99	3.76	7.76	15.51	0.03	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	S	ALK/MW	NaOH, pH 13, 900W, microwave, 90C, 120 min	22.40 %wt AS	24.03	2.13	7.38	17.67	29.31	0.09	Y. Mao et al., 2019a
Sugar beet	T	ALK	NaOH, pH 13, 90C, 120 min	23.70 %wt AS	24.31	2.13	7.17	17.17	31.60	0.09	Y. Mao et al., 2019a
Squidberry	S	WT/US	Ultrasound assisted extraction, 400 W, 33°C, 30 min	11.13 g/100g dry powder	37.37	1.74	5.47	5.34	14.29	0.05	Ezzati et al., 2020

all obtained fractions. The DASS fraction with Rha/GalA ratio 0.3 contained 43 % of RG-I and 57 % of HG, but it was also enriched in arabinose and galactose.

3.2. Supportive extraction techniques

Beside the traditional methods, innovative approaches such as ultrasound-, microwave-, enzyme-assisted extraction and hybrid methods are using as well (Kumar et al., 2020; Marić et al., 2018; Wikiera et al., 2015). Microwaves and ultrasound energy support extraction process increasing the solvent penetration and resulting in higher pectin extraction efficiency (Kumar et al., 2020). Similarly, pulsed electric field as an assistant extraction technique is alternative to methods based on conventional heating (Nandhu Lal, Prince, & Sreeja, 2020). Supportive extraction techniques can reduce the processing time, required energy and amount of solvent, as well as the overall production cost (Ezzati et al., 2020).

Microwave-assisted extraction may provide similar effects as the conventional alkaline extraction as it was demonstrated by Mao et al. (Yujie Mao et al., 2019) for sugar beet pulp. Both methods were compared in accordance with the RG-I pectic region extractability and resulted in similar yields. Moreover, for each technique, the yields of the extraction process and the Rha/GalA ratio increases with the increase of pH (Yujie Mao et al., 2019).

Ultrasound-assisted techniques were also employed for pectin extraction from sunflower by-product (Ezzati et al., 2020) allowing the content of HG and RG-I equal to 70.08 % and 23.58 % molar ratio, respectively. Ultrasound-assisted extraction shows lower impact on the degradation of pectic side chains allowing to preserve more branched regions, in comparison to conventional thermal and acidic extraction processes (Wenjun Wang et al., 2016).

High pressure homogenization (HPH) is another assistive technique that can be combined with conventional extraction, to improve and modify pectin properties. It is based on mechanical degradation of pectin structure due to high pressure, velocity and shear forces of fluid, leading to multiple rheological and textural changes in obtained materials (Shpigelman, Kyomugasho, Christiaens, Van Loey, & Hendrickx, 2015; Willemsen et al., 2017; Xie et al., 2018). The reported modifications are related to increase in GalA content, significant molecular weight and polydispersity decrease, reduction of esterification degree and branching, increase in viscosity and improvement of emulsifying properties of extracted pectin solutions (Willemsen et al., 2017; Xie et al., 2018). Combination of high pressure techniques with alkali solvents led to higher extraction yields of branched RG-I with improved

Table 2

The methods used for RG-I extraction with corresponding averaged RG-I content (mol%) in pectin extracts and Rha/GalA ratios based on data from reviewed research papers (Table 1).

Pectin extraction methods		Averaged RG-I content (mol%)	Averaged Rha/GalA
Base method	Supportive technique		
Water		16.80	0.13
	Enzyme	19.91	0.04
	Ultrasounds	28.21	0.10
	Microwaves	10.67	0.01
Alkalies		48.37	0.19
	High pressure	74.51	0.30
Chelator	Microwaves	18.95	0.04
		26.75	0.16
	Enzyme	16.97	0.07
	Enzyme/ultrasounds	18.55	0.11
Mineral acid	Microwaves	6.56	0.01
		19.31	0.07
	High pressure	62.15	0.17
Organic acid	Microwaves	7.81	0.01
		35.48	0.30
	Microwaves	13.52	0.08
	Ultrasounds	27.20	0.26

properties such as higher Mw/Mn values (polydispersity index), antioxidant activity and water holding capacity of pectin molecules. Decrease of viscosity was observed for the pectic polysaccharides extraction assisted with high pressure, compared with application of only alkali solvent. Gels properties were described by high hardness and chewiness values for high pressure-assisted extract in alkali conditions (pH 12), however no statistically significant influence of high pressure treatment on gels' stability was shown. The reported RG-I yields has shown positive correlation with applied pressure (Hou et al., 2021). Similarly, ultra-high pressure extraction technique allowed to obtain pectin with higher yield when compared to microwave-assisted and traditional heating techniques (Guo et al., 2012). Pectin extracted with ultra-high pressure exhibited improved rheological properties allowing to use them as thickeners and stabilizers (Guo et al., 2012; Xie et al., 2018; Zhao et al., 2015).

3.3. RG-I optimized extraction methods

The optimization of the traditional solid-liquid extraction process

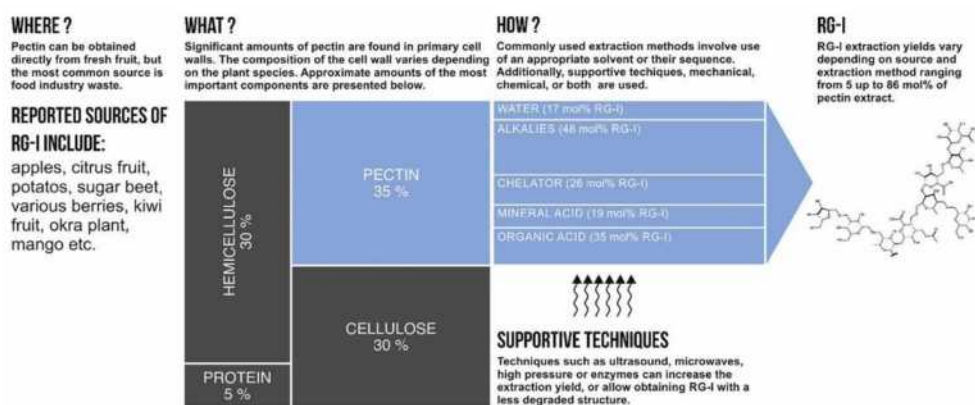


Fig. 2. The general approach to the extraction of rhamnogalacturonan I. Data based on reviewed papers.

may include adjustment of the other factors, influencing the type and structure of the isolated material. Extraction with different concentrations of NaOH and KOH solutions have been compared with enzymatic treatment with endopolygalacturonase from *A. niger*. While the yield obtained upon the enzymatic treatment was similar, high molar ratio of galactose, arabinose and rhamnose with relatively low galacturonic acid content indicated recovery of almost intact RG-I structures, compared to more degraded ones obtained with alkaline solutions (Khodaei & Karboune, 2013). Citric acid, water and enzyme Celluclast 1.5L (Novozymes, Copenhagen, Denmark) containing mainly cellulases (Yuliarti, Matia-Merino, Goh, Mawson, & Brennan, 2011) has been employed for pectin extraction from gold kiwifruit pomace (Yuliarti, Matia-Merino, et al., 2015). According to the authors, enzymatic hydrolysis of cellulose that probably led to the release of pectin trapped within the cellulose matrix, resulted in higher yield compared with conventional extraction. The rhamnose content was similar for all methods used, while pectin extracted by acid method exhibited the highest linearity of backbone structure. Acidic and enzymatic hydrolysis of the branched sections of polysaccharide molecules led to lower degree of branching when compared water-extracted fraction of pectin. Taboada et al. (Taboada et al., 2010) characterized pectins from murta fruits isolated by sequential extraction. Relatively high Rha/GalA ratios were reported for water and alkali extracted fractions (0.205 and 0.373, respectively), however with the low yield for the latter (2 % for NaOH extraction, compared with 17 % for H₂O). In order to obtain RG-I type pectic polysaccharides alkaline treatments may be replaced with enzymes, as it was demonstrated by Khodaei & Karboune (Khodaei & Karboune, 2013) for potato.

High Rha/GalA ratio and neutral sugar content was also reported for diluted HCl and NaOH treatments of citrus peels. Fractions obtained with these agents were richer in highly-branched regions of rhamnogalacturonans (both, type I and II) compared to water or potassium oxalate treatments. Improved RG-I extraction efficacy, indicated by richness in Ara, Gal, GalA and Rha with Rha/GalA molar ratio close to 1, was achieved by means of combined enzymatic and conventional solvent treatments, namely *endo*-1,4- α -polygalacturonase treatment of deesterified oxalate-extracted pectin and acid-extracted pectin fractions (Yapo et al., 2007).

Kaya et al. (Kaya, Sousa, Crépeau, Sørensen, & Ralet, 2014) were examined the composition of the pectic fractions obtained by means of various extraction methods applied to dried peels originating from different citrus plants (orange, lemon, lime, grapefruit). The highest Rha/GalA ratio was reported for grapefruit citrus peel extracted for 7 h with HNO₃ at pH 1.6 and 70 °C. In the studies by Chen et al. (Chen et al., 2021) temperature of extraction was shown to be the main factor affecting pectin properties. It was demonstrated that low-temperature acidic extraction results in lower yields, although it allows to reduce the hydrolysis of pectin side-chains and preserve the neutral sugar branches in their native state.

The pH is another parameter influencing extractability of rhamnogalacturonans. It was shown that the extraction yield of the RG-I and the Rha/GalA ratio increased, with the increase of the concentration of the alkali solvent and pH level during the extraction process (Kaya et al., 2014; Khodaei & Karboune, 2013). However, as it was reported that positive the effect of pH lasts up to a pH of 10, when the highest extraction efficiency of RG-I was observed (Cui et al., 2020).

4. Summary

The amounts of RG-I extracted from the plant cell wall varies depending on plant source and applied acquisition technique. Higher relative shares of this compound in the total pectin content are usually associated with extensive branching of pectin, indicated by higher amounts of neutral sugars. Traditional methods for RG-I extraction commonly involve solid-liquid extraction with acid, alkali, water, chelator or combination of those in sequential process. Supportive

techniques such as microwaves, ultrasounds, enzymes and high pressure can be combined with traditional methods, resulting in higher yields. Alkali treatment is the most widely used technique for extraction of RG-I rich fraction. However, it was shown that tailor-made approaches (water and citric acid with enzymes, for instance) can provide high yields in almost intact state. Although the most popular sources for pectin extraction are citrus and apples, numerous studies showed that other sources can be as effective, among which industrial by-products seems to be especially interesting. High variability of plant cell wall content makes it challenging to provide universal procedures for pectin extraction. The methods has to be fitted to the pectin source in order to provide desired yields and structural properties of extracted polysaccharides.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgements

This work was supported by the National Science Centre, Poland [grant number 2019/35/ O/NZ9/01387].

References

- Bellincampi, D., Cardarelli, M., Zaghi, D., Serino, G., Salvi, G., Gatz, C., Cervone, F., Alramani, M. M., Costantino, P., & De Lorenzo, G. (1996). Oligogalacturonides prevent rhizogenesis in *roB* transformed tobacco explants by inhibiting auxin induced expression of the *roB* gene. *Plant Cell*, 8(3), 477–487. <https://doi.org/10.2307/3870326>
- Branca, C., Lorenzo, G. D., & Cervone, F. (1988). Competitive inhibition of the auxin-induced elongation by a D-oligogalacturonides in pea stem segments. *Physiologia Plantarum*, 72(3), 499–504. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb09157.x>
- Byg, I., Diaz, J., Ogedal, L. H., Harholt, J., Jorgensen, B., Rolin, C., Svava, R., & Ulvskov, P. (2012). Large scale extraction of rhamnogalacturonan I from industrial potato waste. *Food Chemistry*, 131(4), 1207–1216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.106>
- Chen, J., Cheng, H., Zhu, Z., Zhuang, H., Linhardt, R. J., Zhang, F., Chen, S., & Ye, X. (2021). Extraction temperature is a decisive factor for the properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 112, Article 106160. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106160>
- Chylinska, M., Szymańska-Chargot, M., & Zdunek, A. (2016). FT-IR and FT-Raman characterization of non-cellulosic polysaccharides fractions isolated from plant cell wall. *Carbohydrate Polymers*, 154, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.121>
- Cormualt, V., Pose, S., & Knox, J. P. (2018). Extraction, texture analysis and polysaccharide epitope mapping data of sequential extracts of strawberry, apple, tomato and aubergine fruit parenchyma. *Data in Brief*, 17, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.01.013>
- Cui, J., Ren, W., Zhao, C., Gao, W., Tian, G., Bao, Y., Lian, Y., & Zheng, J. (2020). The structure-property relationships of acid and alkali extracted grapefruit peel pectins. *Carbohydrate Polymers*, 229, Article 115524. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115524>
- Cybulska, J., Zdunek, A., & Koziol, A. (2015). The self-assembled network and physiological degradation of pectins in carrot cell walls. *Food Hydrocolloids*, 43, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.032>
- Ele Ekouma, J. P., Pau Roblot, C., Courtois, B., & Courtois, J. (2011). Chemical characterization of pectin from green tea (*Camellia sinensis*). *Carbohydrate Polymers*, 83(3), 1232–1239. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.028>
- Ezzati, S., Ayasch, A., Ghanbarzadeh, B., & Heshtmati, M. K. (2020). Pectin from sunflower by-product: Optimization of ultrasound-assisted extraction, characterization, and functional analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 776–786. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.205>
- Gawkowska, D., Cie la, J., Zdunek, A., & Cybulska, J. (2019). Cross-linking of diluted alkali-soluble pectin from apple (*Malus domestica* fruit) in different acid-base conditions. *Food Hydrocolloids*, 92(Febuary), 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.010>
- Gawkowska, D., Cie la, J., Zdunek, A., Cybulska, J., Mokbel, K. M., Mokbel, K. M., Gawkowska, D., Cie la, J., Zdunek, A., Cybulska, J., Leclerc, L., Cutsem, P. V., & Michiels, C. (2019). Cross-linking of diluted alkali-soluble pectin from apple (*Malus domestica* fruit) in different acid-base conditions. *Frontiers in Pharmacology*, 4 OCT (February), 44–72. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2998-5_2

- Gawkowska, D., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2018). Structure related gelling of pectins and linking with other natural compounds: A review. *Polymers*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/polym10070762>
- Goulão, L. F., Santos, J., de Sousa, L., & Oliveira, C. M. (2007). Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Postharvest Biology and Technology*, 43(3), 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.10.002>
- Guo, X., Han, D., Xi, H., Rao, L., Liao, X., Hu, X., & Wu, J. (2012). Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra-high pressure, microwave or traditional heating: A comparison. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.026>
- Harris, P. J. (2009). Cell-wall Polysaccharides of Potatoes. In *Advances in Potato Chemistry and Technology* (First Edit). Elsevier Ltd. 10.1016/b978-0-12-374349-7.00003-9.
- Hou, Z., Chen, S., & Ye, X. (2021). High pressure processing accelerated the release of RG-I pectic polysaccharides from citrus peel. *Carbohydrate Polymers*, 263(March). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118005>
- Houben, K., Jolie, R. P., Fraeye, I., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2011). Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: Structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. *Carbohydrate Research*, 346(9), 1105–1111. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.04.014>
- Iwai, H., Ishii, T., & Satoh, S. (2001). Absence of arabinan in the side chains of the pectic polysaccharides strongly associated with cell walls of Nicotiana glauca callus non-organogenic callus with loosely attached constituent cells. *Planta*, 213(6), 907–915. <https://doi.org/10.1007/s004250100559>
- Jones, L., Seymour, G. B., & Knox, J. P. (1997). Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4)- β -D-galactan. *Plant Physiology*, 113(4), 1405–1412. <https://doi.org/10.1104/pp.113.4.1405>
- Kaczmarek, A., Pieczywek, P. M., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2022). Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review. *Carbohydrate Polymers*, 278, Article 118909. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118909>
- Kaya, N., Sousa, A. G., Crépeau, M. J., Sørensen, S. O., & Ralet, M. C. (2014). Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: Influence of acid type and pH of extraction. *Annals of Botany*, 114(6), 1319–1326. <https://doi.org/10.1093/aob/mbu150>
- Khodaei, N., & Kurboune, S. (2013). Extraction and structural characterisation of rhamnogalacturonan I type pectic polysaccharides from potato cell wall. *Food Chemistry*, 139(1–4), 617–623. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.110>
- Koubala, B. B., Kamsi, G., Mbome, L. I., Crépeau, M. J., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2008). Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from “Améliorée” and “Mango” mango peels. *Food Hydrocolloids*, 22(7), 1345–1351. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.07.005>
- Kumar, M., Tomar, M., Saurabh, V., Mahajan, T., Punia, S., Contreras, M. del M., Rudra, S. G., Kaur, C., & Kennedy, J. F. (2020). Emerging trends in pectin extraction and its anti-microbial functionalization using natural bioactives for application in food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 105(August), 223–237. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.009>
- Lin, Z., Pi, F., Guo, X., Guo, X., & Yu, S. (2019). Characterization of the structural and emulsifying properties of sugar beet pectins obtained by sequential extraction. *Food Hydrocolloids*, 88, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.036>
- Marruque, G. D., & Lajolo, F. M. (2002). FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 25(1), 99–107. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00160-0](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00160-0)
- Mao, G., Wu, D., Wei, C., Tao, W., Ye, X., Linhardt, R. J., Orfila, C., & Chen, S. (2019). Reconsidering conventional and innovative methods for pectin extraction from fruit and vegetable waste: Targeting rhamnogalacturonan I. *Trends in Food Science and Technology*, 94, 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.001>
- Mao, Y., Lei, R., Ryan, J., Arruti Rodríguez, F., Rastall, B., Chatzifragkou, A., Winkworth-Smith, C., Harding, S. E., Ibbett, R., & Bimner, E. (2019). Understanding the influence of processing conditions on the extraction of rhamnogalacturonan I “hairy” pectin from sugar beet pulp. *Food Chemistry: X*, 2(May), Article 100026. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100026>
- Marić, M., Grassino, A. N., Zhu, Z., Barba, F. J., Brčić, M., & Rimac Brčić, S. (2018). An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwave-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science and Technology*, 76, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.022>
- May, C. D. (1990). Industrial pectins: Sources, production and applications”. *Carbohydrate Polymers: J. Ind. Appl. Pectin*, 12(1), 79–99.
- McCartney, L., Ormerod, A. P., Gidley, M. J., & Knox, J. P. (2000). Temporal and spatial regulation of pectic (1→4)- β -D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: Implications for mechanical properties. *Plant Journal*, 22(2), 105–113. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.2000.00719.x>
- Muñoz Almagro, N., Ruiz-Torralba, A., Méndez Albán, P., Guerra Hernández, E., García Villanova, B., Moreno, R., Villanuel, M., & Montilla, A. (2021). Berry fruits as source of pectin: Conventional and non-conventional extraction techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186(July), 962–974. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.016>
- Nandini Lal, A. M., Prince, M. V., & Sreeja, R. (2020). Studies on Characterisation of Combined Pulsed Electric Field and Microwave Extracted Pectin from Jack Fruit Rind and Core. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9 (3), 2371–2380. <https://doi.org/10.20546/ijcm.2020.903.270>
- Nothnagel, E. A., Mcneil, M., Allersheim, P., & Dell, A. (1983). *Host Pathogen Interactions*: 916–926.
- O'Neill, M. A., Ishii, T., Allersheim, P., & Darvill, A. G. (2004). Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 109–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant.55.031903.141750>
- Pacheco, M. T., Villanuel, M., Moreno, R., & Moreno, F. J. (2019). Structural and rheological properties of pectins extracted from industrial sugar beet by-products. *Molecules*, 24(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules24030392>
- Palin, R., & Geitmann, A. (2012). The role of pectin in plant morphogenesis. *BioSystems*, 109(3), 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2012.04.006>
- Peña, M. J., & Carpita, N. C. (2004). Loss of highly branched arabinans and debranching of rhamnogalacturonan I accompany loss of firm texture and cell separation during prolonged storage of apple. *Plant Physiology*, 135(3), 1305–1313. <https://doi.org/10.1104/pp.104.043679>
- Pieczywek, P. M., Kozioł, A., Puziński, W., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2020). Resolving the nanostructure of sodium carbonate extracted pectins (DASP) from apple cell walls with atomic force microscopy and molecular dynamics. *Food Hydrocolloids*, 104 (August 2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105726>
- Popov, S., Smirnov, V., Kvashinova, E., Khlopov, V., Vitayev, F., & Golovchenko, V. (2021). Isolation, chemical characterization and antioxidant activity of pectic polysaccharides of fireweed (*Epilobium angustifolium* L.). *Molecules*, 26(23). <https://doi.org/10.3390/molecules2623290>
- Posé, S., Kirby, A. R., Mercado, J. A., Morris, V. J., & Quesada, M. A. (2012). Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. *Carbohydrate Polymers*, 88(3), 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.029>
- Redgwell, R. J., Fischer, M., Kendal, E., & MacRae, E. A. (1997). Galactose loss and fruit ripening: High-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta*, 203(2), 174–181. <https://doi.org/10.1007/s004250050179>
- Renard, C. M. G. C., Lahaye, M., Mutter, M., Voragen, F. G. J., Thibault, J. F., Buffetto, F., ... Yoshimoto, A. (2020). Characterisation of cell wall polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Carbohydrate Research*, 344(C), 1824–1832. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.10.012>
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6). [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00113-3)
- Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (1996). Complex Pectins: Structure elucidation using enzymes. *Progress in Biotechnology*, 14(C), 3–19. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80242-5](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80242-5)
- Seixas, F. L., Fukuda, D. L., Turbani, F. R. B., Garcia, P. S., Petkowicz, C. L. d. O., Jagadevan, S., & Gimenes, M. L. (2014). Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. flavicarpa) by microwave induced heating. *Food Hydrocolloids*, 38, 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.001>
- Sengkhamporn, N., Verhoef, R., Schols, H. A., Sajsantantakul, T., & Voragen, A. G. J. (2009). Characterisation of cell wall polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Carbohydrate Research*, 344(14), 1824–1832. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.10.012>
- Shpigelman, A., Kyoungasho, C., Christiaens, S., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2015). The effect of high pressure homogenization on pectin: Importance of pectin source and pH. *Food Hydrocolloids*, 43, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.019>
- Szymanska-Chargot, M., & Zdunek, A. (2013). Use of FT-IR Spectra and PCA to the Bulk Characterization of Cell Wall Residues of Fruits and Vegetables Along a Fraction Process. *Food Biophysics*, 8(1), 29–42. <https://doi.org/10.1007/s11483-012-9279-7>
- Taboada, E., Fisher, P., Jara, R., Zúñiga, E., Giddekel, M., Cabrera, J. C., Pereira, E., Gutiérrez-Moraga, A., Villalonga, R., & Cabrera, G. (2010). Isolation and characterisation of pectic substances from murta (Ugni molinae Turcz.) fruits. *Food Chemistry*, 123(3), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.030>
- Tan, J., Hua, X., Liu, J., Wang, M., Liu, Y., Yang, R., & Cao, Y. (2020). Extraction of sunflower head pectin with superfine grinding pretreatment. *Food Chemistry*, 320 (February), Article 126631. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126631>
- Tateishi, A., Kanayama, Y., & Yamaki, S. (1996). α -L-arabinofuranosidase from cell walls of Japanese pear fruits. *Phytochemistry*, 42(2), 295–299. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00931-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00931-0)
- Vriesmann, L. C., de Mello Castanho Amboni, R. D., & De Oliveira Petkowicz, C. L. (2011). Cacao pod husks (Theobroma cacao L.): Composition and hot water-soluble pectins. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1173–1181. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.004>
- Vriesmann, L. C., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2017). Cacao pod husks as a source of low-methoxyl, highly acetylated pectins able to gel in acidic media. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.082>
- Wang, W., Ma, X., Jiang, P., Hu, L., Zhi, Z., Chen, J., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2016). Characterization of pectin from grapefruit peel: A comparison of ultrasound-assisted and conventional heating extractions. *Food Hydrocolloids*, 61, 730–739. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.019>
- Wang, W., Ma, X., Xu, Y., Cao, Y., Jiang, Z., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2015). Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. *Food Chemistry*, 178, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.080>
- Wang, X., Chen, Q., & Li, X. (2014). Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids*, 38, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.003>
- Wikiera, A., Młka, M., & Grabacka, M. (2015). Multicatalytic enzyme preparations as effective alternative to acid in pectin extraction. *Food Hydrocolloids*, 44, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.018>

- Willats, W. G. T., Orfila, C., Linberg, G., Buchholt, H. C., Van Abeek, G. J. W. M., Voragen, A. G. J., Marcus, S. E., Christensen, T. M. I. E., Mikkelsen, J. D., Murray, B. S., & Knox, J. P. (2001). Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls: Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 19404–19413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011242200>
- Willemsen, K. L. D. D., Panozzo, A., Moelants, K., Debon, S. J. J., Desmet, G., Cardinaels, R., Moldenaers, P., Wallecan, J., & Hendricks, M. E. G. (2017). Physico-chemical and viscoelastic properties of high pressure homogenized lemon peel fiber fraction suspensions obtained after sequential pectin extraction. *Food Hydrocolloids*, 72, 358–371. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.020>
- Wolf, S., Mouille, G., & Pelloux, J. (2009). Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular Plant*, 2(5), 851–860. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp066>
- Xie, F., Zhang, W., Lan, X., Gong, S., Wu, J., & Wang, Z. (2018). Effects of high hydrostatic pressure and high pressure homogenization processing on characteristics of potato peel waste pectin. *Carbohydrate Polymers*, 196(March), 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.061>
- Yamada, H. (1996). Contribution of pectin on health care. *Progress in Biotechnology*, 14 (C), 173–190. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80254-1](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80254-1)
- Yang, J. S., Mu, T. H., & Ma, M. M. (2018). Extraction, structure, and emulsifying properties of pectin from potato pulp. *Food Chemistry*, 244(October), 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.059>
- Yapo, B. M., Lerouge, P., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2007). Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers*, 69(3), 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.024>
- Yuliarti, O., Goh, K. K. T., Matia Merino, L., Mawson, J., & Brennan, C. (2015). Extraction and characterisation of pomace pectin from gold kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *Food Chemistry*, 187, 290–296. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.148>
- Yuliarti, O., Matia-Merino, L., Goh, K. K. T., Mawson, J. A., & Brennan, C. S. (2011). Effect of cellulase 1.5L on the physicochemical characterization of gold kiwifruit pectin. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 6407–6417. <https://doi.org/10.3390/ijms12106407>
- Yuliarti, O., Matia-Merino, L., Goh, K. K. T., Mawson, J., Williams, M. A. K., & Brennan, C. (2015). Characterization of gold kiwifruit pectin from fruit of different maturities and extraction methods. *Food Chemistry*, 166, 479–485. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.055>
- Zdmek, A., Koziol, A., Pieczywek, P. M., & Cybulska, J. (2014). Evaluation of the Nanostructure of Pectin, Hemicellulose and Cellulose in the Cell Walls of Pears of Different Texture and Firmness. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3525–3535. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1365-z>
- Zhang, S., He, Z., Cheng, Y., Xu, F., Cheng, X., & Wu, P. (2021). Physicochemical characterization and emulsifying properties evaluation of RG-I enriched pectic polysaccharides from *Cerasus lamella*. *Carbohydrate Polymers*, 260(January). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117824>
- Zhao, W., Guo, X., Pang, X., Gao, L., Liao, X., & Wu, J. (2015). Preparation and characterization of low methoxyl pectin by high hydrostatic pressure-assisted enzymatic treatment compared with enzymatic method under atmospheric pressure. *Food Hydrocolloids*, 50, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.004>
- Zykwinska, A., Roudeau Mouro, C., Garnier, C., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2006). Alkaline extractability of pectic arabinan and galactan and their mobility in sugar beet and potato cell walls. *Carbohydrate Polymers*, 65(4), 510–520. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.02.012>

9. Tekst publikacji P.3

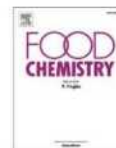
Food Chemistry 446 (2024) 138869



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot

Adrianna Kaczmarek, Piotr M. Pieczywek, Justyna Cybulska, Jolanta Cieřła, Artur Zdunek*

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Dořwiadczałna 4, 20-270 Lublin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Pectin
Rhamnogalacturonan I
DASP
Atomic force microscopy
Rheological properties

ABSTRACT

Pectin, a complex polysaccharide found in plant cell walls, plays a crucial role in various industries due to its functional properties. The diluted alkali-soluble pectin (DASP) fractions that result from the stepwise extraction of apples and carrots were studied to evaluate their structural and rheological properties. Homogalacturonan and rhamnogalacturonan I, in different proportions, were the main pectin domains that composed DASP from both materials. Atomic force microscopy revealed that the molecules of apple DASP were longer and more branched. A persistence length greater than 40 nm indicated that the pectin molecules deposited on mica behaved as stiff molecules. The weight-averaged molar mass was similar for both samples. Intrinsic viscosity values of 194.91 mL·g⁻¹ and 186.79 mL·g⁻¹ were obtained for apple and carrot DASP, respectively. Rheological measurements showed greater structural strength for apple-extracted pectin, whereas carrot pectin was characterized by a higher linear viscoelasticity limit. This comparison showed that the pectin fractions extracted by diluted alkali are structurally different and have different rheological properties depending on their botanical origin. The acquired insights can enhance the customized use of pectin residue and support further investigations in industries relying on pectin applications.

