

INSTYTUT AGROFIZYKI
IM. BOHDANA DOBRZAŃSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Patrycja Karolina Pękala

**Zmiany stopnia O-acetylacji niecelulozowych polisacharydów
podczas rozwoju i dojrzewania owoców
i ich wpływ na właściwości mechaniczne i mikrostrukturę
tkanki roślinnej**

Changes of *O*-acetylation degree of non-cellulosic
polysaccharides during fruit development and ripening and its
influence on mechanical properties and microstructure of plant
tissue

Praca doktorska

Doctoral thesis

Praca doktorska przygotowana pod kierunkiem

Promotora: dr hab. Moniki Szymańskiej-Chargot, prof. IA PAN



© Patrycja Pękala

Lublin 2025

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...*12.09.2025*... Podpis promotora rozprawy ...*Paulina Ignaciak*.....

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...*12.09.2025*... Podpis autora rozprawy ...*Paulina Ignaciak*.....

*Serdecznie dziękuję dr hab. Monice Szymańskiej-Chargot
za okazane wsparcie, życzliwość i wskazówki naukowe,
które pomogły mi przy realizacji niniejszej pracy doktorskiej.*

*Dziękuję również Rodzinie i Bliskim za otuchę w chwilach
trudnych i motywację do rozwoju oraz za wspólną radość z
sukcesów.*



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Badania do rozprawy doktorskiej zostały przeprowadzone w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, pt. „Zmiany stopnia acetylacji niecelulozowych polisacharydów podczas rozwoju i dojrzewania owoców i ich wpływ na właściwości mechaniczne i mikrostrukturę tkanki roślinnej” (PRELUDIUM BIS 2, 2020/39/O/NZ9/00241).



NARODOWA AGENCJA
WYMIANY AKADEMICKIEJ

Autor uzyskał finansowanie w ramach projektu Programu zagranicznych staży doktorskich NAWA PRELUDIUM BIS 2 (BPN/PRE/2022/1/00100/U/00001).

Streszczenie

Roślinna ściana komórkowa jest wysoko zorganizowaną strukturą, której głównymi składnikami są polisacharydy, takie jak celuloza, hemicelulozy i pektyny. Stanowi ona integralny element budowy komórek roślinnych, nadający im kształt i pełniący wiele kluczowych funkcji, w tym zapewnienie wytrzymałości mechanicznej, zdolności do rozciągania oraz transportu wody i składników odżywczych. Roślinna ściana komórkowa jest dynamicznym układem, który ulega modyfikacjom odpowiednio do fazy rozwoju rośliny, warunkując również właściwości mechaniczne tkanek owoców. Za kluczowy czynnik wpływający na zmiany tych właściwości, w tym utratę jędrności owoców, uznawana jest degradacja pektyn. Nadal jednak brakuje doniesień literaturowych dotyczących roli hemiceluloz w tym procesie.

W roślinnej ścianie komórkowej zachodzą oddziaływania pomiędzy jej komponentami, które warunkują powyższe funkcje makroskopowe. Wiadomo, że hemicelulozy, pektyny, glikoproteiny i celuloza są w bliskim kontakcie w ścianie, jednakże badania nad tymi oddziaływaniami wciąż nie są wysyczone.

Wiadomo, że natywne hemicelulozy są acetylowane, co wpływa na ich właściwości fizykochemiczne. Z kolei pektyny mogą być zarówno metylowane, jak i acetylowane. Oba podstawniki stanowią istotny element struktury polisacharydów niecelulozowych i mogą wpływać na oddziaływania z celulozą. Zgodnie z tym, że liniowe łańcuchy hemiceluloz, bogate w grupy hydroksylowe, wykazują wysokie powinowactwo do celulozy, postawiono hipotezę badawczą, że **acetylacja polisacharydów niecelulozowych utrudnia ich oddziaływania z mikrofibrylami celulozy, a tym samym zmniejsza integralność ściany komórkowej i tkanki roślinnej**. Powyższa hipoteza została zweryfikowana badaniami owoców dwóch odmian jabłoni w różnych terminach dojrzałości przedzbiorczej i pozbiorczego przechowywania. Głównym celem rozprawy doktorskiej było **określenie wpływu stopnia acetylacji polisacharydów niecelulozowych (hemiceluloz, pektyn) na właściwości mechaniczne i mikrostrukturę tkanki roślinnej**.