1. Introduction

Pectins are the main component of primary cell walls (~35 %) in dicots and non-gramineous monocots. The main building block of pectins is galacturonic acid, found in combination with other saccharides, depending on the pectin domain. Homogalacturonan (HG), referred to as a “smooth” region of pectin, is composed of α -(1 → 4) linked α -D-GalA, which is usually methyl-esterified and/or acetylated. Two types of rhamnogalacturonans can be distinguished in the “hairy” region. Rhamnogalacturonan I (RGI) consists of a backbone of repeating dimers [$\rightarrow$ 4- α -D-GalpA-(1 → 2)- α -L-Rhap-(1 →)] and numerous side branches, mainly arabinans, galactans, and/or arabinogalactans, attached to up to 80% of rhamnose residues, mostly at O-4. Moreover, GalA residues can be acetylated at the O-2 and O-3 positions (Lau, McNeil, Darvill, & Albersheim, 1985). Arabinose is often found as long, branched chains linked by α -(1 → 5) and α -(1 → 3) linkages. Galactan side chains are usually short chains consisting of β -(1 → 4) bonds as well as single residues. In addition, the presence of glucuronosyl or 4-O-methyl-glucuronosyl residues as the termination of side chains has been reported

(Yapo, 2011). Rhamnogalacturonan II (RGI) is characterized by a complex structure with homogalacturonan as the backbone and complex side chains with various neutral sugars (O'Neill, Ishii, Albersheim, & Darvill, 2004). Depending on their content of methyl groups, pectins form gels under different conditions. For a degree of methylation (DM) > 50 %, gelation occurs in the presence of high sugar concentrations (55–75% (w/w) sucrose) at low pH (below the pectin's pKa value of 3.5) to obtain undissociated carboxyl groups for hydrogen bonds (Einhorn-Stoll, 2018). At DM < 50 %, pectins form networks in the presence of divalent and trivalent ions (most often Ca²⁺) in a pH range of 2–6 (Gawkowska, Cieřła, Zdunek, & Cybulska, 2019).

The content of individual pectin domains, as well as the composition and length of the side chains, vary depending on the plant source and the method of extraction (Kaczmarek, Pieczywek, Cybulska, & Zdunek, 2022). A sequential (stepwise) extraction that allows obtaining different pectin fractions with different structures and properties is commonly used (Cybulska, Zdunek, & Kozioł, 2015; Posé, Kirby, Mercado, Morris, & Quesada, 2012). Structural differences among pectin fractions have been demonstrated using atomic force microscopy (AFM) (Cybulska

Abbreviations: AIR, alcohol-insoluble residue; Ara, arabinose; DASP, diluted alkali-soluble pectin fraction; GalA, galacturonic acid; Gal, galactose; HG, homogalacturonan; RGI, rhamnogalacturonan I; RGI, rhamnogalacturonan II; Rha, rhamnose; WSP, water-soluble pectin fraction.

* Corresponding author.

E-mail address: a.zdunek@ipan.lublin.pl (A. Zdunek).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138869>

Received 16 June 2023; Received in revised form 13 February 2024; Accepted 25 February 2024

Available online 27 February 2024

0308-8146/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

et al., 2015; Zdunek, Koziol, Pieczywek, & Cybulska, 2014). When water is used as a solvent, the pectin fraction usually contains small molecules that are loosely linked to the cell wall. Then, a calcium chelator extracts the pectin domains that are ionically linked to the cell wall of the highly branched structure. A diluted alkali-soluble pectin fraction (DASP), extracted by sodium carbonate, is obtained after depleting water and calcium chelator-soluble pectins from cell walls. DASP is then considered the pectin that is covalently linked to the cell wall and it has been studied because of its characteristic self-assembled structure network on mica (used as a substrate for AFM imaging), which disintegrates during postharvest ripening (Cybulska et al., 2015). Extensive analyses have been conducted on the molecular structure of DASP, using atomic force microscopy as well as molecular dynamics simulations (Pieczywek, Koziol, Plaziński, Cybulska, & Zdunek, 2020). Modeling studies have confirmed that rhamnose interspersions create kinks (ca. 118°) in linear homogalacturonan (Rees & Wight, 1971). The kinks may affect the crosslinking properties of DASP, and thus its gelling properties, as the greater mobility of linear segments allows for an increase in the degree of interaction with other molecules. In addition, it is well known that structural properties are a key aspect that determines the functionality and potential use of polysaccharides. The physicochemical properties, molecular weight, viscosity, and other rheological properties of pectins affect the textural character of pectin-based products. Therefore, the study of DASP will provide a better understanding of the structure-related rheology of pectin. The yield and structure of pectin are also related to their source (Zdunek, Pieczywek, & Cybulska, 2021). Pectins extracted from different sources are widely used as thickeners and gelling and stabilizing agents in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries (Lara-Espinoza et al., 2021). Although citrus peel is the most important source of pectin, apples and carrots are also interesting alternatives because of the potential valorization of the pomace from the juice industry. The interest in using apples and carrots as pectin sources is sparked by their present and potential applications in the European food industry for juice production. Apples are the most common fruits used for concentrated juice production which, together with apple pomace, is the main component of many fruit-based products. Carrot and carrot-based juices are considered to have many health benefits. Processed carrot is also a popular ingredient in vegetable-based products, and their growing consumption requires an understanding of the properties of their components. Therefore, a comparison of fruit- and vegetable-derived pectin can provide valuable knowledge for designing new food products, especially novel products such as meat substitutes or special foods targeted to infants or the elderly.

In this experiment it is hypothesized that the specific molecular structure of DASP depends on the plant source and determines their rheological properties in solution. Therefore, the goal of this study was to determine the relationship between the molecular structure and rheological properties of this pectin fraction extracted from apple and carrot to elucidate their natural differences and to provide the knowledge needed for the valorization of the pomace by-products. To broadly characterize and compare the structure and functionality of the pectins, chemical analysis, AFM imaging with image analysis, and rheological and molecular measurements of samples extracted in the same way were performed.

2. Materials and methods

2.1. Cell wall material

The research materials were apples cv. Najdared (*Malus domestica* Borkh.) and carrots cv. Brava (*Daucus carota* subsp. *sativus*). The apples and carrots were harvested in Poland in October 2020 and then stored in a cold room at 2 °C and normal atmosphere for two days until preparation. Pulp was prepared from 102 kg of raw apples and 34 kg of raw carrots. Both were peeled and sliced. The juice was pressed using a juice presser, and the remaining pomace was homogenized. Then, the

prepared material was frozen at −18 °C for further analysis. The alcohol-insoluble residue (AIR) was prepared in an identical way for both products, according to the method described by Renard (2005), with some modifications according to Gawkowska, Cybulska, and Zdunek (2018). The pulp was mixed with ~70 % EtOH (ethanol, pure, p.a., Stanlab, Lublin, Poland) with a solid-liquid ratio of 1:10 (w/v) for 15–30 min. Then, the mixture was passed through a nylon filter and the residue was stirred again with EtOH. The procedure was repeated until a negative result was obtained in the phenol-sulfuric acid test (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956), confirming the absence of sugar in the pulp. For the test, 25 µL of 80 % phenol was added to 1 mL of filtered alcohol residue, and then 2.5 mL of 96 % H₂SO₄ (sulfuric acid, 95–98 %, Sigma Aldrich, Merck Life Science Sp.z o.o., Poznan, Poland) was added. The sugar-free samples remained colorless, whereas the sugar-containing samples developed a dark color (Cybulska et al., 2022). Next, the sample was washed with 96 % ethanol and subsequently with acetone (pure, p.a., Stanlab, Lublin, Poland), and dried at 45 °C.

2.2. Extraction of the DASP fraction

A sequential extraction was performed according to the method proposed by Redgwell and Selvendran (1986), with some modifications based on previous studies (Gawkowska et al., 2018; Pieczywek et al., 2020; Posé et al., 2012). The scheme of the extraction is presented in Fig. 1. The AIR was stirred in deionized water (at a solid: liquid ratio of 1:9, w/v) for 24 h at 21 °C and then centrifuged (5000 rpm). The supernatant was collected as a water-soluble pectin (WSP) fraction. The sediment was mixed with 0.1 M CDTA (*trans*-1,2-diaminocyclohexane-*N,N',N'*-tetraacetic acid, min. 99 %, p.a., Roth, Chemat, Gdańsk, Poland) at pH 6.5 and stirred at 21 °C for 24 h. The role of CDTA is to solubilize pectins that are ionically bound to the cell wall. After centrifugation, the supernatant was separated as a chelator-soluble pectin (CSP) fraction. To the residue, 0.05 M Na₂CO₃ (sodium carbonate, purity ≥99.5 %, p.a., Sigma-Aldrich, Merck Life Science Sp.z o.o., Poznan, Poland) and 20 mM NaBH₄ (sodium borohydride, purity ≥98.0 %, p.a., Sigma-Aldrich, Merck Life Science Sp.z o.o., Poznan, Poland) were added and stirred for 24 h at 21 °C. NaBH₄ is added as a reductor to alkaline solutions of polysaccharides to prevent the base peeling of these compounds (Wang, Azhar, Lindström, & Henriksson, 2015). The final extraction with Na₂CO₃ allows the release of pectins that are covalently bound to the wall by ester linkages. The diluted alkali soluble pectin (DASP) fraction was collected as a supernatant after centrifugation and dialyzed in an open system using ZelluTrans/ROTH® membranes (Carl Roth GmbH & Co. KG, Germany; MWCO 3500 Da) and then the crude extract was lyophilized. The DASP fractions from apples and carrots were extracted with a yield of 0.44 % and 0.61 % of fresh weight (25.58 % and 21.30 % of dry weight), respectively.

2.3. Monosaccharide composition

The monosaccharide composition of the samples was determined according to (Zhang, Hu, Wang, Liu, & Pan, 2018), with some modifications according to Cybulska et al. (2022). Methanolysis of 2 mg of DASP with 2 M methanolic HCl (hydrogen chloride-methanol solution, ~1.25 M HCl (T), for GC derivatization, LiChropur™) was conducted at 80 °C for 72 h. This method has been reported as an effective method of mild hydrolysis of glycosidic linkages in pectin and hemicelluloses (Bertaud, Sundberg, & Holmbom, 2002). Then, after HCl removal, the sample was hydrolyzed with 2 mL of 3 M trifluoroacetic acid (purity ≥99.0 %, p.a., Merck Life Science Sp. z o.o., Poznan, Poland) at 100 °C for 7 h. According to Bertaud et al. (2002), it was found as the best compromise between efficient cleavage of glucuronosyl linkages and low degradation of the monomers released. The released monosaccharides and uronic acids were derivatized with PMP (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (purity 99 %, p.a. Thermo Scientific Chemicals, Waltham, MA USA) by adding 1 mL of water and 50 µL of 0.3 M

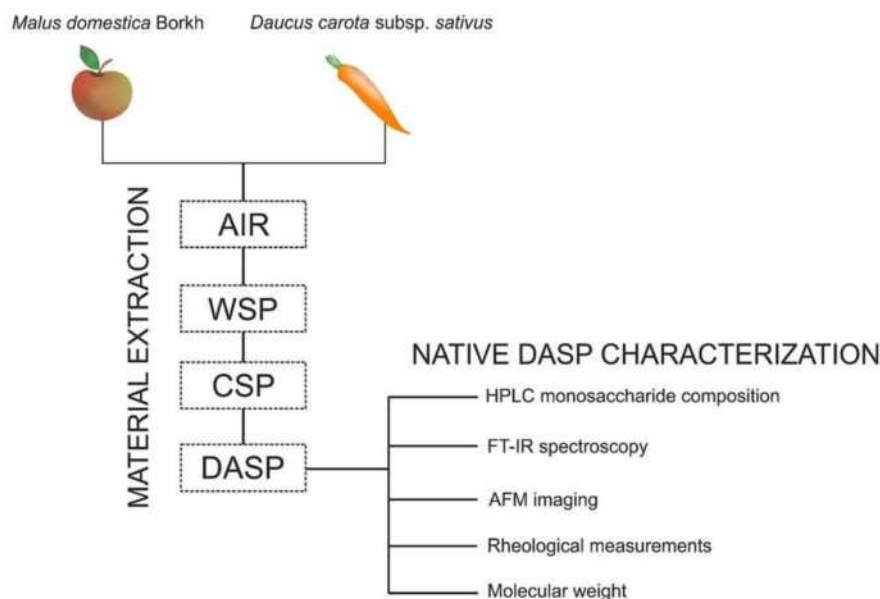


Fig. 1. Scheme of the experiment (AIR, alcohol insoluble residue; WSP, water-soluble pectin; CSP, chelator-soluble pectin; DASP, diluted alkali-soluble pectin; HPLC, high-performance liquid chromatography; FT-IR, Fourier-transform infrared spectroscopy; AFM, atomic force microscopy).

sodium hydroxide microgranules (pure p.a., Avantor Performance Materials S.A., Gliwice, Poland), mixing, and finally adding 50 μL of a 0.5 M solution of methanolic PMP. After incubation at 70 $^{\circ}\text{C}$ for 60 min, the sample was cooled, neutralized with 50 μL of 0.3 M hydrochloric acid (35–38 % pure, p.a., Avantor Performance Materials S.A., Gliwice, Poland), and extracted with chloroform (purity ≥ 99.5 %, HPLC Grade, Thermo Scientific Chemicals, Waltham, MA USA). Then, 20 μL of the filtered PMP-derivatives were injected into an HPLC system (Sykam GmbH, Gewerbing, Germany) equipped with a Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm, 5 μm) combined with an Agilent Eclipse XDB-C18 guard column (4.6 mm i.d. $\times$ 12.5, 5 μm), and S 3350 PDA detector (Sykam GmbH, Gewerbing, Germany). Chromatographic separation of the components was conducted at 30 $^{\circ}\text{C}$, using a mobile phase composed of A (0.1 M phosphate buffer (pH 6.7)) and B (a 50 % (v/v) solution of 0.1 M phosphate buffer in acetonitrile) at a ratio of A:B of 69:31 % (v/v) and a flow rate of 1.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Detection was carried out at a wavelength of 246 nm. Samples were analyzed in triplicate. An identical treatment was applied for monosaccharides and uronic acid standards (arabinose, fucose, galactose, galacturonic acid, glucose, glucuronic acid, mannose, rhamnose, and xylose), which were purchased from Sigma-Aldrich (Merck Life Science Sp.z.o.o., Poznan, Poland).

The molar percentages of the HG and RG-I regions of pectin were calculated using the definitions below (M'sakni et al., 2006).

$$\begin{aligned}\text{HG (mol\%)} &= \text{GalA (mol\%)} - \text{Rha (mol\%)} \\ \text{RG-I (mol\%)} &= 2\text{Rha (mol\%)} + \text{Ara (mol\%)} + \text{Gal (mol\%)}\end{aligned}$$

2.4. FT-IR spectroscopy

The FT-IR spectra of the dialyzed and dried DASP samples were collected on a Nicolet 6700 FT-IR instrument (Thermo Scientific, Madison, WI, USA) fitted with the Smart iTR ATR sampling accessory. All samples were analyzed under the same conditions, according to the

method previously described by Chylińska, Szymańska-Chargot, and Zdunek (2016). The spectra were collected in the range of 4000–650 cm^{-1} with a spectral resolution of 4 cm^{-1} . For each source material, measurements were performed with five repetitions with 200 scans each. Baseline corrections were performed using the OMNIC software (Thermo Scientific, Madison, WI, USA). The final average spectrum was calculated and normalized to 1.0 at 1013 cm^{-1} , using OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

2.5. Determination of DE by titration

The degree of esterification (DE) of pectin was determined by the method in the Food Chemical Codex (Food Chemical Codex, 1981) and USP 26 NF 21 (2003), as described by Wai, Alkarkhi, and Easa (2010) with slight modifications. The dried sample (500 mg) was soaked with 2 mL of 96 % EtOH and dissolved completely in 100 mL of deionized water. Five drops of 1 % phenolphthalein ethanol solution were added to the mixture as the indicator, followed by titration with 0.5 M sodium hydroxide (sodium hydroxide microgranules, p.a., Avantor, Poland), and the result was recorded as the initial titer. Then, 10 mL of 0.5 M sodium hydroxide was added. The sample was vigorously shaken and allowed to stand at room temperature. After 15 min, 10 mL of 0.5 M HCl was added and the sample was mixed until the pink color disappeared. Phenolphthalein was added and the solution was titrated with 0.5 M sodium hydroxide until a faint pink color was formed and persisted after vigorous shaking (the end-point). This titration volume was recorded as the saponification titer (the final titer). The analysis was performed in triplicate.

The DE was calculated using Eq. (1):

$$\%DE = \frac{\text{the final titer [mL]} - \text{the initial titer [mL]}}{\text{the initial titer [mL]} + \text{the final titer [mL]}} \times 100 \quad (1)$$

2.6. AFM imaging analysis

The lyophilized DASP fraction was dissolved in HPLC-grade water (Sigma-Aldrich Merck Life Science Sp. z o.o., Poznań, Poland) to a concentration of $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. 30 μL of the sample was distributed on freshly cleaved mica sheets (EMS, Hatfield, PA, USA) using a POLOS SPIN150i NPP spin coater (SPS-Europe B.V., Putten, the Netherlands). The samples were dried in a desiccator at 22°C overnight prior to AFM observation. The images were captured using a Multimode 8 with a NanoScope V controller (Bruker, Billerica, MA, USA) with a ScanAsyst-Air-HR cantilever (Bruker, Billerica, MA, USA), according to the method previously described by Cybulska et al. (2015), with slight modifications. The experiment was performed in ambient air at room temperature ($\sim 21^\circ\text{C}$). A rectangular area of $2 \times 2 \mu\text{m}$ was scanned with a resolution equal to 1024×1024 points. 20 images were collected per source.

Preliminary processing of the images was carried out using Gwyddion 2.52 (Nečas & Klapetek, 2012). The extraction of the skeletal structures of the molecules and the calculations of geometrical parameters were performed using Matlab R2011a (MathWorks, Natick, MA, USA). Objects on the AFM images were classified into two categories of the “hairy” and the “smooth” molecules, regarding the presence of branches in the chains (Fig. 3e). A single branch was defined as the section between the nearest branching points (red dots on Fig. 3e) or to the end of the molecule. The total length of “hairy” molecule as the sum of their branches, the length of “smooth” molecule and the length of a single branch were determined. Moreover, the average number of branches per molecule were determined.

Fibril tracking and analysis were performed with the FiberApp software to estimate the persistence length of the DASP molecules with the mean-squared end-to-end distance (MSD) approach. The persistence length is a parameter that reflects the rigidity of a polymer and is defined as the length over which correlations in the direction of the tangent are lost. The persistence length is estimated from AFM topological images of semiflexible polymers in the 2D conformation, using the bond correlation function (Zdunek et al., 2021). The MSD method for a worm-like chain model in 2D is characterized by the theoretical dependence represented in Eq. (2):

$$\langle R^2 \rangle = 4\lambda \left[l - 2\lambda(1 - e^{-\frac{l}{2\lambda}}) \right], \quad (2)$$

where λ is the persistence length and R is the direct distance between any pair of segments along a contour separated by an arc length l (Usov & Mezzenga, 2015).

2.7. Rheological properties

Rheological measurements were carried out using a Discovery Hybrid Rheometer HR-1 (TA Instruments, New Castle, PA, USA). A cone plate sensor (40 mm of diameter and 2.007° angle) with a 0.5 mm gap between the cone apex and the plate. Temperature was stabilized at 20°C . DASP samples were dissolved in deionized water with a concentration of 6 % (m/v), vortexed (3000 rpm) and then mixed overnight.

The viscoelastic properties of DASP solutions were investigated using the oscillatory test, which describes the amplitude and frequency dependences of the storage modulus (G') and loss modulus (G''). In this test, the deflection of the measuring system (the amplitude sweep) is increased step-wise from one measuring point to the next while keeping the frequency at a constant value. In this experiment, 1 mL of sample were subjected to oscillatory deflection at the frequency of 0.5 Hz and logarithmic strain amplitude sweep in the range of 0.1–100 % (25 points per decade).

The flow curves, plotted as the shear stress vs. shear rate, were measured over the variable shear rate of $10\text{--}600 \text{ s}^{-1}$; $600\text{--}10 \text{ s}^{-1}$ (logarithmic sweep, 15 points per decade). The viscosity was determined at

the shear rate of 10 s^{-1} . Ostwald de Waele's and Herschel-Bulkley's models were fitted to the shear stress vs. shear rate curves to determine the consistency index K and the flow behavior index n . The power-law model of Ostwald de Waele's is described by Eq. (3):

$$\sigma = K\dot{\gamma}^n, \quad (3)$$

where σ is the shear stress, K is the consistency index ($\text{Pa} \cdot \text{s}^n$), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (s^{-1}), and n is the flow behavior index. The Herschel-Bulkley's model is described by Eq. (4):

$$\sigma = \sigma_0 + K\dot{\gamma}^n, \quad (4)$$

where σ is the shear stress, σ_0 is the initial shear stress (Pa), K is the consistency index ($\text{Pa} \cdot \text{s}^n$), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (s^{-1}), and n is the flow behavior index.

The intrinsic viscosity indicates the relative increase in the viscosity of the solution in relation to the pure solvent. DASP was dissolved in deionized water at various concentrations from $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The viscosity of the solutions (0.85 mL) was measured using a variable shear rate of $10\text{--}400 \text{ s}^{-1}$; $400\text{--}10 \text{ s}^{-1}$ (logarithmic sweep; 25 points per decade). The intrinsic viscosities (η) were determined by extrapolating to a zero concentration according to Eq. (5) (Huggins, 1942):

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_H[\eta]^2 c \quad (5)$$

where η_{sp} is the specific viscosity that can be obtained from the relative viscosity ($\eta_{\text{solution}}/\eta_{\text{solvent}}$), c is the concentration of the polymer solution, and k_H is the Huggins constant.

All rheological measurements were performed in 10 replicates.

2.8. Static light scattering

Static light scattering (SLS) method with Debye plot was used to determine the weight-averaged molar mass (MW) of DASP (Hiemenz & Lodge, 2007; Puskás, Szemjonov, Fenyvesi, Malanga, & Szente, 2013). Low concentrations of DASP dispersions (0.006–0.100 % m/v) were prepared by diluting the initial stock solution (2.0 % m/v) with ultrapure water (Type 1; Direct-Q® 3 UV Water Purification System, Merck Millipore, Merck Life Science Sp. z o.o., Poznań, Poland). Samples were initially mixed using a vortex (Velp Scientifica, Usmate, Italy) and next by a rotator (neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Germany) for 24 h at $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Then, the refractive indexes of the ultrapure water (solvent) and solutions were determined (Pocket Refractometer, RI 1.3306–1.5284, Atago Ltd., Tokyo, Japan) at 20°C . Toluene (analytical standard, purity ≥ 99.9 % by GC; Merck Life Science Ltd., Poznań, Poland) was used as a standard. The single-angle (173°) light (633 nm) scattering measurements were performed using a Zetasizer Nano ZS apparatus (Malvern Ltd., Malvern, UK) at a minimum 12 sub-runs, in triplicate. The MW and second virial coefficient of a given polysaccharide were automatically calculated by the software based on light scattering analysis of a series of aqueous solutions with increasing DASP concentration.

2.9. Statistical analysis

All analyses were performed at least in triplicate. Statistical tests (t -Student test) to determine significant differences between the samples were performed using the “stats” package (version 4.1.2.) of R (R Core Team, 2013). Statistical significance was evaluated at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Chemical composition

DASP was extracted with the yield value of 0.44 % and 0.61 % for apple and carrot, respectively, in relation to the fresh weight. Taking

into account that the total pectin content amounts to 1–1.5 % in fresh apple (Thakur, Singh, & Handa, 1997), obtained DASP content may be considered significant. In relation to dry weight, yield values were 25.58 % and 21.30 % for apple and carrot, respectively. For comparison, a typical yield of total pectin fraction from citrus peel in relation to dry weight may be about 20–30 % (Hou, Chen, & Ye, 2021). To evaluate significance of the obtained yield, it is also important to consider that the juice industry produces pomace from both sources that may be further fractionated to different polysaccharides, including DASP.

Monosaccharide analysis (Table 1) revealed that DASP was mainly composed of galacturonic acid, galactose, arabinose, and rhamnose in different proportions. Comparing the above values, one may see that apple DASP contained more galacturonic acid and arabinose, whereas carrot DASP contained a higher amount of galactose. Moreover, the mannose content was more than twice as high for apple pectin than for carrot pectin (1.9 mol% and 0.8 mol%, respectively). Xylose was present in the apple fraction at 2.2 mol% but it was not present in carrot DASP. Other sugars detected in the apple and carrot DASP fractions in small amounts were glucuronic acid, glucose, and fucose.

It is worth noting that carrot DASP contained significantly ($p < 0.05$) more rhamnose than apple DASP, which may reflect the greater contribution of the RG-I regions to the carrot pectin. The high content of galactose in carrot DASP indicates a large number of galactan side chains, whereas the lower arabinose content is related to the lower presence of arabinan or arabinogalactan side chains in the RG-I region. By contrast, the apple fraction was rich in arabinose side chains. Based on the calculated content of the individual regions as well as the extent of branching, we can assume that apple DASP is composed of a higher amount of homogalacturonan, whereas carrot DASP is richer in rhamnogalacturonan I. The contribution of the RG-I domain of pectin is also reflected by the molar ratio of Rha/GalA. The value of this parameter, if it is in the range 0.05–1, indicates the presence of the RG-I pectin domain in the sample (Yang, Mu, & Ma, 2018). Thus, the ratios of 0.06 and 0.17 obtained for apple and carrot, respectively, confirm the presence of RG-I regions in both sources. The ratio of (Gal + Ara)/Rha, which reflects the branching extent in the “hairy” region, was 9.53 and 5.49 for apple and carrot DASP, respectively. The higher value for apple DASP indicates the presence of longer branches. The ratio of (Gal + Ara)/Rha for berry pectin obtained from different sources and extraction methods varied from 0.7 to 5.7 (Muñoz-Almagro et al., 2021), and was

Table 1
Monosaccharide composition and characterization of native diluted alkali-soluble pectin (DASP) in apple and carrot.

	DASP source	
	Apple	Carrot
<i>Monosaccharide composition (mol%)</i>		
Galacturonic acid	57.3 ± 2.6*	43.3 ± 2.2*
Arabinose	24.9 ± 1.6*	18.2 ± 0.9*
Galactose	9.4 ± 0.4*	27.9 ± 0.4*
Rhamnose	3.6 ± 0.2*	8.4 ± 1.8*
Xylose	2.2 ± 0.5	n.d.
Mannose	1.9 ± 0.5*	0.8 ± 0.3*
Glucuronic acid	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.2
Glucose	0.3 ± 0.0	0.7 ± 1.3
Fucose	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1
<i>Contribution to particular regions and branching</i>		
HG (mol%)	53.70	34.90
RG-I (mol%)	41.50	62.90
Rha/GalA	0.06	0.17
(Gal + Ara)/Rha	9.53	5.49
DE (%)	0.00	0.00

The asterisks indicate statistically significant differences (*t*-Student test, $p < 0.05$). DASP, diluted alkali-soluble pectin fraction; HG, homogalacturonan; RG-I, rhamnogalacturonan I; Rha, rhamnose; GalA, galacturonic acid; Rha/GalA, molar ratio of rhamnose to galacturonic acid; Gal, galactose; Ara, arabinose; (Gal + Ara)/Rha, molar ratio of the sum of galactose and arabinose to the rhamnose content; DE (%), degree of esterification; n.d., not detected.

up to 25–64 for highly branched RG-I domains extracted from potato pulp (Yang et al., 2018). Thus, our sequential extraction preserved the short branches in DASP extracted from both sources.

3.2. Analysis of FT-IR spectra

The FTIR spectra collected over the entire wavelength range are displayed in Fig. 2A. FT-IR analysis in the region of 4000–800 cm^{-1} exhibited the characteristic bands for DASP pectin for both materials (Fig. 2B). Because the structure of the polysaccharide skeleton determines the shape of the spectrum, the spectra of both materials showed similar characteristic bands. Nevertheless, differences in the content of individual monosaccharides, and thus the structure of the side chains, affected the intensity of the bands.

Two characteristic peaks outside the fingerprint region are located in the wavelength range of 3600–3000 cm^{-1} and 2950 cm^{-1} . The first one corresponds to O–H stretching absorption due to inter- and intra-molecular hydrogen bonding. The higher band frequency for carrot DASP may indicate stronger hydrogen bonds with the galacturonic acid polymer. The band around 2950 cm^{-1} , partially overlapping with the O–H adsorption broad band, corresponds to C–H absorption, which include CH, CH₂, and CH₃ stretching and bending vibrations. The broad band with a maximum at 1595 cm^{-1} and the peak at 1407 cm^{-1} were assigned to antisymmetric and symmetric carboxylic anion stretching vibrations, respectively. Typically, the antisymmetric stretching vibration of COO[−] is observed in the wavelength range of 1630–1600 cm^{-1} ; however, as previously noted, shifts are possible in samples of natural origin (Cieśla, Koczańska, Pieczywek, Cybulska, & Zdunek, 2021). The absence of peaks in the range of 1745–1700 cm^{-1} – which originates from the vibration of esterified groups – suggests the lack of methyl esters in the studied fraction of pectin, as a result of the elimination of ester linkages of pectin during alkaline extraction (Posé et al., 2012). Zero degree of esterification was confirmed by the titration method (Table 1). Similar results were previously reported for strawberry DASP by alkaline de-esterification and HPLC quantification (Cybulska et al., 2022). The signal related to the ring vibration of pectin appears at 1323 cm^{-1} , whereas the band with the maximum at 1240 cm^{-1} is assigned to (C–O) stretching vibrations in the pectin molecule. The band at 1200–800 cm^{-1} is the fingerprint region dominated by ring vibrations overlapped with stretching vibrations of (C–OH) side groups and the (C–O–C) glycosidic bond vibration in polysaccharides (Kacuráková, Capek, Sasinková, Wellner, & Ebringerová, 2000) and confirms the presence of several neutral sugars in the sample (Cybulska et al., 2015). The band at 1140 cm^{-1} is associated with the C–O–C stretching vibration in the glycosidic linkage (Chylińska et al., 2016). The peaks at 1093 cm^{-1} and 1013 cm^{-1} suggest a high amount of uronic acid in both materials, with a higher intensity at 1093 cm^{-1} for apple DASP, which is in line with the sugar composition analysis (Table 1). The absorbance bands at about 1075 and 1045 cm^{-1} indicate the presence of the rhamnogalacturonan I pectic domain in the studied fraction (Kacuráková et al., 2000). The peak assigned to galactose units showed maximum absorbances at 1074 cm^{-1} and 953 cm^{-1} (Posé et al., 2012). Moreover, the former absorbance was more intensive for carrot DASP, which confirms the sugar composition (Table 1). The band at 1045 cm^{-1} , associated with arabinose units, appears as a shoulder of the peak at 1013 cm^{-1} for pectin from both sources. In addition, non-resolved bands in the anomeric region at about 890–850 cm^{-1} indicate the presence of galactopyranose and arabinofuranose units in both samples (Kacuráková et al., 2000).

3.3. Structure of DASP on mica

The DASP molecules from both sources, deposited on a mica surface, exhibited similar structural features. Both pectins formed separated rod-like structures interrupted by local bend and branch points (Fig. 3), which agrees with previous studies (Cybulska et al., 2015; Pieczywek

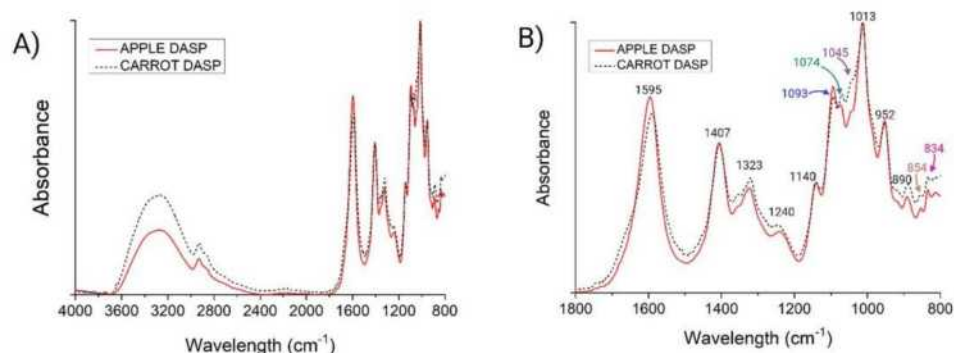


Fig. 2. ATR-FTIR absorbance spectra of the diluted alkali-soluble pectin fraction (DASP) extracted from apple (red filled line) and carrot (black dashed line) in the 4000–800 cm^{-1} (A) and 1800–800 cm^{-1} (B) regions. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

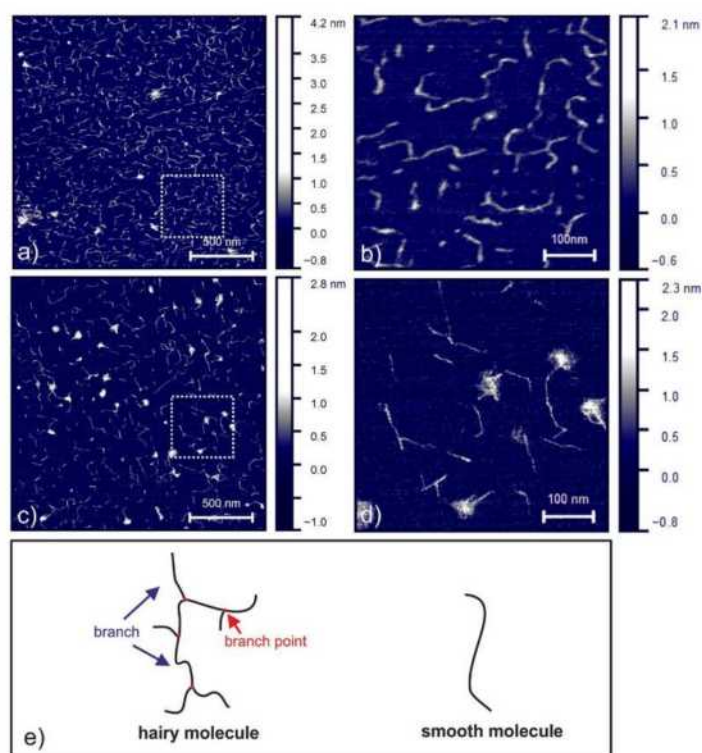


Fig. 3. Atomic force microscope (AFM) images of the diluted alkali-soluble pectin fraction (DASP) fraction obtained from apple (a, b) and carrot (c, d) on mica. Images b and d show sections of images a and c, respectively, with a size of $0.5 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$. Scheme e shows the detected geometrical structures of the pectin molecules. The total length was calculated as the sum of the lengths of all branches per molecule.

et al., 2020). In several locations, amorphous aggregates concentrated around the linear molecules are visible, particularly for carrot DASP (Fig. 3d). Apple pectin seemed to be more densely distributed on the mica surface. The fibers also differed in thickness, with molecules from

apples appearing to be thicker than those from carrots, considering both the lateral diameter and height of the molecules.

“Smooth” and “hairy” structures were distinguished from the AFM height images through image analysis (Table 2, Fig. 3e). For the

Table 2

Structural analysis of molecules of the diluted alkali-soluble pectin fraction (DASP) from apple and carrot. Structures and characterization were distinguished from the atomic force microscope height images through image analysis.

Structure type	Parameter	Unit	DASP source	
			Apple	Carrot
Smooth	Total length	nm	68.5 ± 45.0 (n = 2760)	66.2 ± 38.3 (n = 2187)
Hairy	Total length	nm	287.3 ± 229.1* (n = 1034)	188.6 ± 124.5* (n = 612)
	Branch length	nm	45.6 ± 18.7*	36.2 ± 13.8*
	Branch number		6.2 ± 3.4*	5.1 ± 2.1*
All	Total length	nm	128.1 ± 156.0* (n = 3794)	92.9 ± 84.2* (n = 2798)
	Branch length	nm	62.3 ± 40.9*	59.6 ± 36.6*
	Branch number		2.4 ± 3.1*	1.9 ± 1.9*
	Persistence length	nm	42.8 ± 5.3	40.1 ± 4.9

The asterisks indicate statistically significant differences (*t*-Student test, *p* = 0.05); n is the number of analyzed objects.

“smooth” (unbranched) molecules, there were no significant differences (*p* > 0.05) between the lengths of the pectin molecules from apple and carrot. The average total length of the “smooth” molecules was 68.5 nm for apple and 66.2 nm for carrot. However, statistically significant differences (*p* < 0.05) were noted for parameters (length, number of branches per molecule, and the length of the branches) of the “hairy” molecules between these two sources. The apple “hairy” DASP fraction was characterized by higher values of these structural parameters. The average “hairy” fiber length for apple DASP was 287.3 nm, whereas, for carrot DASP, the length was shorter by 100 nm (i.e., 188.6 nm). A single branch of apple DASP had an average length of 45.6 nm, whereas, for carrot DASP, it was 36.2 nm. Pectin molecules extracted from apples were also more branched (i.e., the average number of branches per apple pectin molecule was 6.1, whereas, for carrot pectin, this number was 5.1). The results of image analysis of AFM images are in line with the chemical composition of DASP, which showed a higher content of monosaccharides forming side branches for apples (Table 1). When “smooth” and “hairy” molecules were considered together (“all” in Table 2), differences in the structural features between apple and carrot pectin appeared less distinct but the apple DASP fraction still exhibited greater complexity in terms of length and branching (i.e., the length and number of branches per molecule).

The linear flexibility of the polymer chains may be represented in terms of the persistence length of equivalent worm-like chains. Theoretically, ideal random coils have a persistence length of zero, whereas, for extra-rigid rods, it approaches infinity. Experimental values ranged from 1 to 200 nm for pullulan (random coil) and DNA or xanthan (a particularly rigid rod), respectively. For different pectin sources, the reported persistence length values are usually in the range of 4.5–15 nm, indicating a semi-flexible conformation (Morris, Adams, & Harding, 2014). In our study, the average persistence length of DASP was 42.8 nm for apple and 40.1 nm for carrot, and these values were greater than those usually reported for various pectin domains. A possible reason for these differences is the use of the AFM method. Generally, the persistence length is deduced experimentally, from the relationship between the chain size and molar mass, as well as by performing simulations (Zhang et al., 2019). Most of the results reported in the literature have been determined on the basis of data sets of intrinsic viscosity and molar mass, using numerous methods (Morris et al., 2014; Reynolds, Denman, Binhamad, & Morris, 2020). Missing the mass factor or behavior in the solution is a drawback of evaluating the persistence length using topological atomic force microscope images. On the other hand, previous research has reported that the persistence length of homogalacturonan is 9.8 nm for pectin extracted from sugar beet (Morris, Ralet, Bonnin, Thibault, & Harding, 2010) and 13.5 nm as a result of modeling

simulations (Cros, Garnier, Axelos, Imbert, & Pérez, 1996). Pectin richer in RG-I domains behaves in a flexible manner because the reported values for native, debranched, and de-esterified RG-I are in the range of 1.3–1.6 nm (Ralet et al., 2008). The persistence length measured in the current study (ca. 40 nm) suggests that DASP molecules spin-coated on mica behave as stiff molecules. This structural feature (i.e., rod-like molecules) can be seen in Fig. 3 and was also previously reported for DASP molecules extracted from other fruits (Cybulska et al., 2015; Pieczywek et al., 2020), regardless of whether the molecules were spin-coated or dried from a solution for the purpose of embedding on mica.

3.4. Rheological and molecular properties

A 6 % (m/v) aqueous solution of DASP was subjected to oscillatory measurements with varying oscillation stress. Representative examples of mechanical spectra of the samples are presented in Fig. S1. Both tested solutions exhibited a predominance of elastic properties and gel-like behavior ($G' > G''$), indicating a permanent network structure in the solutions (Table 3). Apple DASP showed greater structural strength as indicated by its greater elastic modulus G' , whereas carrot sample was characterized by a higher linear viscoelasticity limit, which defines the limiting value of the strain that induces reversible structural changes. The loss factor, represented by $\tan\delta$, describes the viscoelasticity and gelling properties. Because the value of this parameter is lower for apple pectin, we can assume that the obtained solution has a more elastic character compared to the carrot pectin solution. Moreover, the flow point, which indicates the strain needed to make a substance flow, was higher for carrot DASP (Table 3). The rheological behavior is related to the internal structure of the material, and by taking into account the linear viscoelasticity limit and flow point, we can suspect that a higher strain threshold is needed to disrupt the structure of the carrot pectin solution.

Flow curves (shear stress vs. shear rate) for both samples (Fig. S2) were fitted to the power-law (Ostwald de Waele's) model and Herschel-Bulkley's model with a determination coefficient R^2 of 0.99 for both models (Table 3). The consistency coefficient (K) and flow behavior

Table 3

Rheological characterization and weight-averaged molar mass of native diluted alkali-soluble pectin (DASP). Viscoelastic properties described by parameters obtained from oscillatory measurements. Flow behavior plots (shear stress vs. shear rate) fitted to the Ostwald de Waele's model and Herschel-Bulkley's model.

Parameter	Unit	DASP source	
		Apple	Carrot
G'	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$	283.65 ± 146.90*	176.24 ± 92.97*
G''/G'		8.68 ± 1.76*	6.96 ± 0.68*
$\tan\delta$		0.11 ± 0.02	0.14 ± 0.01
Flow point	%	7.57 ± 3.80	9.15 ± 2.10
Linear viscoelasticity limit	%	2.49 ± 0.67*	4.95 ± 1.94*
Power law model			
K	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	0.60 ± 0.37*	1.80 ± 1.24*
n		0.68 ± 0.08	0.57 ± 0.15
Herschel Bulkley's model			
G_0	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$	1.34 ± 1.17	2.67 ± 1.87
K	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	0.33 ± 0.12*	0.77 ± 0.53*
n		0.75 ± 0.05	0.67 ± 0.12
Viscosity (at 10 s ⁻¹)	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	1.10 ± 1.00*	0.46 ± 0.43*
Molecular weight	$\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$	895 ± 76	886 ± 99
Intrinsic viscosity	$\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	194.91	186.79

The asterisks indicate statistically significant differences (*t*-Student test, *p* = 0.05); G' , elastic (storage) modulus; G'' , viscous (loss) modulus; $\tan\delta$, loss factor; K , consistency coefficient; n , flow index; G_0 , initial shear stress.

index (n) were used to express fluid consistency and non-Newtonian fluid behavior under shear strain. Because $n < 1$, both samples are classified as pseudoplastic fluids (shear-thinning), which means that their apparent viscosity decreases with an increasing shear rate (Fig. S2). The consistency index (K) is related to the viscosity of the solutions. A higher value of K was observed for the carrot DASP sample, which, together with the lower value of the coefficient n , indicates a more pseudoplastic behavior and lower viscosity for the carrot pectin sample, although there are only minor differences between the n parameters of the two sources.

There were no significant differences in the molecular weights of the studied DASP samples. A review of the RG-I-rich domains of pectin extracted from other sources revealed that their molecular mass is in the range of 50–550 kg·mol⁻¹ (Kaczmarska et al., 2022), which is lower than the MW values presented in Table 3. A direct comparison of the obtained results with the literature data is difficult because of the different methods and experimental conditions applied. The quoted literature values of MW were mainly the results of chromatographic measurements performed in the presence of chelating ions and in concentrated salt solutions. The data shown in Table 3 relate to the mono-angular SLS of pure aqueous DASP dispersions. Moreover, a study reported that the molecular weight of RG-I can reach up to 2000 kg·mol⁻¹. High molecular weight values may be caused by dimerization via diferuloyl ester linkages (Yapo, 2011). Considering the values of the second virial coefficient obtained from the SLS method, both analyzed DASP fractions revealed weaker interactions with each other than with the water molecules. However, this effect was lower for the apple DASP ($A_2 = 7 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-4}$ mL·mol⁻²) than for the carrot DASP ($A_2 = 11 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-4}$ mL·mol⁻²). Hence, the apple DASP was slightly less soluble in water than the carrot DASP.

A higher MW corresponds to longer chains and more active bonding points. This leads to the formation of a permanent network structure that causes higher viscosity and elastic modulus. A decrease in the MW results in a decrease in gelation velocity and gel strength. This may explain why the gel-like solution made of apple DASP is stronger, whereas the gel-like solution from carrot-derived fraction is more resistant to mechanical disruptions. As demonstrated in a previous study, for citrus pectin, arabinose side chains play an important role in promoting the formation of a compact structure during gelling and have a positive influence on gel strength (Zheng et al., 2020; Qi et al., 2023). It is due to the water-binding capacity attributed to arabinose that promotes the connection of pectin chains through hydrophobic interactions and hydrogen bonding. Neutral sugar side chains stabilize the gel network structure through entanglement (Chen et al., 2021; Sousa, Nielsen, Armagan, Larsen, & Sørensen, 2015). It was also reported that the removal of half of the galactan chains from RG-I caused the loss of gelling capacity (Makshakova, Gorshkova, Mikshina, Zuev, & Perez, 2017). This suggests that the greater structural strength of the solution of apple DASP may be the result of the higher content of arabinose and lower content of galactose compared to carrot DASP (Table 1).

The intrinsic viscosity describes the volume occupied by individual polymer molecules in isolation. This parameter is closely related to the molecular weight and length of the polymer, and thus, the stiffness of the chain. The obtained intrinsic viscosity values (Fig. S3) were 194.91 mL·g⁻¹ and 186.79 mL·g⁻¹ for apple and carrot fraction, respectively, with Huggins coefficients of 0.75 and 0.81, respectively. These results are comparable to the typical values of intrinsic viscosity reported for pectin (80–1600 mL·g⁻¹ in the case of pectin dissolved in buffer or salt solutions) (Morris et al., 2014). DASP from both sources was characterized by a high molecular weight (MW) (>885 kg·mol⁻¹), but a slightly higher MW was measured for apple DASP. The greater intrinsic viscosity of apple DASP may be explained by greater content of HG and higher MW of apple pectin compared to carrot DASP as HG-rich pectins reveal higher solution viscosity than RG-I-rich (Belkheiri et al., 2021; Morris, Foster, & Harding, 2000). Moreover, the greater MW in apple DASP fraction may cause stronger intermolecular attraction between

pectin molecules (Kontogiorgos, Margelou, Georgiadis, & Ritzoulis, 2012). This explanation is in line also with observations that a more compact structure with a shorter hydrodynamic size or random coil conformation results in lower values of intrinsic viscosity and can be associated with a higher content of RG-I in a sample (Alba, Laws, & Kontogiorgos, 2015) as was observed for carrot DASP in the present study.

4. Conclusions

This paper described the chemical, structural, rheological, and molecular similarities and differences of the diluted alkali-soluble pectin (DASP) fraction extracted from two sources: apple and carrot. DASP from apple was richer in homogalacturonan (53.70 mol%) than rhamnogalacturonan I (41.50 mol%) while DASP from carrot contained less homogalacturonan (34.90 mol%) than rhamnogalacturonan I (62.90 mol%). Longer and more branched side chains were observed for apple DASP ((Gal + Ara)/Rha was 9.53), due to the higher arabinose content (24.9 mol% for apple DASP vs. 18.2 mol% for carrot DASP) and the lower amount of rhamnose (3.6 mol% for apple DASP vs. 8.4 mol% for carrot DASP). This observation was confirmed by observation under AFM: the length of molecules for apple was 45.6 nm vs. 36.2 nm for carrot. On the other hand, carrot contained more rhamnose (8.4 mol%), that was more than twice comparing to apple DASP, however, molecules in carrot were less branched ((Gal + Ara)/Rha = 5.49). DASP from both sources was characterized by a high molecular weight (MW) (>885 kg·mol⁻¹), but a slightly higher MW was measured for apple DASP, which agrees with the higher intrinsic viscosity and may be caused by the higher homogalacturonan (HG) content. Solutions made with DASP from both sources showed a predominance of elastic properties. However, apple DASP resulted in stronger gel-like solutions, whereas those made of carrot DASP were more resistant to mechanical disruptions. The stronger gel-like solutions made of apple DASP may be the result of the higher content of arabinose, which promotes the formation of a compact structure and greater branching of molecules.

CRediT authorship contribution statement

Adrianna Kaczmarska: Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Piotr M. Pieczywek:** Writing – review & editing, Visualization, Validation, Methodology, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Justyna Cybulska:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Jolanta Cieśla:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Artur Zdunek:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Project administration, Funding acquisition, Data curation.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgement

This work was supported by the National Science Centre, Poland [grant number 2019/35/O/NZ9/01387].

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138869>.

org/10.1016/j.foodchem.2024.138869.