Rozprawa doktorska obejmuje trzy główne etapy badawcze. Pierwszy, dotyczy badań ilościowych, przeglądu zmian składu monosacharydowego, stopnia acetylacji frakcji pektyn i hemiceluloz izolowanych ze ściany komórkowej jabłek odmiany Idared i Pinova oraz korelacji tych zmian z utratą jędrności podczas przechowywania owoców.

Drugi, obejmuje badania jakościowe zmian zachodzących w strukturze polisacharydów, z wykorzystaniem spektroskopii FT-IR i Ramana. Badania mikroskopii Ramana ujawniają lokalizację polisacharydów w ścianie komórkowej, z rozróżnieniem hemiceluloz acetylowanych i deacetylowanych oraz pektyn nisko- i wysokoestryfikowanych. Trzeci, to modelowe badania adsorpcyjne, które mają na celu wykazanie oddziaływań pomiędzy hemicelulozami/pektynami a celulozą oraz określenie wpływu acetylacji polisacharydów niecelulozowych na te oddziaływania.

Badania wykazały, że jabłka odmiany Idared i Pinova miały podobną jędrność w okresie dojrzałości przedzbiorczej oraz w terminie zbioru, natomiast podczas trzymiesięcznego przechowywania jabłka odmiany Idared znacznie zmiękły. Jabłka odmiany Pinova zawierały więcej pektyn rozgałęzionych, natomiast odmiany Idared obfitowały w liniowe homogalakturonany. Stopień acetylacji hemiceluloz frakcji rozpuszczalnych w LiCl-DMSO wzrósł w badanych terminach dla jabłek obu odmian. Oprócz korelacji składu i cech strukturalnych pektyn, wykazano negatywną korelację acetylowanych hemiceluloz z jędrnością jabłek. Badania spektroskopii FT-IR i Ramana oraz analiza PCA potwierdziły zmiany w strukturze pektyn i hemiceluloz. Uwydatniły znaczenie zmian stopnia acetylacji hemiceluloz, a szczególnie acetylowanego glukomannanu, zachodzących podczas przebudowy ściany komórkowej w badanych okresach. Za pomocą mapowania ramanowskiego w połączeniu z analizą obrazu zlokalizowano polisacharydy ściany komórkowej. Pektyny niskoestryfikowane wykazywały tendencję do gromadzenia się w narożnikach połączeń komórkowych, a wysokoestryfikowane były rozłożone równomierne w ścianie. Z powodzeniem rozróżniono hemicelulozy acetylowane i deacetylowane w ścianie komórkowej. Po trzech miesiącach przechowywania acetylowane hemicelulozy dominowały w ścianie komórkowej jabłek, szczególnie odmiany Idared. Hemicelulozy nie wykazały specyficznych skupisk, jednakże bardziej równomierne rozłożenie w ścianie zaobserwowano dla acetylowanych hemiceluloz. Modelowe badania adsorpcyjne wykazały jedynie adsorpcję hemiceluloz: ksylanu, ksyloglukanu, glukomannanu i β -D-glukanu na celulozie mikrofibrylarnej. Największą adsorpcję odnotowano dla glukomannanu. Acetylacja hemiceluloz nie wpłynęła na kinetykę adsorpcji na celulozie, natomiast dla ksyloglukanu i glukomannanu spowodowała wzrost adsorpcji. Wynika to z niskiego stopnia podstawienia grupami acetylowymi hemicelulozy, które nie stanowią przeszkody sterycznej w oddziaływaniach z celulozą, lecz mogą zmniejszać

samoasocjację łańcuchów polimerowych, która jest konkurencyjnym procesem tych oddziaływań. Ponadto podstawniki acetylowe mogą sprzyjać oddziaływaniom hydrofobowym z celulozą.