References

- Alba, K., Laws, A. P., & Kontogiorgos, V. (2015). Isolation and characterization of acetylated LM pectins extracted from okra pods. *Food Hydrocolloids*, 43, 726–735. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.08.003>
- Belkheiri, A., Forouhar, A., Ursu, A. V., Dubessay, P., Pierre, G., Delattre, C., Djelveh, G., Abdelkafi, S., Hamdani, N., & Michaud, P. (2021). Extraction, characterization, and applications of pectins from plant by-products. *Applied Sciences*, 11, Article 6596. <https://doi.org/10.3390/app11146596>
- Bertaud, F., Sundberg, A., & Holubom, B. (2002). Evaluation of acid methanolysis for analysis of wood hemicelluloses and pectins. *Carbohydrate Polymers*, 48, 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00249-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00249-1)
- Chen, S., Zheng, J., Zhang, L., Cheng, H., Orfila, C., Ye, X., & Chen, J. (2021). Synergistic gelling mechanism of RG-I rich citrus pectic polysaccharide at different esterification degree in calcium-induced gelation. *Food Chemistry*, 350, Article 129177. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129177>
- Chylińska, M., Szymańska-Chargot, M., & Zdunek, A. (2016). FT-IR and FT-Raman characterization of non-cellulosic polysaccharides fractions isolated from plant cell wall. *Carbohydrate Polymers*, 154, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.121>
- Ciesla, J., Koczanowska, M., Pieczywek, P. M., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2021). The concentration modified physicochemical surface properties of sodium carbonate-soluble pectin from pears (*Pyrus communis* L.). *Food Hydrocolloids*, 113, Article 106524. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106524>
- Cros, S., Garnier, C., Axelos, M. A. V., Imbert, A., & Pérez, S. (1996). Solution conformations of pectin polysaccharides: Determination of chain characteristics by small angle neutron scattering, viscometry, and molecular modeling. *Biopolymers*, 39(3), 339–351. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0282\(199609\)39:3<339::Aid-bip6>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0282(199609)39:3<339::Aid-bip6>3.0.co;2-p)
- Cybulska, J., Drobek, M., Panek, J., Cruz-Rubio, J. M., Kurzyńska-Szklarek, M., Zdunek, A., & Frac, M. (2022). Changes of pectin structure and microbial community composition in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa* Duch.) during cold storage. *Food Chemistry*, 381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132151>
- Cybulska, J., Zdunek, A., & Kozioł, A. (2015). The self-assembled network and physiological degradation of pectins in carrot cell walls. *Food Hydrocolloids*, 43, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.032>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Einhorn Stoll, U. (2018). Pectin water interactions in foods – From powder to gel. *Food Hydrocolloids*, 78, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.029>
- Food Chemical Codex* (pp. 283–286). (1981). Washington, DC: National Academy of Sciences.
- Gawłowska, D., Ciesla, J., Zdunek, A., & Cybulska, J. (2019). Cross-linking of diluted alkali-soluble pectin from apple (*Malus domestica* fruit) in different acid-base conditions. *Food Hydrocolloids*, 92, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.010>
- Gawłowska, D., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2018). Cross-linking of sodium carbonate-soluble pectins from apple by zinc ions. *Carbohydrate Polymers*, 196, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.024>
- Hiemenz, P. C., & Lodge, T. P. (2007). *Polymer Chemistry* (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420018271>
- Hou, Z., Chen, S., & Ye, X. (2021). High pressure processing accelerated the release of RG-I pectic polysaccharides from citrus peel. *Carbohydrate Polymers*, 263. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118005>
- Huggins, M. L. (1942). The viscosity of dilute solutions of long chain molecules. IV. Dependence on concentration. *Journal of the American Chemical Society*, 64(11), 2716–2718. <https://doi.org/10.1021/ja01263a056>
- Kacuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., & Ehringerová, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X)
- Kaczmarska, A., Pieczywek, P. M., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2022). Structure and functionality of rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review. *Carbohydrate Polymers*, 278. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118909>
- Kontogiorgos, V., Margelou, I., Georgiadis, N., & Ritzoulis, C. (2012). Rheological characterization of okra pectins. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.003>
- Lara Espinoza, C., Sanchez-Villegas, J. A., Lopez-Franco, Y., Carvajal Millan, E., Troncoso-Rojas, R., Carvallo-Ruiz, T., & Rascon-Chu, A. (2021). Composition, physicochemical features, and covalent gelling properties of ferulated pectin extracted from three sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars grown under desertic conditions. *Agronomy*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/agronomy11010040>
- Lau, J. M., McNeil, M., Durvill, A. G., & Allersheim, P. (1985). Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Research*, 137(C), 111–125. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(85\)85153-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(85)85153-3)
- M'sakni, N. H., Majdoub, H., Roudesli, S., Picton, L., Le Cerf, D., Rihouey, C., & Morvan, C. (2006). Composition, structure and solution properties of polysaccharides extracted from leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. *European Polymer Journal*, 42(4), 786–795. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.09.014>
- Makshakova, O. N., Gorskova, T. A., Mikshina, P. V., Zuev, Y. F., & Perez, S. (2017). Metrics of rhamnogalacturonan I with β-(1→4)-linked galactan side chains and structural basis for its self-aggregation. *Carbohydrate Polymers*, 158, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.082>
- Morris, G. A., Adams, G. G., & Harding, S. E. (2014). On hydrodynamic methods for the analysis of the sizes and shapes of polysaccharides in dilute solution: A short review. *Food Hydrocolloids*, 42, 318–334. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.014>
- Morris, G. A., Foster, T., & Harding, S. (2000). The effect of degree of esterification on the hydrodynamic properties of citrus pectin. *Food Hydrocolloids*, 14, 227–235. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00007-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00007-2)
- Morris, G. A., Ralet, M. C., Bonnin, E., Thibault, J. F., & Harding, S. E. (2010). Physical characterisation of the rhamnogalacturonan and homogalacturonan fractions of sugar beet (*Beta vulgaris*) pectin. *Carbohydrate Polymers*, 82(4), 1161–1167. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.049>
- Muñoz-Almagro, N., Ruiz-Torralba, A., Méndez-Albiñana, P., Guerra-Hernández, E., García Villanova, B., Moreno, R., Villanuel, M., & Montilla, A. (2021). Berry fruits as source of pectin: Conventional and non-conventional extraction techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186(July), 962–974. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.016>
- Necas, D., & Klapetek, P. (2012). Gwyddion: An open-source software for SPM data analysis. *Central European Journal of Physics*, 10(1), 181–188. <https://doi.org/10.2478/s11534-011-0096-2>
- O'Neill, M. A., Ishii, T., Allersheim, P., & Darvill, A. G. (2004). Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 09–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant.55.031903.141750>
- Pieczywek, P. M., Kozioł, A., Płaziński, W., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2020). Resolving the nanostructure of sodium carbonate extracted pectins (DASP) from apple cell walls with atomic force microscopy and molecular dynamics. *Food Hydrocolloids*, 104, Article 105726. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105726>
- Posé, S., Kirby, A. R., Mercado, J. A., Morris, V. J., & Quesada, M. A. (2012). Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. *Carbohydrate Polymers*, 88(3), 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.029>
- Puskás, I., Szemjonov, A., Fenyvesi, É., Malanga, M., & Sente, L. (2013). Aspects of determining the molecular weight of cyclodextrin polymers and oligomers by static light scattering. *Carbohydrate Polymers*, 94, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.025>
- Qi, T., Ren, J., Li, X., An, Q., Zhang, N., Jia, X., Pan, S., Fan, G., Zhang, Z., & Wu, K. (2023). Structural characteristics and gel properties of pectin from citrus physiological premature fruit drop. *Carbohydrate Polymers*, 309. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120682>
- R Core Team. (2013). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Ralet, M. C., Crépeau, M. J., Lefebvre, J., Mouille, G., Höfte, H., & Thibault, J. F. (2008). Reduced number of homogalacturonan domains in pectins of an Arabidopsis mutant enhances the flexibility of the polymer. *Biomacromolecules*, 9(5), 1454–1460. <https://doi.org/10.1021/bm701321g>
- Redgwell, R. J., & Selvendran, R. R. (1986). Structural features of cell wall polysaccharides of onion *Allium cepa*. *Carbohydrate Research*, 157(C), 183–199. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(86\)85068-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(86)85068-6)
- Rees, D. A., & Wight, A. W. (1971). Polysaccharide conformation. Part VII. Model building computations for α-1,4 galacturonan and the kinking function of L-rhamnose residues in pectic substances. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*, 1366, 1366–1372. <https://doi.org/10.1039/j29710001366>
- Renard, C. M. G. C. (2005). Variability in cell wall preparations: Quantification and comparison of common methods. *Carbohydrate Polymers*, 60(4), 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.03.002>
- Reynolds, D. G., Demman, L. J., Bünhaud, H. A. S., & Morris, G. A. (2020). The effect of different extraction conditions on the physical properties, conformation and branching of pectins extracted from *Cucumis melo* *Inodorus*. *Polysaccharides*, 1(1), 3–20. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides1010002>
- Sousa, A. G., Nielsen, H. L., Armagan, I., Larsen, J., & Sørensen, S. O. (2015). The impact of rhamnogalacturonan-I side chain monosaccharides on the rheological properties of citrus pectin. *Food Hydrocolloids*, 47, 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.013>
- Thakur, B. R., Singh, R. K., & Handa, A. K. (1997). Chemistry and uses of pectin - A review. In *Critical reviews in food science and nutrition* (Vol. 37(1), pp. 47–73). Taylor and Francis Inc. doi: 10.1080/10408399709527767.
- Usov, I., & Mezzenga, R. (2015). FiberApp: An open-source software for tracking and analyzing polymers, filaments, biomacromolecules, and fibrous objects. *Macromolecules*, 48(5), 1269–1280. <https://doi.org/10.1021/ma502264e>
- Wai, W. W., Alkarkhi, A. F. M., & Essa, A. M. (2010). Effect of extraction conditions on yield and degree of esterification of durian rind pectin: An experimental design. *Food and Bioprocess Processing*, 88(2–3), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.01.010>
- Wang, Y., Azhar, S., Lindström, M. E., & Henriksson, G. (2015). Stabilization of polysaccharides during alkaline pre-treatment of wood combined with enzyme-supported extractions in a biorefinery. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 35(2), 91–101. <https://doi.org/10.1080/02773833.2013.875041>
- Yang, J. S., Mu, T. H., & Mu, M. M. (2018). Extraction, structure, and emulsifying properties of pectin from potato pulp. *Food Chemistry*, 244, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.059>
- Yapo, B. M. (2011). Rhamnogalacturonan-I: A structurally puzzling and functionally versatile polysaccharide from plant cell walls and nuaclages. *Polymer Reviews*, 51(4), 391–413. <https://doi.org/10.1080/15583724.2011.615962>

- Zdunek, A., Koziol, A., Pieczywek, P. M., & Cybulska, J. (2014). Evaluation of the nanostructure of pectin, hemicellulose and cellulose in the cell walls of pears of different texture and firmness. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3525–3535. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1365-z>
- Zdunek, A., Pieczywek, P. M., & Cybulska, J. (2021). The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 1101–1117. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12689>
- Zhang, S., Hu, H., Wang, L., Liu, F., & Pan, S. (2018). Preparation and prebiotic potential of pectin oligosaccharides obtained from citrus peel pectin. *Food Chemistry*, 244, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.071>
- Zhang, J. Z., Peng, X. Y., Liu, S., Jiang, B. P., Ji, S. C., & Sheti, X. C. (2019). The persistence length of semiflexible polymers in lattice Monte Carlo simulations. *Polymers*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/polym11020295>
- Zheng, J., Chen, J., Zhang, H., Wu, D., Ye, X., Linardi, R. J., & Chen, S. (2020). Gelling mechanism of RG 1 enriched citrus pectin: Role of arabinose side chains in cation and acid-induced gelation. *Food Hydrocolloids*, 101. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105536>

9.1. Materiały uzupełniające publikacji P.3

Supplementary materials

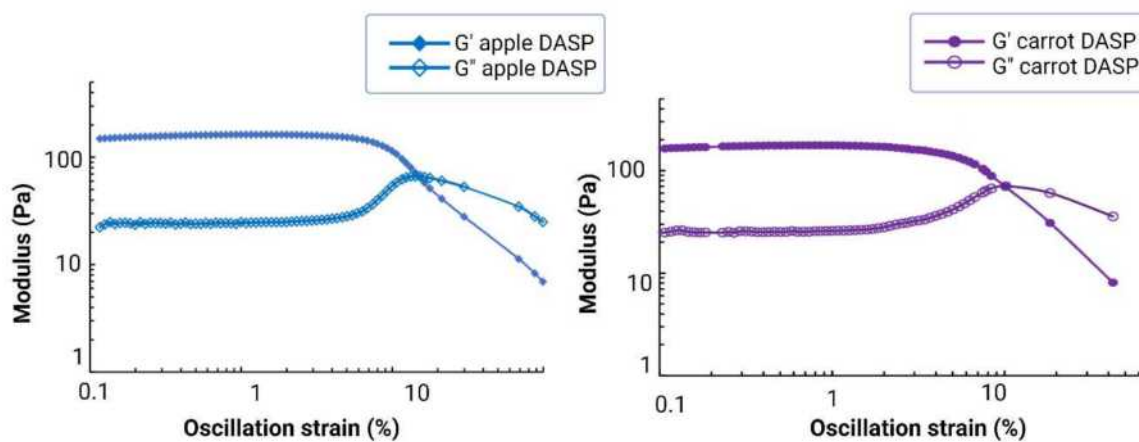


Figure S1. Representative examples of mechanical spectra as a function of the elastic (G') and viscous (G'') parameters for 6% (w/v) apple and carrot DASP (diluted alkali soluble pectin) fraction solutions. Measurements were performed using a frequency of 0.5 Hz and logarithmic sweep (strain 0.1–100%, 25 points per decade).

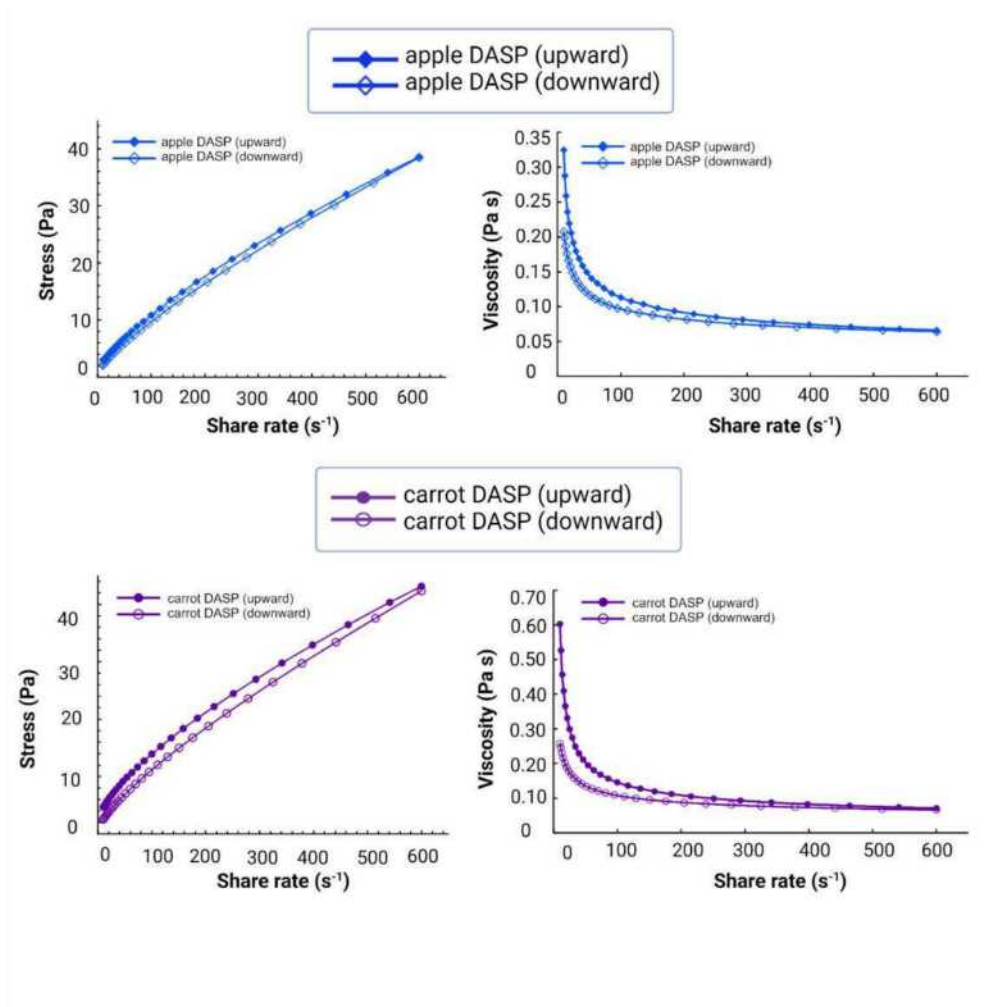


Figure S2. Flow curves plotted as the shear stress vs. shear rate relation, were measured over the variable shear rate of 10–600 s⁻¹; 600–10 s⁻¹ (logarithmic sweep, 15 points per decade) and changes in viscosity (constant shear rate of 10 s⁻¹) at the different shear rates for 6% (w/v) apple and carrot DASP (diluted alkali soluble pectin) fraction solutions.

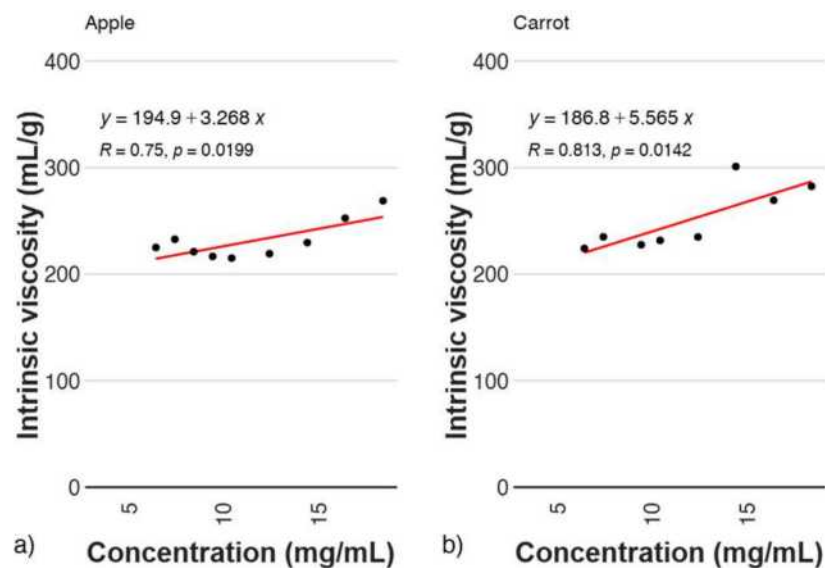


Figure S3. Intrinsic viscosity vs. concentration plots for apple and carrot DASP (diluted alkali soluble pectin). The viscosity of the solution was measured using a variable shear rate of 10–400 s^{-1} ; 400–10 s^{-1} (logarithmic sweep; 25 points per decade). The intrinsic viscosities of both samples were determined by extrapolating to a zero concentration.

scientific reports



OPEN

Effect of enzymatic modification on the structure and rheological properties of diluted alkali-soluble pectin fraction rich in RG-I

Adrianna Kaczmarek, Piotr M. Pieczywek, Justyna Cybulska & Artur Zdunek✉

This study focuses on pectin covalently linked in cell walls from two sources, apples and carrots, that was extracted using diluted alkali, and it describes changes in the rheological properties of diluted alkali-soluble pectin (DASP) due to enzymatic treatment. Given DASP's richness of rhamnogalacturonan I (RG-I), RG-I acetyl esterase (RGAE), rhamnogalacturonan endolyase (RGL), and arabinofuranosidase (ABF) were employed in various combinations for targeted degradation of RG-I pectin chains. Enzymatic degradations were followed by structural studies of pectin molecules using atomic force microscopy (AFM) as well as measurements of rheological and spectral properties. AFM imaging revealed a significant increase in the length of branched molecules after incubation with ABF, suggesting that arabinose side chains limit RG-I aggregation. Structural modifications were confirmed by changes in the intensity of bands in the pectin fingerprint and anomeric region on Fourier transform infrared spectra. ABF treatment led to a decrease in the stability of pectic gels, while the simultaneous use of ABF, RGAE, and RGL enzymes did not increase the degree of aggregation compared to the control sample. These findings suggest that the association of pectin chains within the DASP fraction may rely significantly on intermolecular interactions. Two mechanisms are proposed, which involve side chains as short-range attachment points or an extended linear homogalacturonan conformation favoring inter-chain interactions over self-association.

Pectin constitutes up to 35% of plant cell walls, performs important functions in plant growth and development, maintains cell-cell integrity, and, in the case of fruit and vegetables, determines firmness and texture^{1,2}. Pectin is considered to be the component providing visco-plastic properties to the load-bearing cellulose-hemicellulose network in the cell wall; therefore, it plays an important role in plant cell wall rheology³. Pectin is also important for the food industry due to its ability to increase viscosity and bind water. Moreover, pectin gelling activity may be tuned by various parameters, such as the structure and concentration of pectin, pH, temperature, and presence of cations^{4,5}.

There are three main pectic domains. Homogalacturonan (HG) consists of a linear chain of α -(1,4)-linked D-galacturonic acid (GalA) and is known as pectin's "smooth" region. Rhamnogalacturonans belong to the so-called "hairy" region. The backbone of rhamnogalacturonan I (RG-I) is made of the diglycosyl repeating unit $[-\rightarrow 4-\alpha-D-GalpA-(1\rightarrow 2)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow)]$. Predominantly, a large proportion of rhamnose units are substituted at O-4 with side chains composed principally of arabinans, galactans, and/or arabinogalactans¹.

Neutral side chain loss and the rearrangement of their associations within RG-I are some of the most pronounced and earliest changes in pectin structure during maturation, ripening, and storage in fruits and vegetables. The majority of structural changes are associated with β -galactosidase and α -L-arabinofuranosidase (ABF) enzymatic activity, which is observed during ripening, especially for firmly bound polymers extracted by sodium carbonate⁶. The percentage of methyl-esterified GalA units within the HG substructure is defined as the degree of methyl esterification (DM), while the percentage of O-acetylated GalA units is the degree of acetylation (DA). The numbers of methyl and acetyl groups in pectin chains affect the gelling conditions and the viscosity of pectin solutions; thus, they are some of the major factors determining the functionality of pectin chains. The DM and DA are strongly influenced by the plant source as well as the extraction method. For low-methylated (LM) pectin (DM < 50%), gelation occurs at acidic pH (2–6) and in the presence of divalent ions such as Ca^{2+} , while high-methylated (HM) pectin (DM > 50%) form gels in the presence of greater than 55% sugar or a similar co-solute

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-270 Lublin, Poland. ✉email: a.zdunek@ipan.lublin.pl

at $\text{pH} < 3.5^7$. Hydrogen bonds and electrostatic interactions play a crucial role in the gelation mechanism of HM pectin, while for LM pectin the “egg-box” model describes binding processes and junction zone formation between non-esterified GalA units and calcium ions⁸. Characteristics of the pectin polymer backbone, including its intrinsic flexibility or stiffness, play a major role in the rheological properties in solution and influence the order/disorder state of the system on a supramolecular scale, especially while different levels of chain association may be involved in network formation⁹.

The diluted alkali-soluble pectin (DASP) fraction of the cell wall pectic matrix extracted with sodium carbonate is considered to be the covalently linked fraction of the cell wall. As previously reported, these molecules show the distinctive feature of creating a self-assembled network on mica¹⁰. Atomic force microscopy (AFM) imaging and coarse grain simulations have confirmed that the network-like appearance on mica originates from rhamnose units separating two sections of HG and the creation of kinks at the characteristic angle of $118^{\circ 11}$. Previous studies have demonstrated that DASP from fruits like pear or apple shows gelling ability dependent on concentration, pH, or monovalent and divalent cations in aqueous medium, indicating the possible application of this polysaccharide fraction due to its low methylation level¹². However, due to the significantly different conformations of RG-I and HG², we hypothesize that the rheology of DASP, which is rich in RG-I¹³, may be largely affected by the side chains and the presence of the kinks caused by rhamnose interspersed with GalA.

The goal of this paper was structural characterization at the supramolecular scale and investigation rheological properties of the DASP fractions extracted from two horticultural sources (apple and carrot) and structurally changed by enzymatic modification. In this experiment, RG-I acetyl esterase (RGAE), rhamnogalacturonan endolyase (RGL), and ABF were used. RGAE is an enzyme that participates in the deacetylation of GalA in the RG-I backbone. RGL participates in the endotype eliminative cleavage of L- α -rhamnopyranosyl-1,4- α -D-galactopyranosyluronic acid bonds of RG-I domains in ramified hairy regions of pectin, leaving L-rhamnopyranose at the reducing end and 4-deoxy-4,5-unsaturated D-galactopyranosyluronic acid at the non-reducing end^{14,15}. ABF preferentially removes α -1,2- and α -1,3-linked arabinose from side chains of either arabinan or arabinoxylan, and it hydrolyses α -1,5-linked arabino-oligosaccharides at a low rate¹⁴. It is hypothesized that the detachment of the rhamnose and side chains affects pectin rheology. In this study, the effect of selective modification of pectin chains was compared for apple and carrot DASP and studied by high-performance liquid chromatography (HPLC), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, AFM imaging analysis, and rheological measurements of pectin aqueous solution.

Results and discussion

Nanostructure

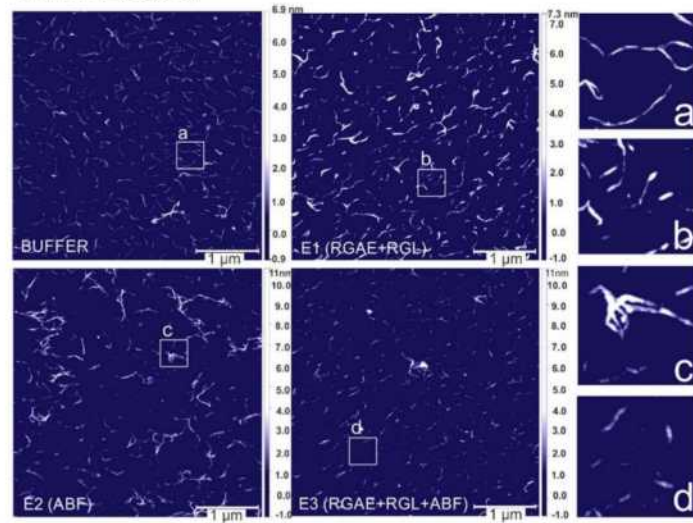
Figure 1 shows representative AFM height images of DASP from apple and carrot in the control (buffer) batch and after 120 min of incubation in three enzymatic cocktails: E1 (RGL + RGAE), E2 (ABF), and E3 (RGL + RGAE + ABF). Zoomed regions of the DASP incubated in the buffer presented in Fig. 1a,f show fibers only in the form of rod-like structures with linear segments of variable length and separated by bending or branching points. Such features have been previously observed for DASP fractions extracted from apple, carrot, or pear^{10,16} and have been explained as the result of rhamnose interspersed with GalA¹¹. A similar structure was created on the mica by the DASP fibers after applying the E1 treatment (Fig. 1b,g). In the sample treated with E2 (Fig. 1c,h), larger aggregates and longer chains were observed and were particularly pronounced for carrot (Fig. 1h). Additionally, with both the E2 treatment and the combination of the three enzymes (E3) (Fig. 1d,i), short chains and small molecules were mostly noted.

According to the image analysis performed on the AFM scans, the observed structures were categorized as “hairy” molecules or “smooth” molecules. Additionally, the total length of the branched molecule was calculated as the sum of lengths of the branches belonging to the molecule. The average total lengths of the molecules classified as hairy, before being placed in buffer, were approximately 585 ± 23 nm and 443 ± 23 nm for apple DASP (DASP-A) and carrot (DASP-C), respectively (Fig. 2a). This length is consistent with that previously obtained by another study¹⁷, which was from 20 to 1000 nm for the sodium carbonate pectin fraction extracted from different fruits. Contour lengths of alkali-treated sugar beet pectin were in the range of 20–520 nm¹⁸, similar to the molecule length for Na_2CO_3 extracts obtained from mature green tomato fruits (20–400 nm)¹⁹.

After placing the pectin in the buffer, the lengths of hairy molecules (Fig. 2a) did not change significantly for apple, while they increased for carrot. The length of molecules classified as smooth, before being placed in buffer (Fig. 2b), was shorter than 100 nm, and the incubation with buffer for 120 min caused apparent shortening for apple and a slight increase for carrot (Fig. 2b). The effect of incubation with buffer, reflected by changes in parameters after 120 min of incubation, suggests that pectin incubated in buffer alone may undergo structural changes leading to self-aggregation. Since pectin was incubated in buffer at pH 7, this result may be similar to that previously obtained for DASP-A and may be explained by the mechanism of high electrostatic repulsion between fully dissociated macromolecules that probably blocked the formation of extended pectin chains⁴.

Enzymatic treatment with cocktails E1 and E3 did not cause a statistically significant change in the length of the hairy molecules extracted from apple (Fig. 2a). In the case of carrot (Fig. 2a), treatment with E1 caused a slight but non-significant increase in length, while treatment in E3 caused a statistically significant decrease compared to incubation with buffer. Analysis of the number of segments (Fig. 2d) and the average length of segments (Fig. 2c) revealed that the total length of hairy molecules was related to the number of segments but that, simultaneously, the segments seemed to become slightly shorter after incubation with enzymes. The most pronounced effect on the structure of DASP in both materials was obtained when E2 treatment was applied (Fig. 2a). ABF was the only active enzyme in the E2 treatment and caused a significant increase in the total length of hairy molecules (up to almost 1.5 μm after 120 min). This effect was clearly associated with an increase in the number of segments and their only slight shortening during incubation (Fig. 2d). It is also worth noting that

APPLE DASP



CARROT DASP

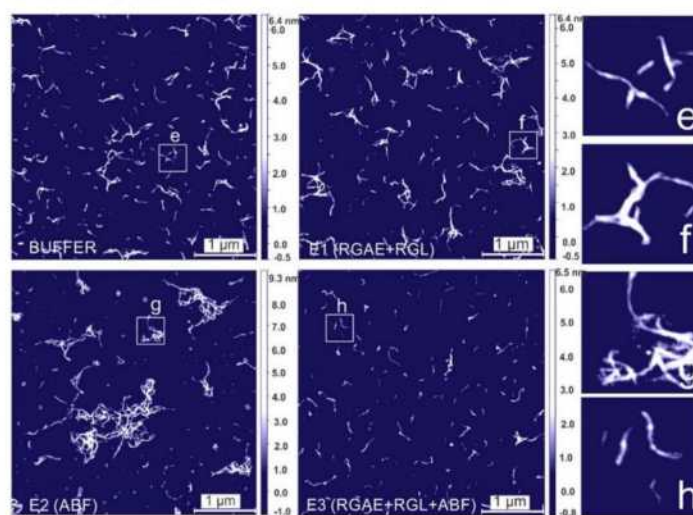


Figure 1. AFM height images of control (buffer) and enzymatically modified (incubation time 120 min) apple DASP (a–d) and carrot DASP (e–h) on mica. Scale bar represents 1 μm. Illustrations show two main categories of structures detected on topological AFM images: hairy and smooth molecules.

the chains classified as smooth (Fig. 2b) had lengths similar to those of segments of hairy molecules (Fig. 2b), i.e., less than 100 nm. The smooth molecules were unaffected by enzymatic treatment even with E2 (Fig. 2b). As ABF preferentially removes α-1,2- and α-1,3-linked arabinose from side chains, the effect of E2 on the structure of pectin molecules could be explained by the gradual removal of arabinose, followed by aggregation of RG-I molecules, thereby resulting in a three-fold increase in the number of branches per molecule (from about five to 15 segments per molecule), as shown in Fig. 2d.

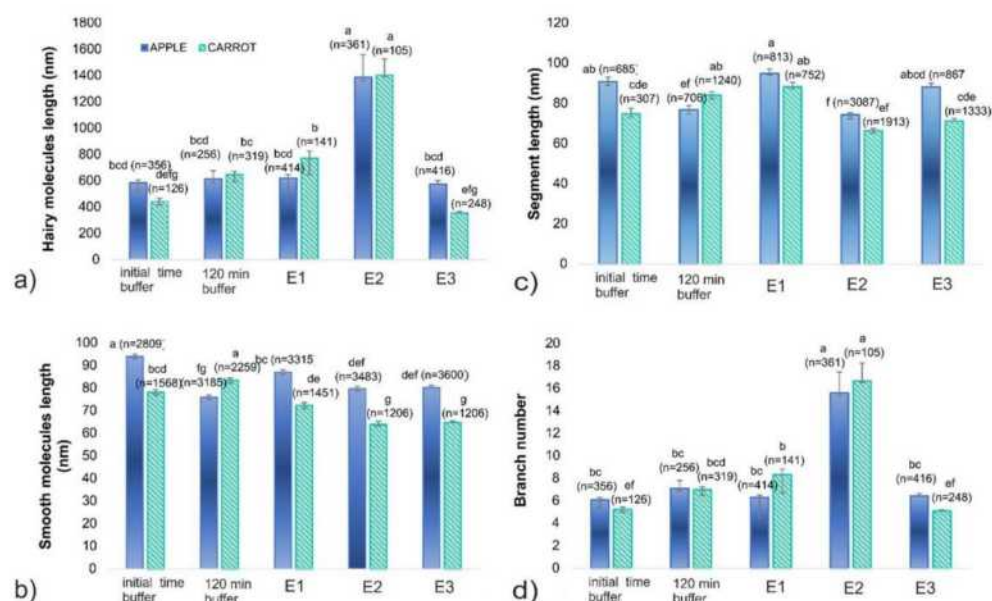


Figure 2. Changes in structural parameters of DASP molecules from apple and carrot treated with various combinations of enzymatic modification after 120 min. E1: DASP water solution with RGAE and RGL; E2: DASP water solution with ABF; E3: DASP water solution with RGAE, RGL, and ABF. Bars represent standard error (n is the number of replicates). Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA, $p < 0.05$).

Contrary to the application of ABF alone, the simultaneous action of ABF with RGAE and RGL enzymes (E3 treatment) did not result in aggregation and did not increase the lengths of hairy molecules. The lengths of hairy molecules after incubation in E3 were 576 ± 26 nm and 356 ± 12 nm for DASP-A and DASP-C, respectively. A decrease in the number of branches per molecule, from seven side branches for both sources to six for apple pectin and five for carrot pectin, was also observed for this treatment. Shortening of hairy molecules and a decrease in the number of branches due to E3 were more pronounced for DASP-C than for DASP-A. This higher fragmentation of the carrot pectin chain may have resulted from the greater RG-I content (62.90 mol%) than in apple (41.50 mol%), as was previously described¹³, which provides more sites of action for pectinolytic enzymes.

Incubation in the E1 enzyme mixture did not cause significant differences in branch lengths (Fig. 2c) for either source. It is suspected that the function of the RGL enzyme may have been impaired because the abundance of arabinose side chains prevented access to the chain due to steric hindrance.

A slight decrease in segment length (Fig. 2c), which could be attributed to the lengths of side branches, was noted for the E2 treatment. Moreover, for the combination of the three enzymes (E3), a decrease in the average length of smooth molecules (Fig. 2b) was also observed, indicating chain fragmentation. This may suggest that the simultaneous action of the enzymes modifying the RG-I skeleton and the enzymes that remove the arabinose side chains allowed for more effective fragmentation of the pectin chains. Hence, this result supports the above explanation that the arabinose abundant in large amounts in the studied fraction could limit the access of enzymes that modify the RG-I backbone.

Functional groups

The FTIR spectra obtained for DASP-A and DASP-C, both native and treated with E3 for 120 min, are shown in Fig. 3. The overall shape of a polysaccharide spectrum is determined by the polysaccharide composition of the backbone but can also be strongly influenced by the side chain constituents²⁰. The wavelength and intensity of the bands allow the evaluation of possible changes in polysaccharide composition. For all samples, characteristic absorption regions can be distinguished. The shape of each spectrum had a similar pattern, which is characteristic of DASP polysaccharides^{2,21,22}.

For all samples, an absence of a band in the range of $1745\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, which is related to the vibration of esterified groups, suggests a lack of esters in the studied pectin fractions. This was quantified using HPLC measurements, and no methyl groups were detected for native pectin from either source. This was probably caused by the de-esterification of the pectin during sodium carbonate extraction¹⁶. The DA values determined by HPLC were 5.59% and 7.48% for native apple and carrot, respectively. This suggests incomplete degradation

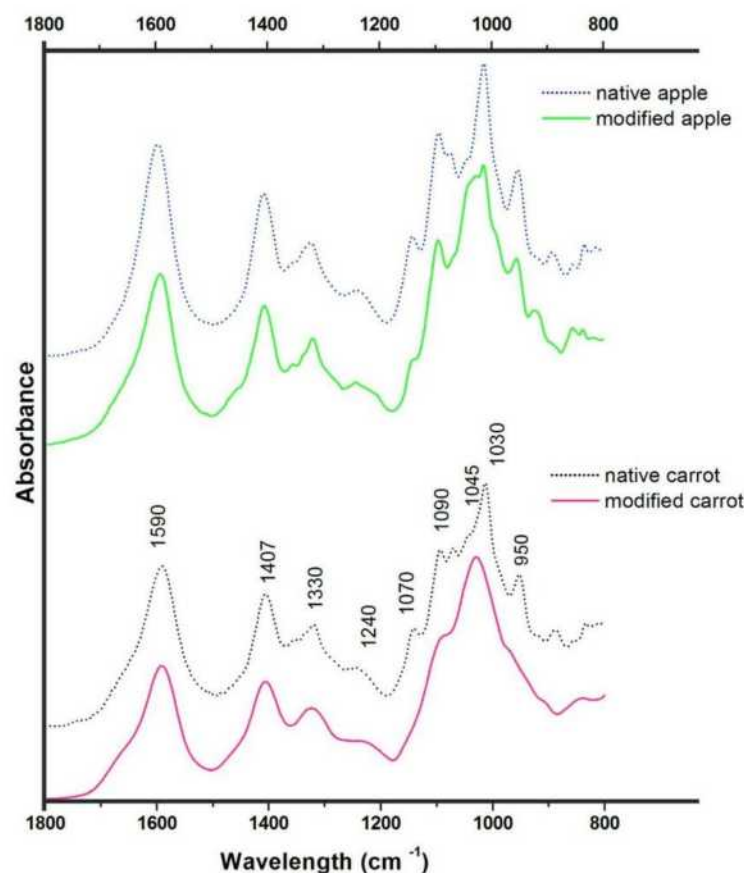


Figure 3. Attenuated total reflectance (ATR)-FTIR absorbance spectra of DASP extracted from apple and carrot in their native states (dotted lines) and after E3 enzymatic modification (solid lines) in the range of 1800–800 cm^{-1} .

of the ester linkage between the acetyl group and the GalA residue in the pectin chains; however, these low values are supported by the lack of peaks on the FTIR spectra for acetylated carbonyl groups (1730 cm^{-1}) and the stretching of C–O–C in acetyl ester (1250 cm^{-1}), which is characteristic of acetylated pectic materials²³. A broad band in the FTIR spectrum of the tested pectin, in the range of approximately $1260\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$, could be considered the peak corresponding to C–O–C stretching; however, in this case it could also be caused by C–O stretching vibrations in pectin, as was previously described for DASP from pear²⁴. Nevertheless, the lower intensity of the broad band around 1240 cm^{-1} for both samples treated with RGAE could be the effect of partial de-esterification of acetyl groups.

The band around 1590 cm^{-1} was assigned to the asymmetric stretching of COO^- in polygalacturonic acid, representing non-esterified carboxyl groups in pectin, while the peak at approximately 1407 cm^{-1} represented symmetric stretching vibrations of carboxylic anions. The band at 1330 cm^{-1} , which was assigned to ring vibration, was present for all samples. As previously shown, the DASP fraction showed a high intensity at this peak compared to the fractions extracted with water and imidazole¹⁸. Based on FTIR spectrum absorbencies in the range of $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ (fingerprint region), it is possible to determine groupings that are specific to each polysaccharide. The main component influencing the change in the shape of this fingerprint region due to enzymatic treatment is GalA, which shows main absorbance regions at approximately 1140 , 1090 , 1070 , and 1030 cm^{-1} . However, it has been shown that different pectic compounds also can show different characteristic positions of maximum bands in this region^{21,25}. The absorbance bands at approximately 1075 cm^{-1} and 1045 cm^{-1} also suggest the presence of RG-I domains²⁶. Changes in the intensity of bands in this region and/or the disappearance of

peaks observed for modified fractions may suggest fragmentation changes in the DASP main chain. The peak at about 950 cm^{-1} , which is characteristic of RG-I²¹, was assigned to galactose side chains¹⁰ and did not change in intensity for the E3 modified DASP-A. In contrast, its disappearance was observed for the enzymatically treated DASP-C. This could be the result of rhamnose removal and, therefore, galactan side chain loss for the carrot sample. Bands in the wavenumbers in the range of $900\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ belong to the anomeric region and can be used to differentiate the α - and β -configurations of anomeric carbon. Peaks at approximately $890\text{--}850\text{ cm}^{-1}$ indicate the presence of galactopyranose and arabinofuranose units in a sample²⁰. For both DASP-C and DASP-A, a disappearance of the peak at 890 cm^{-1} was observed for modified pectin. In addition, for DASP-A, a reduction in the peak intensity at 850 cm^{-1} was observed. These changes may suggest a rearrangement of the bonds related to side chains in the pectin molecule.

Rheological properties

Flow curves collected after 6% DASP-A and DASP-C solutions were treated with buffer or enzymes for 120 min are shown in Fig. 4. A power law (Ostwald–de Waele) and the Herschel–Bulkley fluid model were fitted to the shear rate–shear stress curves for all samples. The consistency coefficient (K) and flow behavior index (n) were used to describe fluid behavior (Table 1). All n values were less than 1, showing that samples behaved as pseudoplastic shear-thinning fluids, as reported previously for other pectin solutions²⁶. This indicates that their apparent viscosity decreased with increasing shear rate and that the macromolecular network was oriented or deformed in the direction of flow.

The E2 (ABF) treatment led to a decrease in K for both fractions, indicating a weakening of the binding of the network. It was concluded that arabinose side chains were involved in macromolecular entanglements in the native fractions, which resulted in higher viscosity for the pectin in buffer²⁷. The strong impact of ABF on the structure of DASP could be caused by the relatively high content of arabinose in the tested fractions. The content of this monosaccharide was $23.6 \pm 0.1\text{ mol\%}$ in DASP-A and $19.8 \pm 2.3\text{ mol\%}$ in DASP-C (Table S1). Moreover, the tested fractions differed in rhamnose content: $3.8 \pm 0.2\text{ mol\%}$ for DASP-A and $8.4 \pm 1.8\text{ mol\%}$ for DASP-C. It is worth noting that, for DASP-A, which contains greater amounts of arabinose, decreases in viscosity and pseudoplastic character after incubation in ABF were much more pronounced. The suggested role of arabinose in the formation of a compact network was supported by a decrease in the yield stress (G_0), which describes the minimum shear rate needed to initiate flow of the material, of samples treated with ABF. In contrast, a strong increase in this parameter, which was observed with the E3 treatment, indicated the formation of a dense network, which was resistant to mechanical disruption, for the debranched polymer. An increase in K with the E3 treatment, combined with a decrease in the flow index, suggests a stronger pseudoplastic character of the DASP solution after simultaneous deacetylation and removal of arabinose and rhamnose. The DASP-C sample, after modification with this enzymatic cocktail, showed the highest pseudoplasticity of all tested solutions. The E3 treatment also resulted in an increase in the viscosity of both sources. This may indicate a greater possibility of particle movement controlled by the entanglements of side chains attached to the rhamnose units as well as acetyl groups, which can hinder the adoption of binding-favorable conformations by the polymer²⁸. In addition, rhamnose inclusions themselves can limit the cross-linking of chains²⁹. An increase in the viscosity of DASP was previously observed during storage of carrot roots²⁶. That study hypothesized that hydrogen bonding between smooth pectin chains and hydrophobic interactions by the methyl groups of pectin chains had occurred as a result of the enzymatic modification naturally occurring in roots. Therefore, it is suspected that E3 treatment resulted in predominantly unbranched acid polymers. Considering the low DM as a result of extraction with sodium carbonate, under these conditions the tendency to self-aggregate in deionized water is reduced. Hence, molecules adopt a more extended conformation that favors interactions between the chains^{30,31}. This interpretation

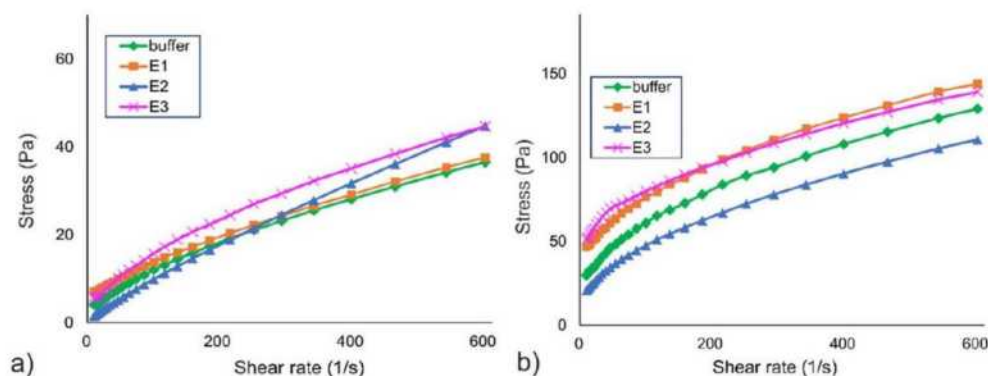


Figure 4. Averaged upward flow curves (shear stress vs. shear rate) for apple (a) and carrot (b) DASP solutions treated with different enzymatic combinations. E1: DASP water solution with RGAE and RGL; E2: DASP water solution with ABF; E3: DASP water solution with RGAE, RGL, and ABF.

Parameter	Unit	Pectin source							
		Apple				Carrot			
		BUFFER	E1 (RGAE + RGL)	E2 (ABF)	E3 (RGAE + RGL + ABF)	BUFFER	E1 (RGAE + RGL)	E2 (ABF)	E3 (RGAE + RGL + ABF)
G'	Pa	310.83 ± 231.30 ^{ab}	1154.61 ± 139.91 ^a	32.29 ± 17.23 ^{ab}	338.77 ± 145.85 ^{ab}	405.53 ± 28.92 ^b	167.26 ± 154.87 ^{ab}	43.67 ± 25.38 ^{ab}	207.33 ± 119.49 ^{ab}
G''/G'		7.52 ± 3.14 ^{ab}	10.74 ± 1.42 ^b	4.38 ± 0.99 ^{ab}	8.34 ± 1.43 ^{ab}	6.77 ± 0.51 ^{ab}	6.44 ± 1.08 ^{ab}	3.51 ± 0.93 ^a	6.93 ± 2.48 ^{ab}
$\tan \delta$		0.14 ± 0.00 ^{abc}	0.09 ± 0.01 ^{bc}	0.24 ± 0.05 ^a	0.13 ± 0.03 ^{ab}	0.15 ± 0.01 ^{abc}	0.16 ± 0.03 ^{abc}	0.30 ± 0.07 ^c	0.15 ± 0.07 ^{ab}
Flow point	%	6.07 ± 3.83 ^{ab}	5.76 ± 1.26 ^{bc}	16.09 ± 4.50 ^{ab}	3.77 ± 1.95 ^a	1.93 ± 0.85 ^a	12.85 ± 7.76 ^{abc}	20.60 ± 10.64 ^c	3.77 ± 1.62 ^{ab}
Linear viscoelasticity limit	%	3.72 ± 1.83 ^{abc}	1.79 ± 0.50 ^{bc}	5.76 ± 2.20 ^a	1.54 ± 0.75 ^a	1.34 ± 0.90 ^a	3.41 ± 1.47 ^{abc}	7.20 ± 2.23 ^c	1.88 ± 0.79 ^{ab}
Power law model									
K	Pa s	2.59 ± 3.99 ^a	1.39 ± 1.46 ^a	0.19 ± 0.09 ^a	2.62 ± 2.76 ^a	9.33 ± 3.66 ^{ab}	20.40 ± 13.57 ^{ab}	5.42 ± 2.16 ^a	23.56 ± 12.54 ^b
n		0.56 ± 0.16 ^{bc}	0.63 ± 0.19 ^{cd}	0.86 ± 0.07 ^d	0.54 ± 0.13 ^{abc}	0.41 ± 0.06 ^{bc}	0.32 ± 0.14 ^{ab}	0.49 ± 0.09 ^{bc}	0.29 ± 0.08 ^a
Herschel-Bulkley model									
G_0	Pa	3.63 ± 5.75 ^a	3.21 ± 4.08 ^a	0.06 ± 0.11 ^a	3.71 ± 5.61 ^a	10.79 ± 6.97 ^{ab}	31.17 ± 20.41 ^{bc}	7.94 ± 4.57 ^a	32.98 ± 16.12 ^c
K	Pa s	1.07 ± 1.16 ^{abc}	0.46 ± 0.25 ^{ab}	0.19 ± 0.09 ^a	1.28 ± 0.9 ^{abc}	4.76 ± 0.65 ^d	3.07 ± 1.68 ^{cd}	2.79 ± 0.95 ^{cd}	5.08 ± 2.31 ^d
n		0.63 ± 0.12 ^{ab}	0.73 ± 0.09 ^{bc}	0.87 ± 0.07 ^c	0.61 ± 0.1 ^{ab}	0.50 ± 0.03 ^a	0.59 ± 0.14 ^{ab}	0.58 ± 0.05 ^{ab}	0.48 ± 0.04 ^a
Viscosity (at 10 s ⁻¹)	Pa s	0.93 ± 0.89 ^{ab}	0.65 ± 0.55 ^a	0.14 ± 0.05 ^a	1.58 ± 1.17 ^{ab}	3.13 ± 0.87 ^{bc}	4.91 ± 2.08 ^c	2.13 ± 0.77 ^{ab}	5.19 ± 1.90 ^c
Intrinsic viscosity	mg L ⁻¹	158.33	148.53	151.56	123.29	293.37	242.31	160.28	147.51

Table 1. Rheological properties of native and modified DASP from apple and carrot. G' , elastic (storage) modulus; G'' , viscous (loss) modulus; $\tan \delta$, loss factor; K , consistency coefficient; n , flow index; G_0 , initial shear stress. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA, $p < 0.05$).

is supported by the recently highlighted role of intermolecular interactions in the mechanical properties of LM pectins, whose extended conformation at neutral pH can increase the elastic character of the mixture³².

To gain insight into the viscoelastic properties of the studied solutions, oscillatory measurements were performed. All the investigated samples exhibited behavior that was more solid-like than liquid-like, as evidenced by the storage modulus G' being much greater than the loss modulus G'' in amplitude sweep tests. This was confirmed by values of the loss factor $\tan \delta < 1$ ($G' > G''$).

A decrease in the storage modulus G' was noted as a result of the E1 treatment for fractions from both sources. As a result of potential depolymerization of the RG-I backbone, this process reduces the average molecular weight of the polymer, leading to decreased entanglements and, hence, overall network strength reduction and disruption of crosslinking. Flow point and linear viscoelasticity values slightly decreased for DASP-A, which was a consequence of the process described; however, for DASP-C, the opposite trend was observed. The increase in these parameters suggests that the structure of deacetylated DASP-C, which is a result of enzymatic modification with RGAE, is more resistant to deformation of this material.

A large decrease in the storage modulus G' , which was observed after removing the arabinose side chains (E2 treatment), combined with an increase in the loss factor G'' , indicated a significant decrease in the elastic properties of pectic gels. This may suggest that arabinose chains, as binding points in the pectin network, exhibit solid-like behavior. For RG-I-enriched pectin, arabinose was involved in gel formation under cation and acid conditions, and improved network formation and enzymatic debranching resulted in a decrease in side-chain entanglements and, hence, looser pectin molecule conformation²⁷. Similarly, decreases in elastic properties and breaking force have been observed for debranched highly methylated citrus pectin gels³³. This study also showed that untreated and debranched pectin gels were governed by the same type of interactions. However, for gels formed by less branched pectins, the network became less entangled, with fewer inter-chain connections, between the polymer molecules, which resulted in an overall decrease in elasticity. For the E2 treatment, increases in the flow point and linear viscoelasticity limit were observed, which indicates that the system was able to retain the molecular properties of the pectin network as the strain increased. It is worth noting that the E2 treatment, by selectively excising the arabinose units, left the galactan side chains intact. Therefore, it is possible that aggregate-stabilizing properties of galactans became apparent in this sample, as was shown by another study³⁴. The rheological parameters obtained may indicate that, for pectin at a concentration of 6%, molecular association occurred with the formation of intermolecular interactions. When the E3 enzyme combination was applied, similar viscoelastic parameters were obtained for both sources. This may indicate that the degradation of arabinose side chains and deacetylation and removal of rhamnose chains have major effects on the observed differences between the DASP of these two materials.