Słowa kluczowe: acetylacja, hemicelulozy, pektyny, roślinna ściana komórkowa, jędrność, jabłka, spektroskopia FT-IR, spektroskopia Ramana, obrazowanie Ramana, adsorpcja

Abstract

The plant cell wall is a highly organized structure whose main components are polysaccharides such as cellulose, hemicellulose, and pectin. It surrounds plant cells, providing their shape and performing many key functions, including mechanical strength, extensibility, water and nutrient transport. The plant cell wall is a dynamic system that undergoes modifications during plant development, determining the mechanical properties of fruit tissue. Pectin degradation is considered a key factor influencing changes in mechanical properties, including loss of fruit firmness. However, there is still a lack of literature reports on the role of hemicelluloses in this process.

Interactions between the plant cell wall components determine the above macroscopic functions. It is known that hemicelluloses, pectins, glycoproteins, and cellulose are in close contact within the wall, but research on these interactions is still ongoing.

It is known that native hemicelluloses are acetylated, which affects their physicochemical properties. In turn, pectins can be both methylated and acetylated. These substituents are a crucial component of the structure of non-cellulose polysaccharides and can significantly influence interactions with cellulose. In accordance with the fact that linear hemicellulose chains rich in hydroxyl groups show high affinity for cellulose, a research hypothesis was put forward that **acetylation of non-cellulose polysaccharides hinders their interaction with cellulose microfibrils, thereby reducing the integrity of the plant cell wall and tissue**. This hypothesis was verified by studies based on two apple varieties with different pre-harvest and post-harvest storage terms. The main objective of the doctoral dissertation was to **determine the effect of the degree of acetylation of non-cellulose polysaccharides (hemicelluloses, pectins) on the mechanical properties and microstructure of plant tissue**.

The doctoral dissertation covers three main stages of research. The first stage concerns quantitative research, a review of changes in monosaccharide composition, the degree of acetylation of pectin and hemicellulose fractions isolated from the cell walls of Idared and Pinova apples, and the correlation of these changes with the loss of firmness during fruit storage. The second stage presents qualitative research on changes in the structure of polysaccharides using FT-IR and Raman spectroscopy. In addition, Raman microscopy studies reveal the localisation of polysaccharides in the cell wall, with a

distinction between acetylated and deacetylated hemicelluloses and low- and high-esterified pectins. The third is model adsorption studies aimed at demonstrating the interactions between hemicelluloses/pectins and cellulose and determining the effect of acetylation of non-cellulose polysaccharides on these interactions.

The study showed that Idared and Pinova apples had similar firmness during pre-harvest maturity and at harvest term, while during three months of storage, only Idared apples significantly softened. Pinova contained more branched pectins, while Idared was rich in linear homogalacturonans. The degree of acetylation of hemicelluloses soluble in LiCl-DMSO increased in the tested terms for Idared and Pinova apples. In addition to the correlation between the composition and structural characteristics of pectins, a negative correlation between acetylated hemicelluloses and apple firmness was demonstrated. FT-IR and Raman spectroscopy studies and PCA analysis confirmed changes in the structure of pectins and hemicelluloses. They emphasized the importance of changes in the degree of acetylation of hemicelluloses, especially acetylated glucomannan, occurring during cell wall remodeling in the tested terms. Raman mapping combined with image analysis was used to localize cell wall polysaccharides. Low-esterified pectins tended to accumulate in the corners of cell junctions, while highly esterified pectins were evenly distributed throughout the wall. Acetylated and deacetylated hemicelluloses in the cell wall were successfully distinguished.

Acetylated hemicelluloses dominated the cell wall of apples after three months of storage, especially for the Idared variety. Hemicelluloses did not show specific clusters, however, a more even distribution in the wall was observed for acetylated hemicelluloses. Model adsorption studies showed only the adsorption of hemicelluloses: xylan, xyloglucan, glucomannan, and β -D-glucan on microfibrillar cellulose. The highest adsorption was observed for glucomannan. Acetylation of hemicellulose did not affect the kinetics of adsorption on cellulose, but caused an increase in adsorption for xyloglucan and glucomannan. This is due to the low degree of substitution of hemicellulose with acetyl groups, which do not constitute a steric hindrance in interactions with cellulose, but can reduce the self-association of polymer chains, which is a competitive process of these interactions. In addition, acetyl substituents may promote hydrophobic interactions with cellulose.