As a result of enzymatic modification, only a small effect on intrinsic viscosity was observed for DASP-A (E3 had the greatest impact on this source). A much more significant effect of enzymatic treatment on intrinsic viscosity was noted in the case of DASP-C. The observed decrease in intrinsic viscosity following enzymatic modification suggests a significant impact on the molecular structure, particularly in DASP-C. This reduction in intrinsic viscosity, which was notable after the E2 and E3 treatments, indicated the formation of compact

molecular aggregates, as shown in AFM images (Fig. 1g,h). These aggregates may signify an increase in molecular flexibility and compactness, possibly resulting from the dissociation of supramolecular aggregates in the native fraction and the reduction of intramolecular forces³⁰ induced by selective degradation of the pectin chain. The different reactions of the apple and carrot fractions to enzymatic modification may be related to differences in their monosaccharide composition of initial fractions (Table S1). Since solutions lacked sucrose and cations, apart from the low salt content of the enzyme buffer, the network formed in the solution was the result of the DASP fraction's natural tendency to self-assemble, which was previously noted and observed with AFM at low concentrations¹⁰. Therefore, it can be expected that the association of pectin chains of the DASP fraction in aqueous solution in the absence of cations occurs by two mechanisms. For native DASP polymers, which are composed of both smooth and hairy structures, neutral side chains are involved in providing multiple short-range attachment points for intermolecular entanglement, which is more favorable than electrostatic repulsion between GalA chains. In contrast, for smooth and linear regions, which are rich in GalA at neutral pH, strongly charged molecules cause intramolecular repulsion; thus, a more extended conformation results⁸. Short linear sections with high mobility cause interactions between the chains to be more favorable than self-aggregation.

Conclusions

This study demonstrated changes in the structure and rheological properties of DASP fractions extracted from apples and carrots under the influence of enzymes that selectively modified the pectin backbone and side chains. The structure of pectin in the DASP fractions had a significant influence on rheological properties. This was supported by changes in the structure, chemical composition, and rheological properties of samples observed as a result of enzymatic modification of RG-I fragments. The removal of rhamnose units, simultaneously with the deacetylation and removal of arabinose side chains, resulted in similar rheological parameters of pectic gels from two plant sources that were different from the properties of the unprocessed samples. Therefore, it can be concluded that rhamnose may be the factor determining the properties of pectin matrices in solution. Modification with ABF had the greatest impact on the properties of this pectin fraction. Arabinose, which is present in side chains, is involved in the formation of the pectin network and affects the pseudoplastic properties and viscosity, but not the mechanical strength, of pectin solutions. At the same time, a significant increase in the lengths of the chains after the removal of arabinose indicates that the side chains are a hindrance limiting the binding of polymer chains.

It can thus be concluded that the association of the pectin chains of DASP fractions in an aqueous solution in the absence of cations may occur due to the crucial role of intermolecular interactions according to two mechanisms: side chains as short-range attachment points and an extended linear HG conformation favoring inter-chain interactions over self-association.

Materials and methods

Pectin source

The research material included apples cv. Najdared (*Malus domestica* Borkh.) and carrots cv. Brava (*Daucus carota* subsp. *sativus*). Material was harvested in Poland in October 2020 and then stored in a cold room at 2 °C and normal atmosphere for 2 days until preparation. Pulp was prepared from 102 kg of raw apples and 34 kg of raw carrots. Both were peeled and sliced. The juice was pressed, and the remaining pomace was homogenized. Then, the prepared material was frozen at −18 °C for further analysis. Alcohol-insoluble residue (AIR) was prepared identically for both plants, according to the method described by Renard³⁵ with some modifications. The pulp was mixed with ~70% ethanol (solid-liquid ratio of 1:10, w/v) for 15–30 min, and then the mixture was filtered on a nylon filter, and the residue was stirred again with ethanol. This procedure was repeated until a negative result of the phenol-sulfuric acid test³⁶ was obtained, thereby confirming the absence of sugar in the pulp. Next, the sample was washed with 96% ethanol and subsequently with acetone and then dried at 45 °C.

DASP extraction

Sequential extraction was performed for both sources according to the method proposed by Redgwell and Selvendran³⁷ with certain modifications. AIR was stirred in deionized water (solid-liquid ratio of 1:9, w/v) for 24 h at 21 °C and then centrifuged (5000 rpm). Supernatant was collected as a water-soluble pectin fraction, and the sediment was mixed with 0.1 M cyclohexane-trans-1,2-diamine tetra-acetate (CDTA, pH 6.5) and stirred at 21 °C for 24 h. After centrifugation, the supernatant was separated as a chelate-soluble pectin fraction, and 0.05 M sodium carbonate (Na₂CO₃), with the addition of 20 mM sodium borohydride (NaBH₄), was added to the residue and stirred for 24 h at 21 °C. The DASP fraction was collected after centrifugation as a supernatant and encoded as DASP-A or DASP-C, for apple-extracted or carrot-extracted samples, respectively. The DASP fraction was dialyzed in an open system using ZelluTrans/ROTH⁺ membranes (Carl Roth GmbH & Co. KG, Germany; MWCO 3500 Da), and then crude extract was lyophilized. DASP from apple and carrot was extracted with a yield of 0.44% and 0.61% of fresh weight (25.58 and 21.30% of dry weight), respectively¹³. The chemical composition of DASP from both sources is presented in Table S1 (Supplementary Information).

Determination of DA and DM

To determine the DM and DA of pectin, samples were saponified with 0.2 M NaOH to produce methanol and acetic acid, which were then measured by HPLC (C18 column, Bionacom velocity LPH-C18, 300 Å, 4.6 × 250 mm, 5 microns, RI detector). The method of Levigne et al.³⁸ with some modifications by Yu et al.³⁹ was used. Pectin samples of 5 mg were suspended in 0.5 mL 0.2 M NaOH and incubated at 4 °C for 120 min. Then, the mixture was neutralized with 0.5 mL 0.2 M H₂SO₄, centrifuged for 10 min, filtered through a 0.22 µm syringe filter, and injected into the HPLC column (injection volume 20 µL, mobile phase 4 mM sulfuric acid at a flow rate

of 0.8 mL min⁻¹). Standard solutions of methanol and acetic acid were prepared and analyzed under the same conditions. The analysis was performed in triplicate.

Enzymatic treatment

The DASP fractions from apples and carrots were treated with enzymes that degrade the RG-I backbone and its side chains. Three types of enzymes were used: RGAE (BtRme NC (CE NC), BT4158, E.C. 3.1.1), RGL (BtRge9A (PL9), BT4183, E.C. 4.2.2.23), and ABF (CjAbf51B (GH51), E.C. 3.2.1.55). All enzymes were purchased from NZYTech and provided in 35 mM Na-HEPES buffer (pH 7.5, 750 mM NaCl, 200 mM imidazole, 3.5 mM CaCl₂, and 25% v/v glycerol).

The quantities of enzymes were selected on the basis of their activity^{15,40,41} and the chemical composition of DASP with 10% excess. Per 1 mg of DASP, 0.22 U of RGL, 9.9 U of RGAE, and 2.1 U of ABF were used. Volumes were obtained according to protein concentrations (RGAE: 0.5 mg mL⁻¹; RGL: 0.5 mg mL⁻¹; ABF: 0.25 mg mL⁻¹).

DASP water solutions were incubated in three different enzyme cocktails (Table 2). As a control (no enzymatic treatment), the same buffer solution in which the enzymes were delivered was added to DASP water solutions.

The pH values of all tested solutions were in the range of 7.30–7.60. Control and enzyme-treated samples were incubated in a water bath at 37 °C for 120 min. After incubation, the samples were cooled in an ice bath for 5 min to stop the enzymatic reactions, mixed, and used for further analysis.

AFM imaging and analysis

After enzymatic modification, 30 µL of each DASP sample, with a concentration of 0.02 mg mL⁻¹, was distributed on freshly cleaved mica sheets (EMS, Hatfield, PA, USA) using a POLOS SPIN150i-NPP spin coater (SPS-Europe B.V., Putten, the Netherlands). Samples were observed (after drying in a desiccator at 22 °C overnight) using a Multimode 8 AFM with a Nanoscope V controller (Bruker, Billerica, MA, USA), a SCANASYST-AIR-HR cantilever (Bruker, Billerica, MA, USA), and a nominal spring constant of 0.4 N m⁻¹. The observations were conducted in ambient air at room temperature. The following scan settings were applied: scan size of 4 × 4 µm with a resolution of 1024 × 1024 points and a scan rate of 3.91 Hz. In total, at least 10 images of each sample representing different regions of the mica sheets were collected. Preliminary processing of images was conducted using Gwyddion 2.52⁴². Geometrical features of DASP structure were calculated with a MATLAB R2011a script (MathWorks, Natick, MA, USA). Molecules visible on the AFM images were classified as hairy or smooth, according to the presence of branch points in the chains (Fig. 1). A single segment was defined as the section between the nearest branching points or between a branching point and the end of the molecule. The total length of hairy molecules (as the sum of their segments), the length of smooth molecules, and the length of a single segment were determined. Moreover, the average number of branches (segments) per molecule was determined.

FTIR spectroscopy

DASP was dissolved in deionized water at a concentration of 6% (m/v). After preparation, samples were vortexed (3000 rpm) and then mixed overnight. DASP was treated with mixture of E1, E2, or E3 and incubated as described in the “Enzymatic treatment” section. Subsequently, samples were cooled in ice for 5 min, mixed overnight, and freeze-dried. FTIR spectra were collected using a Nicolet 6700 FTIR (Thermo Scientific, Madison, WI, USA) with the Smart iTR attenuated total reflectance (ATR) sampling accessory. All samples from both sources were analyzed under the same conditions. Spectra were collected in the range 4000–650 cm⁻¹ with a spectral resolution of 4 cm⁻¹. Measurements were performed in three repetitions with 200 scans averaged for each repetition. The baseline corrections were performed using OMNIC software (Thermo Scientific). The final average spectrum was calculated from collected data and normalized to 1.0 at 1019 cm⁻¹ using OriginPro 8.5 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

Determination of rheological properties

DASP 6% (m/v) solutions were prepared in the same way as for FTIR analysis (“FTIR spectroscopy” section); treated with a mixture of E1, E2, or E3; and incubated as described in the “Enzymatic treatment” section. Subsequently, samples were cooled in ice for 5 min. After cooling, samples were stabilized at room temperature before the oscillatory test and flow behavior measurements were performed.

For intrinsic viscosity measurements, a stock solution of 20 mg mL⁻¹ DASP in deionized water was prepared. A mixture of enzymes (E1, E2, or E3) was added to the well-dissolved sample. After 120 min of incubation, the sample was cooled in ice. From the stock solution, dilutions (5–18 mg mL⁻¹) were prepared to obtain intrinsic viscosity curves.

Treatment code	Description
E1	RGAE (9.9 U mg ⁻¹) + RGL (0.22 U mg ⁻¹)
E2	ABF (2.1 U mg ⁻¹)
E3	RGAE (9.9 U mg ⁻¹) + RGL (0.22 U mg ⁻¹) + ABF (2.1 U mg ⁻¹)
BUFFER	35 mM Na-HEPES buffer, pH 7.5, 750 mM NaCl, 200 mM imidazole, 3.5 mM CaCl ₂ , and 25% (v/v) glycerol

Table 2. Code list and description of the treatments used.

Rheological measurements were performed at 20 °C using a Discovery Hybrid Rheometer (HR-1) by TA Instruments (New Castle, PA, USA) with a cone plate sensor (40 mm diameter and 2.007° angle) with a 0.56 mm gap between the cone apex and the plate.

Viscoelastic properties

The oscillatory test was conducted with amplitude sweeps to describe the storage (G') and loss (G'') moduli of the obtained networks. Measurements were performed while keeping the frequency at a constant value of 0.5 Hz and using a logarithmic sweep with strain in the range of 0.1–50% (25 points per decade; volume of the deposited sample 1 mL).

Flow behavior

Shear stress vs. shear rate dependences (flow curves) were measured between shear rates of 10–600 s^{-1} and 600–10 s^{-1} (logarithmic sweep, 15 points per decade). The viscosity was recorded at constant shear rate of 10 s^{-1} . A power law model (Ostwald–de Waele model) and the Herschel–Bulkley model were applied to obtain flow curves in order to determine the rheological behavior of samples.

The power law model is given as Eq. (1):

$$\sigma = K\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

where σ = shear stress, K = consistency index ($Pa\ s^n$), $\dot{\gamma}$ = shear rate (s^{-1}), and n = flow behavior index.

The Herschel–Bulkley model is described by Eq. (2):

$$\sigma = \sigma_0 + K\dot{\gamma}^n \quad (2)$$

where σ = shear stress, σ_0 = initial shear stress (Pa), K = consistency index ($Pa\ s^n$), $\dot{\gamma}$ = shear rate (s^{-1}), and n = flow behavior index.

Intrinsic viscosity

The variable shear rate of 10–400 s^{-1} and 400–10 s^{-1} (logarithmic sweep; 25 points per decade) was used to measure viscosity of the solutions with a volume of the deposited sample of 0.80 mL. The intrinsic viscosities of samples were determined via an extrapolation of Eq. (3) to a concentration c equal to 0⁴³:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_H[\eta]^2 c \quad (3)$$

where η_{sp} = the specific viscosity that can be obtained from the relative viscosity ($\eta_{solution}/\eta_{solvent}$), c = polymer solution concentration, and k_H = the Huggins constant.

Statistical analysis

The data were analyzed with multi-way ANOVA and a post hoc Tukey honestly significant difference test (significance level $p < 0.05$) using the “stats” package (version 4.1.2) of R (R Core Team, 2013) and Statistica 13.1 (StatSoft, Krakow, Poland).

Ethical approval

All methods were in accordance with the International Union for Conservation of Nature Policy Statement on Research Involving Species at Risk of Extinction and the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. The botanical material was harvested from a commercial orchard located in Ostrowiec (52°9'59.60" N, 20° 3' 23.84" E) and an agricultural experiment station located in Dębowa Góra (51°51'8.38" N, 20°7'1.76" E), Poland.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 21 December 2023; Accepted: 14 May 2024

Published online: 20 May 2024

References

1. Voragen, A. G. J., Coenen, G. J., Verhoef, R. P. & Schols, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct. Chem.* **20**, 263–275 (2009).
2. Zdunek, A., Pieczywek, P. M. & Cybulska, J. The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **20**, 1101–1117 (2021).
3. Haas, K. T., Wightman, R., Peaucelle, A. & Höfte, H. The role of pectin phase separation in plant cell wall assembly and growth. *Cell Surf.* **7**, 100054 (2021).
4. Gawłowska, D., Cieřła, I., Zdunek, A. & Cybulska, J. Cross-linking of diluted alkali-soluble pectin from apple (*Malus domestica* fruit) in different acid-base conditions. *Food Hydrocoll.* **92**, 285–292 (2019).
5. Mierczyńska, J., Cybulska, J., Sołowiej, B. & Zdunek, A. Effect of Ca^{2+} , Fe^{2+} and Mg^{2+} on rheological properties of new food matrix made of modified cell wall polysaccharides from apple. *Carbohydr. Polym.* **133**, 547–555 (2015).
6. Brummell, D. A. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct. Plant Biol.* **33**, 103–119 (2006).
7. Gilsenan, P. M., Richardson, R. K. & Morris, E. R. Thermally reversible acid-induced gelation of low-methoxy pectin. *Carbohydr. Polym.* **41**, 339–349 (2000).

8. Gawkowska, D., Cybulska, J. & Zdunek, A. Structure-related gelling of pectins and linking with other natural compounds: A review. *Polymers (Basel)* **10**, 762 (2018).
9. Lapasin, R. & Prich, S. *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications* (Blackie Academic and Professional, 1995).
10. Cybulska, J., Zdunek, A. & Koziol, A. The self-assembled network and physiological degradation of pectins in carrot cell walls. *Food Hydrocoll.* **43**, 41–50 (2015).
11. Pieczywek, P. M., Koziol, A., Plaziński, W., Cybulska, J. & Zdunek, A. Resolving the nanostructure of sodium carbonate extracted pectins (DASP) from apple cell walls with atomic force microscopy and molecular dynamics. *Food Hydrocoll.* **104**, 105726 (2020).
12. Gawkowska, D., Cieśla, J., Zdunek, A. & Cybulska, J. The effect of concentration on the cross-linking and gelling of sodium carbonate-soluble apple pectins. *Molecules* **24**, 1635 (2019).
13. Kaczmarek, A., Pieczywek, P. M., Cybulska, J., Cieśla, J. & Zdunek, A. Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot. *Food Chem.* **446**, 138869 (2024).
14. Luis, A. S. *et al.* Dietary pectic glycans are degraded by coordinated enzyme pathways in human colonic *Bacteroides*. *Nat. Microbiol.* **3**, 210–219 (2018).
15. Silva, L. R., Jers, C., Meyer, A. S. & Mikkelsen, J. D. Rhamnogalacturonan I modifying enzymes: An update. *N. Biotechnol.* **33**, 41–54 (2016).
16. Zdunek, A., Koziol, A., Pieczywek, P. M. & Cybulska, J. Evaluation of the nanostructure of pectin, hemicellulose and cellulose in the cell walls of pears of different texture and firmness. *Food Bioprocess Technol.* **7**, 3525–3535 (2014).
17. Paniagua, C. *et al.* Fruit softening and pectin disassembly: An overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Ann. Bot.* **114**, 1375–1383 (2014).
18. Kirby, A. R., MacDougall, A. J. & Morris, V. J. Atomic force microscopy of tomato and sugar beet pectin molecules. *Carbohydr. Polym.* **71**, 640–647 (2008).
19. Round, A. N., Rigby, N. M., MacDougall, A. J. & Morris, V. J. A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydr. Res.* **345**, 487–497 (2010).
20. Kacuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N. & Ebringerová, A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* **43**, 195–203 (2000).
21. Chylińska, M., Szymańska-Chargot, M. & Zdunek, A. FT-IR and FT-Raman characterization of non-cellulosic polysaccharides fractions isolated from plant cell wall. *Carbohydr. Polym.* **154**, 48–54 (2016).
22. Posé, S., Kirby, A. R., Mercado, J. A., Morris, V. J. & Quesada, M. A. Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. *Carbohydr. Polym.* **88**, 882–890 (2012).
23. Strytsya, A., Čopíková, I., Matějka, P. & Machovič, V. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydr. Polym.* **54**, 97–106 (2003).
24. Cieśla, J., Koczańska, M., Pieczywek, P., Cybulska, J. & Zdunek, A. The concentration-modified physicochemical surface properties of sodium carbonate-soluble pectin from pears (*Pyrus communis* L.). *Food Hydrocoll.* **113**, 106524 (2021).
25. Coimbra, M. A., Barros, A., Barros, M., Rutledge, D. N. & Delgadillo, I. Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* **37**, 241–248 (1998).
26. Mierczyńska, J., Cybulska, J., Pieczywek, P. M. & Zdunek, A. Effect of storage on rheology of water-soluble, chelate-soluble and diluted alkali-soluble pectin in carrot cell walls. *Food Bioprocess. Technol.* **8**, 171–180 (2015).
27. Zheng, L. *et al.* Evaluation of emulsion stability by monitoring the interaction between droplets. *LWT* **132**, 109804 (2020).
28. Chen, J. *et al.* Pectin modifications: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **55**, 1684–1698 (2015).
29. Chen, S. *et al.* Synergistic gelling mechanism of RG-I rich citrus pectic polysaccharide at different esterification degree in calcium-induced gelation. *Food Chem.* **350**, 129177 (2021).
30. Pieczywek, P. M., Cieśla, J., Plaziński, W. & Zdunek, A. Aggregation and weak gel formation by pectic polysaccharide homogalacturonan. *Carbohydr. Polym.* **256**, 117566 (2021).
31. Sims, I. M., Smith, A. M., Morris, G. A., Ghor, M. U. & Carnachan, S. M. Structural and rheological studies of a polysaccharide mucilage from lacebark leaves (*Hoheria populnea* A. Cunn.). *Int. J. Biol. Macromol.* **111**, 839–847 (2018).
32. Alba, K., Kasapis, S. & Kontogiorgos, V. Influence of pH on mechanical relaxations in high solids LM-pectin preparations. *Carbohydr. Polym.* **127**, 182–188 (2015).
33. Sousa, A. G., Nielsen, H. L., Armagan, L., Larsen, J. & Sørensen, S. O. The impact of rhamnogalacturonan-I side chain monosaccharides on the rheological properties of citrus pectin. *Food Hydrocoll.* **47**, 130–139 (2015).
34. Makshakova, O. N., Faizullin, D. A., Mikshina, P. V., Gorshkova, T. A. & Zuev, Y. F. Spatial structures of rhamnogalacturonan I in gel and colloidal solution identified by 1D and 2D-FTIR spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* **192**, 231–239 (2018).
35. Renard, C. M. G. C. Variability in cell wall preparations: Quantification and comparison of common methods. *Carbohydr. Polym.* **60**, 515–522 (2005).
36. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350–356 (1956).
37. Redgwell, R. J. & Selvendran, R. R. Structural features of cell-wall polysaccharides of onion *Allium cepa*. *Carbohydr. Res.* **157**, 183–199 (1986).
38. Levigne, S., Thomas, M., Ralet, M. C., Quemener, B. & Thibault, J. F. Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards. *Food Hydrocoll.* **16**, 547–550 (2002).
39. Yu, Y. *et al.* Comparison of analytical methods for determining methylesterification and acetylation of pectin. *Appl. Sci.* **11**, 4461 (2021).
40. Beylot, M.-H., McKie, V. A., Voragen, A. G. J., Doeswijk-Voragen, C. H. L. & Gilbert, H. J. The *Pseudomonas cellulosa* glycoside hydrolase family 51 arabinofuranosidase exhibits wide substrate specificity. *Biochem. J.* **358**, 607–614 (2001).
41. Searle-van Leeuwen, M. J. E., van den Broek, L. A. M., Schols, H. A., Beldman, G. & Voragen, A. G. J. Rhamnogalacturonan acetylase: A novel enzyme from *Aspergillus aculeatus*, specific for the deacetylation of hairy (ramified) regions of pectins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 347–349 (1992).
42. Nečas, D. & Klapeček, P. Gwyddion: An open-source software for SPM data analysis. *Cent. Eur. J. Phys.* **10**, 181–188 (2012).
43. Huggins, M. L. The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules. IV. Dependence on concentration. *J. Am. Chem. Soc.* **64**, 2716–2718 (1942).

Acknowledgements

This work was supported by the National Science Centre, Poland (grant number 2019/35/O/NZ9/01387).

Author contributions

A.K.: Writing—original draft, Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Visualization, Investigation. P.M.P.: Writing—review and editing, Methodology, Data curation, Conceptualization, Visualization, Validation, Formal analysis. J.C.: Writing—review and editing, Methodology, Investigation, Formal analysis. A.Z.: Writing—review and editing, Resources, Data curation, Supervision, Project administration, Funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62180-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.Z.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

10.1. Materiały uzupełniające publikacji P.4

Supplementary Information

Effect of enzymatic modification on the structure and rheological properties of diluted alkali-soluble pectin fraction rich in RG-I

Adrianna Kaczmarek, Piotr M. Pieczywek, Justyna Cybulska, Artur Zdunek*

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-270 Lublin

*Corresponding author: Artur Zdunek (a.zdunek@ipan.lublin.pl, phone: +48 81 744 50)

1. Supplementary Materials and Methods

Monosaccharide composition

Monosaccharides were determined as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) derivatives according to the method developed by Lv et al. (2009) and Zhang et al. (2018) with some modifications. Lyophilized pectin fractions were treated with 2 M methanolic HCl at 80 °C for 18 h, and then with 2 ml of 3 M trifluoroacetic acid (TFA) solution at 100 °C for 3 h. Then derivatization of the resulted monosaccharides and uronic acids with PMP was carried out by adding 1 ml of water and 50 µL of 0.3 M NaOH, mixing and finally adding 50 µL of a 0.5 M solution of PMP in methanol. Samples were incubated at 70 °C for 60 min, cooled, neutralized with 50 µL of 0.3 M HCl and extracted thrice with chloroform. Before injection into the HPLC system, each sample was filtered through a 22-µm membrane. Standards of the monosaccharides and uronic acids (arabinose, fucose, galactose, galacturonic acid, glucose, glucuronic acid, mannose, rhamnose, and xylose) were treated in the same way as pectin samples.

The PMP-labelled samples were analysed using a Young Lin 9300 HPLC system with UV/VIS detector (Young Lin Bldg, Anyang, Korea) equipped with a Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 µm) analytical column coupled with an Agilent Eclipse XDB-C18 guard column (4.6 mm i.d. × 12.5, 5 µm). The mobile phase was composed of A: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.7) and B: 50 % v/v solution of 0.1 M phosphate buffer in acetonitrile, at a ratio A:B of 69:31 % (v/v) under isocratic elution mode. The injection volume was 20 µL, with a flow rate of 1.8 ml·min⁻¹ at 30 °C and the detection wavelength was 246 nm. Analysis was performed in three independent repetitions.

2. Chemical composition of samples

Table S1. Monosaccharides and uronic acids composition of generated DASP samples from apple and carrot. Man, mannose; Rha, rhamnose; GlcA, glucuronic acid; GalA,

galacturonic acid; Glc, glucose; Gal, galactose; Xyl, xylose; Ara, arabinose; Fuc, fucose; nd, not detected.

Pectin source	Treatment	Man	Rha	GlcA	GalA	Glc	Gal	Xyl	Ara	Fuc
		mol%								
Apple	BUFFER	1.6±0.2	3.3±0.1	0.3±0.6	56.1±0.6	0.3±0.1	12.8±0.7	1.8±0.2	23.6±0.1	0.3±0.1
	E1	1.7±0.2	3.6±0.3	0.3±0.1	57.5±3.2	0.4±0.1	12.4±1.1	1.4±0.1	22.4±2.6	0.2±0.1
	E2	1.6±0.1	3.4±0.5	0.3±0.2	55.4±0.9	0.5±0.2	12.3±1.0	1.1±0.3	25.3±1.1	0.1±0.0
	E3	1.2±0.3	3.5±0.7	0.7±0.1	56.3±2.2	0.6±0.2	11.7±1.3	1.5±0.3	24.3±1.4	0.2±0.1
Carrot	BUFFER	0.6±0.2	7.0±0.7	0.2±0.1	44.8±2.9	0.2±0.1	27.2±0.3	nd	19.8±2.3	0.2±0.1
	E1	0.7±0.1	8.2±1.1	0.1±0.1	44.4±1.5	0.2±0.1	26.7±1.0	nd	19.4±0.5	0.3±0.1
	E2	0.9±0.0	7.4±2.1	0.3±0.1	45.1±1.2	0.5±0.2	24.8±1.1	nd	20.7±2.1	0.4±0.2
	E3	0.8±0.2	7.1±1.6	0.2±0.1	45.0±1.2	0.2±0.1	29.9±1.4	nd	16.8±1.9	0.2±0.1

11. Bibliografia

- Ahmed, A. E. R., & Labavitch, J. M. (1978). A Simplified Method For Accurate Determination Of Cell Wall Uronide Content. *Journal of Food Biochemistry*, 1(4), 361–365. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1978.tb00193.x>.
- Alagna, L., Prosperi, T., Tomlinson, A. A. G., & Rizzo, R. (1986). Extended x-ray absorption fine structure investigation of solid and gel forms of calcium poly(alfa-D-galacturonate). *The Journal of Physical Chemistry*, 90(26), 6853–6857. <https://doi.org/10.1021/j100284a029>.
- Alba, K., & Kontogiorgos, V. (2017). Pectin at the oil-water interface: Relationship of molecular composition and structure to functionality. *Food Hydrocolloids*, 68, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.026>.
- Alba, K., Laws, A. P., & Kontogiorgos, V. (2015). Isolation and characterization of acetylated LM-pectins extracted from okra pods. *Food Hydrocolloids*, 43, 726–735. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.08.003>.
- Albersheim, P., Darvill, A. G., O'Neill, M. A., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (1996). An hypothesis: The same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. *Progress in Biotechnology*, 14(C), 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80245-0](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80245-0).
- Arnous, A., & Meyer, A. S. (2008). Comparison of methods for compositional characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins. *Food and Bioproducts Processing*, 86(2), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2008.03.004>.
- Axelos, M. A. V., & Branger, M. (1993). The effect of the degree of esterification on the thermal stability and chain conformation of pectins. *Topics in Catalysis*, 7(2), 91–102. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80161-6](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80161-6).
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54(2), 484–489. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90377-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90377-1).
- Broadhurst, M., Cros, S., Hoffmann, R., Mackie, W., & Pérez, S. (1996). Modelling a pentasaccharide fragment of rhamnogalacturonan I. *Progress in Biotechnology*, 14(C), 517–525. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80281-4](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80281-4).

- Brummell, D. A. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*, 33(2), 103–119. <https://doi.org/10.1071/FP05234>.
- Bush, M. S., Marry, M., Huxham, M. I., Jarvis, M. C., & McCann, M. C. (2001). Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation. *Planta*, 213(6), 869–880. <https://doi.org/10.1007/s004250100570>.
- Cao, L., Lu, W., Mata, A., Nishinari, K., & Fang, Y. (2020). Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. *Carbohydrate Polymers*, 242, Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116389>.
- Chan, S. Y., Choo, W. S., Young, D. J., & Loh, X. J. (2017). Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydrate polymers*, 161, 118–139. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.033>.
- Chibrikov, V., Pieczywek, P. M., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2023). Evaluation of elastoplastic properties of bacterial cellulose-hemicellulose composite films. *Industrial Crops and Products*, 205, 117578. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117578>.
- Chibrikov, V., Pieczywek, P. M., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2024). Coarse-grained molecular dynamics model to evaluate the mechanical properties of bacterial cellulose–hemicellulose composites. *Carbohydrate Polymers*, 330, 121827. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.121827>.
- Chibrikov, V., Pieczywek, P. M., & Zdunek, A. (2023). Tailor-Made Biosystems - Bacterial Cellulose-Based Films with Plant Cell Wall Polysaccharides. *Polymer Reviews*, 63(1), 40–66. <https://doi.org/10.1080/15583724.2022.2067869>.
- Chylińska, M., Szymańska-Chargot, M., & Zdunek, A. (2016). FT-IR and FT-Raman characterization of non-cellulosic polysaccharides fractions isolated from plant cell wall. *Carbohydrate Polymers*, 154, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.121>.
- Coenen, G. J., Bakx, E. J., Verhoef, R. P., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2007). Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydrate Polymers*, 70(2), 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.04.007>.

- Cornuault, V., Pose, S., & Knox, J. P. (2018a). Extraction, texture analysis and polysaccharide epitope mapping data of sequential extracts of strawberry, apple, tomato and aubergine fruit parenchyma. *Data in Brief*, 17, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.01.013>.
- Cornuault, V., Posé, S., & Knox, J. P. (2018b). Disentangling pectic homogalacturonan and rhamnogalacturonan-I polysaccharides: Evidence for sub-populations in fruit parenchyma systems. *Food Chemistry*, 246, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.025>.
- Cros, S., Garnier, C., Axelos, M. A. V., Imberty, A., & Pérez, S. (1996). Solution conformations of pectin polysaccharides: Determination of chain characteristics by small angle neutron scattering, viscometry, and molecular modeling. *Biopolymers*, 39(3), 339–351. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0282\(199609\)39:3<339::aid-bip6>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0282(199609)39:3<339::aid-bip6>3.0.co;2-p).
- Cuevas-Bernardino, J. C., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2016). Physicochemical characterisation of hawthorn pectins and their performing in stabilising oil-in-water emulsions. *Reactive and Functional Polymers*, 103, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.03.024>.
- Cybulska, J., Cieśla, J., Kurzyna-Szklarek, M., Szymańska-Chargot, M., Pieczywek, P. M., & Zdunek, A. (2023). Influence of pectin and hemicelluloses on physical properties of bacterial cellulose. *Food Chemistry*, 429, 136996. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136996>.
- Cybulska, J., Drobek, M., Panek, J., Cruz-Rubio, J. M., Kurzyna-Szklarek, M., Zdunek, A., & Frąc, M. (2022). Changes of pectin structure and microbial community composition in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa* Duch.) during cold storage. *Food Chemistry*, 381, 132151. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132151>.
- Cybulska, J., Vanstreels, E., Ho, Q. T., Courtin, C. M., Craeyveld, V. Van, Nicolaï, B., Zdunek, A., & Konstankiewicz, K. (2010). Mechanical characteristics of artificial cell walls. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.001>.
- Cybulska, J., Zdunek, A., & Kozioł, A. (2015). The self-assembled network and physiological degradation of pectins in carrot cell walls. *Food Hydrocolloids*, 43, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.032>.
- Cybulska, J., Zdunek, A., Psonka-Antonczyk, K. M., & Stokke, B. T. (2013). The relation of apple texture with cell wall nanostructure studied using an atomic force microscope. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.103>.

- de Oliveira, C. F., Giordani, D., Gurak, P. D., Cladera-Olivera, F., & Marczak, L. D. F. (2015). Extraction of pectin from passion fruit peel using moderate electric field and conventional heating extraction methods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.02.005>.
- Engelsen, S. B., Cros, S., Mackie, W., & Pérez, S. (1998). A molecular builder for carbohydrates: Application to polysaccharides and complex carbohydrates. *Biopolymers*, 39(3), 417–433. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199609\)39:3<417::AID-BIP13>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199609)39:3<417::AID-BIP13>3.0.CO;2-8).
- Fishman, M. L., Cooke, P. H., & Coffin, D. R. (2004). Nanostructure of native pectin sugar acid gels visualized by atomic force microscopy. *Biomacromolecules*, 5(2), 334–341. <https://doi.org/10.1021/bm0300655>.
- Gawkowska, D., Ciesla, J., Zdunek, A., & Cybulska, J. (2019). The effect of concentration on the cross-linking and gelling of sodium carbonate-soluble apple pectins. *Molecules*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/molecules24081635>.
- Gawkowska, D., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2018a). Cross-linking of sodium carbonate-soluble pectins from apple by zinc ions. *Carbohydrate Polymers*, 196, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.024>.
- Gawkowska, D., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2018b). Structure-related gelling of pectins and linking with other natural compounds: A review. *Polymers*, 10(7), 762. <https://doi.org/10.3390/polym10070762>.
- Ghosh, K., Takahashi, D., & Kotake, T. (2023). Plant type II arabinogalactan: Structural features and modification to increase functionality. *Carbohydrate Research*, 529, 108828. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108828>.
- Goulao, L. F., Santos, J., de Sousa, I., & Oliveira, C. M. (2007). Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Postharvest Biology and Technology*, 43(3), 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.10.002>.
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters*, 32(1), 195–198. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80770-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7).

- Gross, K. C., & Sams, C. E. (1984). Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry*, 23(11), 2457–2461. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84075-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84075-3).
- Gu, J., & Catchmark, J. M. (2012). Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial cellulose assembly. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 547–557. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.040>.
- Gurjanov, O. P., Ibragimova, N. N., Gnezdilov, O. I., & Gorshkova, T. A. (2008). Polysaccharides, tightly bound to cellulose in cell wall of flax bast fibre: Isolation and identification. *Carbohydrate Polymers*, 72(4), 719–729. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.10.017>.
- Gwanpua, S. G., Van Buggenhout, S., Verlinden, B. E., Christiaens, S., Shpigelman, A., Vicent, V., Kermani, Z. J., Nicolai, B. M., Hendrickx, M., & Geeraerd, A. (2014). Pectin modifications and the role of pectin-degrading enzymes during postharvest softening of Jonagold apples. *Food Chemistry*, 158, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.138>.
- Hiemenz, P. C., & Lodge, T. P. (2007). *Polymer Chemistry*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420018271>.
- Houben, K., Jolie, R. P., Fraeye, I., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2011). Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: Structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. *Carbohydrate Research*, 346(9), 1105–1111. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.04.014>.
- Hua, X., Yang, H., Din, P., Chi, K., & Yang, R. (2018). Rheological properties of deesterified pectin with different methoxylation degree. *Food Bioscience*, 23, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.03.011>.
- Huggins, M. L. (1942). The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules. IV. Dependence on Concentration. *Journal of the American Chemical Society*, 64(11), 2716–2718. <https://doi.org/10.1021/ja01263a056>.
- Humerez-Flores, J. N., Kyomugasho, C., Gutiérrez-Ortiz, A. A., De Bie, M., Panozzo, A., Van Loey, A. M., Moldenaers, P., & Hendrickx, M. E. (2022). Production and molecular characterization of tailored citrus pectin-derived compounds. *Food Chemistry*, 367. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130635>.

- Humerez-Flores, J. N., Verkempinck, S. H. E., De Bie, M., Kyomugasho, C., Van Loey, A. M., Moldenaers, P., & Hendrickx, M. E. (2022). Understanding the impact of diverse structural properties of homogalacturonan rich citrus pectin-derived compounds on their emulsifying and emulsion stabilizing potential. *Food Hydrocolloids*, 125, 107343. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107343>.
- Humerez-Flores, J. N., Verkempinck, S. H. E., Kyomugasho, C., Moldenaers, P., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2021). Modified rhamnogalacturonan-rich apple pectin-derived structures: The relation between their structural characteristics and emulsifying and emulsion-stabilizing properties. *Foods*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/foods10071586>.
- Ishii, T., & Tobita, T. (1993). Structural characterization of feruloyl oligosaccharides from spinach-leaf cell walls. *Carbohydrate Research*, 248(C), 179–190. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)84125-P](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)84125-P).
- Iwai, H., Ishii, T., & Satoh, S. (2001). Absence of arabinan in the side chains of the pectic polysaccharides strongly associated with cell walls of *Nicotiana plumbaginifolia* non-organogenic callus with loosely attached constituent cells. *Planta*, 213(6), 907–915. <https://doi.org/10.1007/s004250100559>.
- Jafari, F., Khodaiyan, F., Kiani, H., & Hosseini, S. S. (2017). Pectin from carrot pomace: Optimization of extraction and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1315–1322. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.013>.
- Jarvis, M. C., & Apperley, D. C. (1995). Chain conformation in concentrated pectic gels: evidence from ¹³C NMR. *Carbohydrate Research*, 275(1), 131–145. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00033-P](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00033-P).
- Jiao, X., Li, F., Zhao, J., Wei, Y., Zhang, L., Yu, W., & Li, Q. (2023). The Preparation and Potential Bioactivities of Modified Pectins: A Review. *Foods*, 12(5), 1016. <https://doi.org/10.3390/foods12051016>.
- Jones, L., Milne, J. L., Ashford, D., & McQueen-Mason, S. J. (2003). Cell wall arabinan is essential for guard cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11783–11788. <https://doi.org/10.1073/pnas.1832434100>.
- Kaczmarska, A., Pieczywek, P. M., Cybulska, J., Cieřła, J., & Zdunek, A. (2024). Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot. *Food Chemistry*, 446, 138869. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138869>.

- Kaczmarek, A., Pieczywek, P. M., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2022). Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review. *Carbohydrate Polymers*, 278, 118909. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118909>.
- Kastner, H., Einhorn-Stoll, U., Fatouros, A., & Drusch, S. (2020). Impact of sodium ions on material properties, gelation and storage stability of citrus pectin. *Food Hydrocolloids*, 104, 105750. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105750>.
- Kaya, M., Sousa, A. G., Crépeau, M. J., Sørensen, S. O., & Ralet, M. C. (2014). Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: Influence of acid type and pH of extraction. *Annals of Botany*, 114(6), 1319–1326. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu150>.
- Kikuchi, A., Edashige, Y., Ishii, T., Fujii, T., & Satoh, S. (1996). Variations in the structure of neutral sugar chains in the pectic polysaccharides of morphologically different carrot calli and correlations with the size of cell clusters. *Planta*, 198(4), 634–639. <https://doi.org/10.1007/BF00262652>.
- Kouwijzer, M., Schols, H., & Pérez, S. (1996). Acetylation of rhamnogalacturonan I and homogalacturonan: Theoretical calculations. *Progress in Biotechnology*, 14(C), 57–65. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80246-2](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80246-2).
- Kozioł, A., Cybulska, J., Pieczywek, P. M., & Zdunek, A. (2017). Changes of pectin nanostructure and cell wall stiffness induced in vitro by pectinase. *Carbohydrate Polymers*, 161, 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.014>.
- Kyomugasho, C., Gwala, S., Christiaens, S., Jamsazzadeh Kermani, Z., Van Loey, A. M., Grauwet, T., & Hendrickx, M. E. (2017). Pectin nanostructure influences pectin-cation interactions and in vitro-bioaccessibility of Ca²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺-ions in model systems. *Food Hydrocolloids*, 62, 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.030>.
- Kyomugasho, C., Munyensanga, C., Celus, M., Van de walle, D., Dewettinck, K., Van Loey, A. M., Grauwet, T., & Hendrickx, M. E. (2018). Molar mass influence on pectin-Ca²⁺ adsorption capacity, interaction energy and associated functionality: Gel microstructure and stiffness. *Food Hydrocolloids*, 85, 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.024>.
- Lara-Espinoza, C., Sanchez-Villegas, J. A., Lopez-Franco, Y., Carvajal-Millan, E., Troncoso-Rojas, R., Carvallo-Ruiz, T., & Rascon-Chu, A. (2021). Composition, physicochemical features, and covalent gelling properties of ferulated pectin extracted from three sugar beet

- (Beta vulgaris l.) cultivars grown under desertic conditions. *Agronomy*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/agronomy11010040>.
- Le Goff, A., Renard, C. M. G. ., Bonnin, E., & Thibault, J.-F. (2001). Extraction, purification and chemical characterisation of xylogalacturonans from pea hulls. *Carbohydrate Polymers*, 45(4), 325–334. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00271-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00271-X).
- Levigne, S., Thomas, M., Ralet, M. C., Quemener, B., & Thibault, J. F. (2002). Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards. *Food Hydrocolloids*, 16(6), 547–550. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00015-2).
- Lin, D., Lopez-Sanchez, P., & Gidley, M. J. (2016). Interactions of pectins with cellulose during its synthesis in the absence of calcium. *Food Hydrocolloids*, 52, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.004>.
- Mackie, W., & Perez, S. (1996). *A Molecular Builder*. 39, 417–433.
- Mao, G., Wu, D., Wei, C., Tao, W., Ye, X., Linhardt, R. J., Orfila, C., & Chen, S. (2019). Reconsidering conventional and innovative methods for pectin extraction from fruit and vegetable waste: Targeting rhamnogalacturonan I. *Trends in Food Science and Technology* 94, 65–78. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.001>.
- McNeil, M., Darvill, A., & Albersheim, P. (1980). Structure Of Plant Cell Walls: X. Rhamnogalacturonan I, A Structurally Complex Pectic Polysaccharide In The Walls Of Suspension-Cultured Sycamore Cells. *Plant physiology*, 66(6), 1128–11234. <https://doi.org/10.1104/pp.66.6.1128>.
- Mierczyńska, J., Cybulska, J., Sołowiej, B., & Zdunek, A. (2015). Effect of Ca²⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺ on rheological properties of new food matrix made of modified cell wall polysaccharides from apple. *Carbohydrate Polymers*, 133, 547–555. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.046>.
- Mikshina, P. V., Idiyatullin, B. Z., Petrova, A. A., Shashkov, A. S., Zuev, Y. F., & Gorshkova, T. A. (2015). Physicochemical properties of complex rhamnogalacturonan I from gelatinous cell walls of flax fibers. *Carbohydrate Polymers*, 117, 853–861. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.037>.

- Mikshina, P. V., Makshakova, O. N., Petrova, A. A., Gaifullina, I. Z., Idiyatullin, B. Z., Gorshkova, T. A., & Zuev, Y. F. (2017). Gelation of rhamnogalacturonan I is based on galactan side chain interaction and does not involve chemical modifications. *Carbohydrate Polymers*, 171, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.013>.
- Mikshina, P. V., Petrova, A. A., Faizullin, D. A., Zuev, Y. F., & Gorshkova, T. A. (2015). Tissue-specific rhamnogalacturonan i forms the gel with hyperelastic properties. *Biochemistry (Moscow)*, 80(7), 915–924. <https://doi.org/10.1134/S000629791507010X>.
- Moens, L. G., De Laet, E., Van Wambeke, J., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. G. (2020). Pulsed electric field and mild thermal processing affect the cooking behaviour of carrot tissues (*Daucus carota*) and the degree of methylesterification of carrot pectin. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 66, 102483. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102483>.
- Mohnen, D. (1999). Biosynthesis of Pectins and Galactomannans. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 497–527. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-091283-7.00099-0>.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11(3), 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>.
- Moore, J. P., Farrant, J. M., & Driouich, A. (2008). A role for pectin-associated arabinans in maintaining the flexibility of the plant cell wall during water deficit stress. *Plant Signaling and Behavior*, 3(2), 102–104. <https://doi.org/10.4161/psb.3.2.4959>.
- Morris, G. A., Butler, S. N. G., Foster, T. J., Jumel, K., & Harding, S. E. (1999). Elevated-temperature analytical ultracentrifugation of a low-methoxy polyuronide. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 113, 205–208. https://doi.org/10.1007/3-540-48703-4_30.
- Morris, G. A., Castile, J., Smith, A., Adams, G. G., & Harding, S. E. (2010). The effect of different storage temperatures on the physical properties of pectin solutions and gels. *Polymer Degradation and Stability*, 95(12), 2670–2673. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.07.013>.
- Morris, G. A., Foster, T. J., & Harding, S. E. (2002). A hydrodynamic study of the depolymerisation of a high methoxy pectin at elevated temperatures. *Carbohydrate Polymers*, 48(4), 361–367. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00270-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00270-3).
- Morris, G. A., Ralet, M. C., Bonnin, E., Thibault, J. F., & Harding, S. E. (2010). Physical characterisation of the rhamnogalacturonan and homogalacturonan fractions of sugar beet (Beta

vulgaris) pectin. Carbohydrate Polymers, 82(4), 1161–1167. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.049>.

Munarin, F., Tanzi, M. C., & Petrini, P. (2012). Advances in biomedical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules* 51(4), 681–689. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.07.002>.

Muralikrishna, G., Salimath, P. V., & Tharanathan, R. N. (1987). Structural features of an arabinoxylan and a rhamno-galacturonan derived from linseed mucilage. *Carbohydrate Research*, 161(2), 265–271. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90083-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90083-1).

Nakamura, A., Furuta, H., Maeda, H., Nagamatsu, Y., & Yoshimoto, A. (2001). Analysis of structural components and molecular construction of soybean soluble polysaccharides by stepwise enzymatic degradation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 65(10), 2249–2258. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.2249>.

Nečas, D., & Klapetek, P. (2012). Gwyddion: An open-source software for SPM data analysis. *Central European Journal of Physics*, 10(1). 181–188. <https://doi.org/10.2478/s11534-011-0096-2>.

Neckebroeck, B., Verkempinck, S. H. E., Bernaerts, T., Verheyen, D., Hendrickx, M. E., & Van Loey, A. M. (2021). Investigating the role of the different molar mass fractions of a pectin rich extract from onion towards its emulsifying and emulsion stabilizing potential. *Food Hydrocolloids*, 117, 106735. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106735>.

Neckebroeck, B., Verkempinck, S. H. E., Vaes, G., Wouters, K., Magnée, J., Hendrickx, M. E., & Van Loey, A. M. (2020). Advanced insight into the emulsifying and emulsion stabilizing capacity of carrot pectin subdomains. *Food Hydrocolloids*, 102. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105594>.

Ngouémazong, E. D., Christiaens, S., Shpigelman, A., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2015). The Emulsifying and Emulsion-Stabilizing Properties of Pectin: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(6), 705–718. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12160>.

Niklas, K. J., & Spatz, H.-C. (2012). *Plant Physics*. University of Chicago Press. <https://doi.org/10.7208/chicago/9780226586342.001.0001>.

- O'Neill, M. A., Ishii, T., Albersheim, P., & Darvill, A. G. (2004). Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 109–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141750>.
- O'Neill, M., Albersheim, P., & Darvill, A. (1990). The Pectic Polysaccharides of Primary Cell Walls. *W Methods in Plant Biochemistry*: 2(2). Academic Press Limited. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-461012-5.50018-5>.
- Oechslein, R., Lutz, M. V., & Amadò, R. (2002). Pectic substances isolated from apple cellulosic residue: Structural characterisation of a new type of rhamnogalacturonan I. *Carbohydrate Polymers*, 51(3), 301–310. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00214-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00214-X).
- Paniagua, C., Posé, S., Morris, V. J., Kirby, A. R., Quesada, M. A., & Mercado, J. A. (2014). Fruit softening and pectin disassembly: An overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Annals of Botany*. 114(6): 1375–1383). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu149>.
- Peña, M. J., & Carpita, N. C. (2004). Loss of highly branched arabinans and debranching of rhamnogalacturonan I accompany loss of firm texture and cell separation during prolonged storage of apple. *Plant Physiology*, 135(3), 1305–1313. <https://doi.org/10.1104/pp.104.043679>.
- Perez, S., Mazeau, K., & Penhoat, C. (2000). The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry - Plant Physiol Biochem*. 38: 37-55. [10.1016/S0981-9428\(00\)00169-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00169-8).
- Pieczywek, P. M., Koziół, A., Płaziński, W., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2020). Resolving the nanostructure of sodium carbonate extracted pectins (DASP) from apple cell walls with atomic force microscopy and molecular dynamics. *Food Hydrocolloids*, 104: 105726. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105726>.
- Pieczywek, P. M. (2022a). TDA. <https://github.com/ppieczywek/TDA>. Data dostępu: 05.12.2022.
- Pieczywek, P. M. (2022b). NanoPlot. <https://github.com/ppieczywek/NanoPlot>. Data dostępu: 05.12.2022.
- Pińkowska, H., & Złocińska, A. (2014). Pektyny-Występowanie, Budowa Chemiczna I Właściwości Pectins-Occurrence, Chemical Constitution And Physicochemical Properties (T. 68).

- Posé, S., Kirby, A. R., Mercado, J. A., Morris, V. J., & Quesada, M. A. (2012). Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. *Carbohydrate Polymers*, 88(3), 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.029>.
- Powell, D. A., Morris, E. R., Gidley, M. J., & Rees, D. A. (1982). Conformations and interactions of pectins. II. Influences of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. *Journal of molecular biology*, 155(4), 517–531. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90485-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90485-5).
- Prade, R. A., Ayoubi, P., Zhan, D., & Mort, A. J. (1999). Pectins, Pectinases and Plant-Microbe Interactions. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 16(1), 361–392. <https://doi.org/10.1080/02648725.1999.10647984>.
- Puskás, I., Szemjonov, A., Fenyvesi, É., Malanga, M., & Sente, L. (2013). Aspects of determining the molecular weight of cyclodextrin polymers and oligomers by static light scattering. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.025>.
- Ralet, M. C., Crépeau, M. J., Lefèbvre, J., Mouille, G., Höfte, H., & Thibault, J. F. (2008). Reduced number of homogalacturonan domains in pectins of an *Arabidopsis* mutant enhances the flexibility of the polymer. *Biomacromolecules*, 9(5), 1454–1460. <https://doi.org/10.1021/bm701321g>.
- Redgwell, R. J., Fischer, M., Kendal, E., & Macrae, E. A. (1997). Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* 203, 174–181 (1997). <https://doi.org/10.1007/s004250050179>.
- Redgwell, R. J., Fischer, M., Kendal, E., & MacRae, E. A. (1997). Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta*, 203(2), 174–181. <https://doi.org/10.1007/s004250050179>.
- Redgwell, R. J., Melton, L. D., & Brasch, D. J. (1992). Cell Wall Dissolution in Ripening Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) : Solubilization of the Pectic Polymers. *Plant physiology*, 98(1), 71–81. <https://doi.org/10.1104/pp.98.1.71>.
- Redgwell, R. J., & Selvendran, R. R. (1986). Structural features of cell-wall polysaccharides of onion *Allium cepa*. *Carbohydrate Research*, 157(C), 183–199. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(86\)85068-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(86)85068-6).

- Rees, D. A., & Wight, A. W. (1971). Polysaccharide conformation. Part VII. Model building computations for α -1,4 galacturonan and the kinking function of L-rhamnose residues in pectic substances. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*, 1366, 1366–1372. <https://doi.org/10.1039/J29710001366>.
- Renard, C. M. G. C. (2005). Variability in cell wall preparations: Quantification and comparison of common methods. *Carbohydrate Polymers*, 60(4), 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.03.002>.
- Renard, C. M. G. C., & Jarvis, M. C. (1999). A cross-polarization, magic-angle-spinning, ^{13}C -nuclear-magnetic-resonance study of polysaccharides in sugar beet cell walls. *Plant Physiology*, 119(4), 1315–1322. <https://doi.org/10.1104/pp.119.4.1315>.
- Renard, C. M. G. C., Lahaye, M., Mutter, M., Voragen, F. G. J., & Thibault, J. F. (1997). Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. *Carbohydrate Research*, 305(2), 271–280. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)10028-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)10028-3).
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *W Phytochemistry* (T. 57, Numer 6). [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00113-3).
- Rihouey, C., Morvan, C., Borissova, I., Jauneau, A., Demarty, M., & Jarvis, M. (1995). Structural features of CDTA-soluble pectins from flax hypocotyls. *Carbohydrate Polymers*, 28(2), 159–166. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00094-1](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00094-1).
- Round, A. N., Rigby, N. M., MacDougall, A. J., & Morris, V. J. (2010). A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydrate Research*, 345(4), 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.12.019>.
- Santiago, J. S. J., Kyomugasho, C., Maheshwari, S., Jamsazzadeh Kermani, Z., Van de Walle, D., Van Loey, A. M., Dewettinck, K., & Hendrickx, M. E. (2018). Unravelling the structure of serum pectin originating from thermally and mechanically processed carrot-based suspensions. *Food Hydrocolloids*, 77, 482–493. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.026>.
- Saulnier, L., Thibault, J.-F. (1999). Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 396–402. doi:10.1002/(sici)1097-0010(19990301)79:3<396::aid-jsfa262>3.0.co;2-b.

- Schmelter, T. (2002). Enzymatic modifications of pectins and the impact on their rheological properties. *Carbohydrate Polymers*, 47(2), 99–108. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00170-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00170-9).
- Schols, H. A., Bakx, E. J., Schipper, D., & Voragen, A. G. J. (1995). A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research: an international journal*, 279, 265–279. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00287-1](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00287-1).
- Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (1994). Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Research*, 256(1), 83–95. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)84229-9](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)84229-9).
- Sengkhampan, N., Verhoef, R., Schols, H. A., Sajjaanantakul, T., & Voragen, A. G. J. (2009). Characterisation of cell wall polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Carbohydrate Research*, 344(14), 1824–1832. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.10.012>.
- Seymour, G. B., Colquhoun, I. J., Dupont, M. S., Parsley, K. R., & R. Selvendran, R. (1990). Composition and structural features of cell wall polysaccharides from tomato fruits. *Phytochemistry*, 29(3), 725–731. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)80008-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)80008-5).
- Shakhmatov, E. G., Makarova, E. N., & Belyy, V. A. (2019). Structural studies of biologically active pectin-containing polysaccharides of pomegranate *Punica granatum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.146>.
- Shpigelman, A., Kyomugasho, C., Christiaens, S., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2014). Thermal and high pressure high temperature processes result in distinctly different pectin non-enzymatic conversions. *Food Hydrocolloids*, 39, 251–263. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.018>.
- Silveira, M. H. L., Siika-aho, M., Kruus, K., Garriga, L. M., & Ramos, L. P. (2014). The Essential Role of Plant Cell Wall Degrading Enzymes in the Success of Biorefineries: Current Status and Future Challenges. *W Biofuels in Brazil* (ss. 151–172). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05020-1_8.
- Sims, I. M., Smith, A. M., Morris, G. A., Ghori, M. U., & Carnachan, S. M. (2018). Structural and rheological studies of a polysaccharide mucilage from lacebark leaves (*Hoheria populnea*

- A. Cunn.). *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 839–847. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.142>.
- Smith, D. L., Abbott, J. A., & Gross, K. C. (2002). Down-regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiology*, 129(4), 1755–1762. <https://doi.org/10.1104/pp.011025>.
- Sneddon, I. N. (1965). The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science*, 3(1), 47–57. [https://doi.org/10.1016/0020-7225\(65\)90019-4](https://doi.org/10.1016/0020-7225(65)90019-4).
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., & Youngs, H. (2004). Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science*, 306(5705), 2206–2211. <https://doi.org/10.1126/science.1102765>.
- Sun, L., Ropartz, D., Cui, L., Shi, H., Ralet, M. C., & Zhou, Y. (2019). Structural characterization of rhamnogalacturonan domains from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Carbohydrate Polymers*, 203, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.045>.
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Cybulska, J., Kozioł, A., Pieczywek, P. M., & Zdunek, A. (2017). Simultaneous influence of pectin and xyloglucan on structure and mechanical properties of bacterial cellulose composites. *Carbohydrate Polymers*, 174, 970–979. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.004>.
- Szymańska-Chargot, M., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2011). Sensing the Structural Differences in Cellulose from Apple and Bacterial Cell Wall Materials by Raman and FT-IR Spectroscopy. *Sensors*, 11(6), 5543–5560. <https://doi.org/10.3390/s110605543>.
- Tateishi, A., Kanayama, Y., & Yamaki, S. (1996). α -L-arabinofuranosidase from cell walls of Japanese pear fruits. *Phytochemistry*, 42(2), 295–299. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00931-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00931-0).
- Thibault, J.-F., Renard, C. M. G. C., Axelos, M. A. V, Roger, P., & Crcpeau, M.-J. (1993). Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *W Carbohydrate Research* (T. 238).

- Thibault, J. F., Renard, C. M. G. C., Axelos, M. A. V, Roger, P., & Crépeau, M. J. (1993). Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 238(C), 271–286. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)87019-O](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)87019-O).
- Usov, I., & Mezzenga, R. (2015). FiberApp: An open-source software for tracking and analyzing polymers, filaments, biomacromolecules, and fibrous objects. *Macromolecules*, 48(5), 1269–1280. <https://doi.org/10.1021/ma502264c>.
- Van Audenhove, J., Bernaerts, T., De Smet, V., Delbaere, S., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2021). The Structure and Composition of Extracted Pectin and Residual Cell Wall Material from Processing Tomato: The Role of a Stepwise Approach versus High-Pressure Homogenization-Facilitated Acid Extraction. *Foods*, 10(5), 1064. <https://doi.org/10.3390/foods10051064>.
- Vincken, J.-P., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., Beldman, G., Visser, R. G. F., & Voragen, A. G. J. (2003). Pectin — the Hairy Thing. W *Advances in Pectin and Pectinase Research* (ss. 47–59). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0331-4_4.
- Voragen, A. G. J., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), 263–275. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>.
- Wai, W. W., Alkarkhi, A. F. M., & Easa, A. M. (2010). Effect of extraction conditions on yield and degree of esterification of durian rind pectin: An experimental design. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2–3), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.01.010>.
- Walkinshaw, M. D., & Arnott, S. (1981). Conformations and interactions of pectins. *Journal of Molecular Biology*, 153(4), 1055–1073. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90467-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90467-8).
- Willats, W. G. T., McCartney, L., Mackie, W., & Knox, J. P. (2001). Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis. W *Plant Molecular Biology* (T. 47, Numery 1–2, ss. 9–27). <https://doi.org/10.1023/A:1010662911148>.
- Wolf, S., Mouille, G., & Pelloux, J. (2009). Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular Plant*, 2(5), 851–860. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp066>.
- Yapo, B. M., Lerouge, P., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2007). Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass,

rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers*, 69(3), 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.024>.

Yu, Y., Wang, Y., Liu, X., Liu, Y., Ji, L., Zhou, Y., & Sun, L. (2021). Comparison of analytical methods for determining methylesterification and acetylation of pectin. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/app11104461>.

Zdunek, A., Koziół, A., Cybulska, J., Lekka, M., & Pieczywek, P. M. (2016). The stiffening of the cell walls observed during physiological softening of pears. *Planta*, 243(2), 519–529. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2423-0>.

Zdunek, A., Koziół, A., Pieczywek, P. M., & Cybulska, J. (2014). Evaluation of the Nanostructure of Pectin, Hemicellulose and Cellulose in the Cell Walls of Pears of Different Texture and Firmness. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3525–3535. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1365-z>.

Zdunek, A., Pieczywek, P. M., & Cybulska, J. (2021). The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 1101–1117. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12689>.

Zhang, B., Gao, Y., Zhang, L., & Zhou, Y. (2021). The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 251–272. <https://doi.org/10.1111/jipb.13055>.

Zhang, S., Hu, H., Wang, L., Liu, F., & Pan, S. (2018). Preparation and prebiotic potential of pectin oligosaccharides obtained from citrus peel pectin. *Food Chemistry*, 244, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.071>.

Zheng, J., Chen, J., Zhang, H., Wu, D., Ye, X., Linardt, R. J., & Chen, S. (2020). Gelling mechanism of RG-I enriched citrus pectin: Role of arabinose side-chains in cation- and acid-induced gelation. *Food Hydrocolloids*, 101. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105536>.

Zykwinska, A. W., Ralet, M. C. J., Garnier, C. D., & Thibault, J. F. J. (2005). Evidence for in vitro binding of pectin side chains to cellulose. *W Plant Physiology (T. 139, Numer 1, ss. 397–407)*. American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.105.065912>.

12. Oświadczenia współautorów



Lublin, 28.06.2024 r.

mgr Adrianna Kaczmarek-Król
Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest moim wkładem intelektualnym.

P.1: Kaczmarek Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2022, Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review, Carbohydrate Polymers, 278, 118909.

P.2: Kaczmarek Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2023, A mini-review on the plant sources and methods for extraction of rhamnogalacturonan I, Food Chemistry, 403.134378.

P.3: Kaczmarek Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Cieśla Jolanta, Zdunek Artur, 2024, Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot, Food Chemistry, 446, 138869.

P.4: Kaczmarek Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2024, Effect of enzymatic modification on the structure and rheological properties of diluted alkali-soluble pectin fraction rich in RG-I, Scientific Reports, 14, 11454.

Mój wkład w poniższe prace obejmował:

- współudział w opracowaniu metodyki wykorzystanej w badaniach,
- przegląd literatury,
- przygotowanie manuskryptów,
- współudział w opracowaniu koncepcji badań,
- przeprowadzenie zaplanowanych doświadczeń,
- analizę i interpretację wyników badań,
- edycję i korektę manuskryptu,
- uczestnictwo w odpowiedziach na recenzje.

Lublin, 28.06.2024 r.

prof. dr hab. Artur Zdunek
Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Adrianny Kaczmarskiej-Król.

P.1: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2022, Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review, Carbohydrate Polymers, 278, 118909.

P.2: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2023, A mini-review on the plant sources and methods for extraction of rhamnogalacturonan I, Food Chemistry, 403.134378.

P.3: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Cieśla Jolanta, Zdunek Artur, 2024, Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot, Food Chemistry, 446, 138869.

P.4: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2024, Effect of enzymatic modification on the structure and rheological properties of diluted alkali-soluble pectin fraction rich in RG-I, Scientific Reports, 14, 11454.

Mój wkład w poniższe prace obejmował:

- określenie problematyki i zakresu prac,
- pozyskanie środków finansowych umożliwiających realizację badań,
- kierowanie przebiegiem badań zgodnie z założeniami projektu,
- współudział w opracowaniu koncepcji badań,
- nadzorowanie prowadzonych badań,
- udział w analizie i interpretacji wyników badań,
- edycję i korektę manuskryptu,
- uczestnictwo w odpowiedziach na recenzje.





INSTYTUT
AGROFIZYKI
P A N

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższe publikacje zostały wykorzystane w rozprawie doktorskiej mgr Adrianny Kaczmarskiej-Król.

Instytut Agrofizyki
im. Bohdana Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk

ul. Doświadczalna 4
20-290 Lublin

tel.: 81 744 50 61
faks: 81 744 50 67
e-mail: sekretariat@ipan.lublin.pl

www.ipan.lublin.pl



INSTYTUT
AGROFIZYKI
PAN

Lublin, 28.06.2024 r.

dr hab. inż. Justyna Cybulska, prof. IA PAN
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Adrianny Kaczmarskiej-Król.

P.1: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2022, Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review, Carbohydrate Polymers, 278, 118909.

P.2: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2023, A mini-review on the plant sources and methods for extraction of rhamnogalacturonan I, Food Chemistry, 403.134378.

P.3: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Cieśla Jolanta, Zdunek Artur, 2024, Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot, Food Chemistry, 446, 138869.

P.4: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2024, Effect of enzymatic modification on the structure and rheological properties of diluted alkali-soluble pectin fraction rich in RG-I, Scientific Reports, 14, 11454.

Mój wkład w poniższe prace obejmował:

- współudziale w opracowaniu metodyki wykorzystanej w badaniach,
- wykonaniu analiz chromatograficznych,
- udziale w analizie i interpretacji wyników badań,
- edycji i korekcie manuskryptu,
- uczestnictwie w odpowiedziach na recenzje.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższe publikacje zostały wykorzystane w rozprawie doktorskiej mgr Adrianny Kaczmarskiej-Król.

Instytut Agrofizyki
im. Bohdana Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk

ul. Doświadczalna 4
20-290 Lublin

tel.: 81 744 50 61
faks: 81 744 50 67
e-mail: sekretariat@ipan.lublin.pl

www.ipan.lublin.pl



INSTYTUT
AGROFIZYKI
PAN

Lublin, 28.06.2024 r.

dr hab. Jolanta Cieśla
Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy, inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Adrianny Kaczmarzkiej-Król.

P.3: Kaczmarzka Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Cieśla Jolanta, Zdunek Artur, 2024, Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot, Food Chemistry, 446, 138869.

Mój wkład w poniższą pracę obejmował:

- wykonanie analiz średniej wagowo masy cząsteczkowej metodą statycznego rozpraszania światła laserowego (SLS),
- udział w analizie i interpretacji wyników badań,
- edycję i korektę manuskryptu,
- uczestnictwo w odpowiedziach na recenzje.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Adrianny Kaczmarzkiej-Król.

Jolanta Cieśla

Lublin, 28.06.2024 r.

dr hab. inż. Piotr M. Pieczywek
Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Adrianny Kaczmarskiej-Król.

P.1: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2022, Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review, Carbohydrate Polymers, 278, 118909.

P.2: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2023, A mini-review on the plant sources and methods for extraction of rhamnogalacturonan I, Food Chemistry, 403.134378.

P.3: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Cieśla Jolanta, Zdunek Artur, 2024, Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot, Food Chemistry, 446, 138869.

P.4: Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2024, Effect of enzymatic modification on the structure and rheological properties of diluted alkali-soluble pectin fraction rich in RG-I, Scientific Reports, 14, 11454.

Mój wkład w poniższe prace obejmował:

- współudziale w opracowaniu metodyki wykorzystanej w badaniach,
- udziale w analizie i interpretacji wyników badań,
- edycji i korekcie manuskryptu,
- uczestnictwie w odpowiedziach na recenzje.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższe publikacje zostały wykorzystane w rozprawie doktorskiej mgr Adrianny Kaczmarskiej-Król.

Podpisany elektronicznie przez
Piotr Mariusz Pieczywek
01.07.2024
17:47:42 +02'00'

13. Życiorys naukowy

Imię i nazwisko: Adrianna Kaczmarska-Król

Adres:

Miejsce pracy: Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin
Telefon: (81) 744 50 61 wew. 223
E-mail: a.kaczmarska@ipan.lublin.pl

Miejsce zamieszkania: Gabrieli Zapolskiej 15
20-834 Lublin
Telefon: 796 105 531

Dane osobowe:

Obywatelstwo: polskie

Data i miejsce urodzenia: 23.07.1996 Radom, Polska

Języki: polski, angielski

WYKSZTAŁCENIE

2020-2024 Stypendysta-doktorant, Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk

Projekt pt. „Mechaniczna rola pojedynczych jednostek ramnozy w łańcuchach homogalakuronianu z pektyn ekstrahowanych z roślinnych ścian komórkowych” 2019/35/O/NZ9/01387, finansowanym ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Preludium BIS 1.

2020 Magister chemii, Uniwersytet im. Marii Curie – Skłodowskiej w Lublinie
Tytuł pracy: Otrzymywanie hydroksyapatytu z wykorzystaniem surowców naturalnych.

ZAINTERESOWANIA NAUKOWE

- Struktura i funkcje polisacharydów roślinnych ścian komórkowych
- Reologia roztworów pektyn
- Mikroskopia AFM

WYKAZ OSIĄGNIĘĆ W PRACY NAUKOWO-BADAWCZEJ

PUBLIKACJE

Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2024, Effect of enzymatic modification on the structure and rheological properties of diluted alkali-soluble pectin fraction rich in RG-I, Scientific Reports, DOI: 10.1038/s41598-024-62180-2.

Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Cieśla Jolanta, Zdunek Artur, 2024, Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot, Food Chemistry, 446, 138869; DOI: 10.1016/j.foodchem.2024.138869

Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2023, A mini-review on the plant sources and methods for extraction of rhamnogalacturonan I, Food Chemistry, 403.134378; DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134378

Kaczmarska Adrianna, Pieczywek Piotr, Cybulska Justyna, Zdunek Artur, 2022, Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review, Carbohydrate Polymers, 278 (118909), str. 1-10, DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118909

UDZIAŁ W KONFERENCJACH NAUKOWYCH

KONFERENCJE KRAJOWE

Kaczmarska A., Pieczywek P. M., Zdunek A. *Badania in vitro nanostruktury pektyn związanych kowalencyjnie ze ścianą komórkową: porównanie pektyn z jabłka (Malus domestica Borkh.) oraz marchwi (Daucus carota subsp. sativus) (referat).* Warsztaty dla Młodych Badaczy, 25 października 2021 r., Lublin
Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 11.

Kaczmarska A., Pieczywek P. M., Cybulska J., Zdunek A., *Badania zmian struktury frakcji pektyn bogatej w ramnogalakturonian typu I z jabłek i marchwi w wyniku modyfikacji enzymatycznych (referat), XXVII Lubelskie Warsztaty Biofizyczne; Kazimierz nad Wisłą 26-27.05.2022.*
Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 16.

Kaczmarska A., Pieczywek P. M., Cybulska J., Zdunek A. *Wpływ wtrąceń pojedynczych jednostek ramnozy na właściwości strukturalne oraz reologiczne pektyn ekstrahowanych z roślinnych ścian komórkowych (referat), VI Konferencja Naukowa „Szkola Inżynierii Systemów BioTechnicznych”, 14–17.09.2022, Guzowy Piec.*

Kaczmarska A., Pieczywek P. M., Cybulska J., Zdunek A., *Wpływ enzymów pektynolitycznych (acetyloesteraza RG-I, endoliaza ramnogalakturonianu oraz*

arabinofuranozydaza) na mechanikę ścian komórkowych (referat wyróżniony), V Konferencja Doktorantów CZTERY ŻYWIOŁY - Współczesne Problemy w Naukach o Życiu 14.12.2022.

Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 23.

Kaczmarska A., Pieczywek P. M., Cybulska J., Zdunek A. Wpływ modyfikacji enzymatycznych na właściwości reologiczne pektyn rozpuszczalnych w słabych alkaliach (DASP) XXVIII Lubelskie Warsztaty Biofizyczne, Kazimierz nad Wisłą, 25-26 maja 2023 r. Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 19.

Kaczmarska A., Pieczywek P.M., Cybulska J., Van Audenhove J., Hendrickx M.E., Zdunek A. Badanie wpływu segmentów RG-I na właściwości pektyn poprzez enzymatyczne i chemiczne modyfikacje frakcji rozpuszczalnej w słabych alkaliach (DASP) (referat wyróżniony), VIII SYMPOZJUM INŻYNIERII ŻYWNOŚCI Warszawa, 1-3.07.2024.

Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 28.

KONFERENCJE MIĘDZYNARODOWE

Kaczmarska A., Pieczywek P. M., Zdunek A. *In vitro study on the nanostructure of the covalently linked pectins in cell walls: comparison of apple (*Malus domestica* Borkh.) and carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*) pectin (poster)*, 13th International Conference

on Agrophysics: Agriculture in changing climate, 15-16 listopada 2021 r., Lublin

Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 122.

Kaczmarska A., Pieczywek P. M., Cybulska J., Zdunek A., *Studies on changes in the structure of enzymatically treated rhamnogalacturonan-rich pectin from apple and carrot (referat online)*, 21th International Workshop for Young Scientists „BioPhys Spring 2022”;

31.05.2022, Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 48-49.

Kaczmarska A., Pieczywek P. M., Cybulska J., Zdunek A., *Structural changes of enzymatically treated rhamnogalacturonan-I rich fraction of pectin (poster)*, 15th Bratislava Symposium on Saccharides, Bratislava, 20-24.06.2022.

Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 85.

Kaczmarska A., Pieczywek P. M., Cybulska J., Cieśla J., Zdunek A. *Influence of enzymatic modifications of diluted alkali soluble pectin (DASP) fraction structure on rheological properties (referat online)*; 22nd International Workshop for Young Scientists BioPhys Spring 2023, Gödöllő, Węgry, 15-16.06.2023.

Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 33.

Kaczmarska A., Pieczywek P. M., Cybulska J., Zdunek A. *Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot (poster)*; XVI Plant Cell Wall Meeting of Malaga, Hiszpania, (Malaga) 18-23.06.2023.

Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 87.

Kaczmarska A., Pieczywek P.M., Cybulska J., Van Audenhove J., Hendrickx M.E., Zdunek A. Evaluation of the impact of RG-I segments on the properties of pectin obtained by enzymatic and chemical modifications of apple and carrot diluted alkali-soluble pectin (DASP) fraction (poster); 23rd International Workshop for Young Scientists „BioPhys Spring 2024”, Lublin, Polska, 23-24.05.2024.

Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 57-58.

WSPÓŁAUTORSTWO DONIESIEŃ KONFERENCYJNYCH

Kaczmarska A., Pieczywek P. M., Cybulska J., Cieśla J., Zdunek A. 2023, The role of rhamnose and arabinose for the structure and rheology of pectin, and cell wall mechanics, 14th International Conference on Agrophysics (ICA 2023); Lublin, Polska, 11-13 września 2023 r., 131-131.

Kaczmarska A., Pieczywek P. M., Cybulska J., Cieśla J., Zdunek A. 2023, The role of rhamnose and arabinose for the structure and rheology of pectin, and cell wall mechanics, XVI Plant Cell Wall Meeting, Málaga, 18-22 czerwca 2023 r., PP14., 89.

WYKAZ REALIZOWANYCH PROJEKTÓW BADAWCZYCH FINANSOWANYCH ZE ŹRÓDEŁ ZEWNĘTRZNYCH

2020 – 2024

Stypendysta w Projekcie pt. **„Mechaniczna rola pojedynczych jednostek ramnozy w łańcuchach homogalakuronianu z pektyn ekstrahowanych z roślinnych ścian komórkowych”** 2019/35/O/NZ9/01387, finansowanym ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Preludium BIS 1.

Główne zadania: projektowanie badań i eksperymentów; prace laboratoryjne i analiza danych (AFM, FT-IR, reologia, przygotowanie próbek, analizy chemiczne); prezentowanie wyników badań na konferencjach krajowych i międzynarodowych, przygotowywanie manuskryptów publikacji.

2024 – obecnie

Kierownik Projektu pt. **„Wpływ struktury frakcji pektyn rozpuszczalnej w słabych alkaliach (DASP) na stabilność fizyczną emulsji”** 2023/49/N/NZ9/01701, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Preludium 22.

Główne zadania: zarządzanie realizacją i nadzór nad Projektem, kontrola budżetu projektu, przegląd merytoryczny i wykonawczy prowadzonych badań, przygotowanie próbek, wykonywanie analiz chemicznych, upowszechnianie wyników, przygotowywanie podsumowań przebiegu badań na potrzeby sporządzenia wymaganych raportów okresowych, rocznych i raportu końcowego z realizacji projektu.

2024 – obecnie

Wykonawca w Projekcie pt. **„Badania i upowszechnianie wiedzy o zawartości pektyn, celulozy i błonnika w owocach i warzywach”** 2023/49/N/NZ9/01701, finansowanego ze środków Ministerstwa Edukacji i Nauki w ramach Programu „Nauka dla Społeczeństwa II”.

Główne zadania: analizy chemiczne zawartości poszczególnych składników ścian komórkowych, upowszechnianie wyników projektu.

STAŻE

01.09-01.12.2023

Stypendium w ramach Programu NAWA Preludium Bis 1 (PPN/STA/2021/1/00072/U/00001) w Laboratory of Food Technology, KU Leuven (International Scholar in Faculty of Bioscience Engineering)

WSPÓŁPRACA

Współpraca z Prof. Marc Hendrickx i Dr. Ir. Jelle Van Audenhove (KU Leuven, Laboratory of Food Technology Centre of Food and Microbial Technology Department of Microbial and Molecular Systems M2S) w zakresie charakterystyki właściwości i funkcji frakcji DASP.

POPULARYZACJA NAUKI

Seria pokazów dla dzieci i młodzieży z projektem pt. „Mokre eksperymenty” na XVII Lubelskim Festiwalu Nauki, 18-24.09.21.

PEŁNIONE FUNCJE

- Reprezentant Rady Samorządu Doktorantów w Radzie Naukowej IA PAN w latach 2020-2024;
- Przewodnicząca Rady Samorządu Doktorantów IA PAN w roku akademickim 2023/2024;
- Sekretarz Rady Samorządu Doktorantów IA PAN w roku akademickim 2022/2023;
- Przewodnicząca Komitetu organizacyjnego konferencji, VI Konferencja Doktorantów Cztery Żywioty Współczesne Nauki o Życiu 14.12.23;
- Specjalista na stanowisku badawczo-technicznym w Zakładzie Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów (01.01.2024-obecnie).