Keywords: acetylation, hemicellulose, pectins, plant cell wall, firmness, apples, FT-IR spectroscopy, Raman spectroscopy, Raman imaging, adsorption

Spis treści

Lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej	13
Lista skrótów	15
1. Wstęp	17
1.1. Roślinna ściana komórkowa	17
1.2. Celuloza	18
1.3. Hemicelulozy	19
1.4. Pektyny.....	20
1.5. Oddziaływania w roślinnej ścianie komórkowej	22
2. Hipoteza badawcza i cele rozprawy doktorskiej	25
3. Materiały i metody	27
3.1. Materiał roślinny	27
3.2. Podstawowa ocena dojrzałości zbiorczej owoców.....	27
3.3. Ekstrakcja materiału ściany komórkowej	28
3.4. Ekstrakcja sekwencyjna polisacharydów ściany komórkowej.....	29
3.4.1. Skład monosacharydowy	30
3.4.2. Stopień acetylacji i metylacji	31
3.4.3. Spektroskopia FT-IR.....	31
3.4.4. Spektroskopia Ramana.....	32
3.5. Obrazowanie Ramana	32
3.5.1. Przygotowanie próbek.....	32
3.5.2. Pomiar map ramanowskich	33
3.5.3. Analiza obrazów Ramana	33
3.6. Badania adsorpcji.....	34
3.6.1. Materiały	34
3.6.1.1. Całkowita liczba grup kwasowych celulozy	35
3.6.1.2. Krystaliczność celulozy	35
3.6.2. Kinetyka adsorpcji	35
3.6.3. Równowaga adsorpcji	36
3.6.4. Model adsorpcji.....	36
3.7. Analiza statystyczna.....	37
4. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach	38
4.1. Publikacja P.1	38
4.2. Publikacja P.2	40
4.2.1. Ocena dojrzałości owoców	40
4.2.2. Skład monosacharydowy	41

4.2.3.	Stopień acetylacji	43
4.2.4.	Analiza statystyczna.....	43
4.2.5.	Wnioski	44
4.3.	Publikacja P.3	46
4.3.1.	Fracje polisacharydów izolowanych ze ściany komórkowej jabłek	46
4.3.2.	Wyniki spektroskopii FT-IR	46
4.3.3.	Wyniki spektroskopii Ramana	48
4.3.4.	Obrazowanie Ramana	49
4.3.5.	Wnioski	50
4.4.	Publikacja P.4	50
4.4.1.	Kinetyka i równowaga adsorpcji.....	51
4.4.2.	Charakterystyka układów celuloza – hemiceluloza	51
4.4.3.	Właściwości mechaniczne filmów celulozowo-hemicelulozowych	52
4.4.4.	Wnioski	52
5.	Omówienie wyników przedstawionych w materiałach uzupełniających	53
5.1.	Opracowanie metody acetylacji hemiceluloz.....	53
5.1.1.	Wstęp	53
5.1.2.	Metody	55
5.1.2.1.	Metody acetylacji	55
5.1.2.2.	Otrzymywanie acetylowanego ksyloglukanu i glukomannanu.....	56
5.1.2.3.	Charakterystyka acetylowanych hemiceluloz	57
5.1.2.3.1.	Oznaczenie DsAc hemiceluloz.....	57
5.1.2.3.1.1.	Hydroliza.....	57
5.1.2.3.2.	Oznaczenie stężenia kwasu octowego.....	58
5.1.2.3.3.	Obliczenia DsAc	58
5.1.2.4.	Spektroskopia FT-IR	59
5.1.3.	Wyniki.....	59
5.1.3.1.	Charakterystyka acetylowanych hemiceluloz	59
5.1.4.	Dyskusja i wnioski	64
5.2.	Adsorpcja acetylowanych hemiceluloz na celulozie mikrofibrylarnej	65
5.2.1.	Wstęp	65
5.2.2.	Materiały i metody	67
5.2.2.1.	Acetylowane hemicelulozy	67
5.2.2.2.	Eksperyment adsorpcji.....	67
5.2.2.3.	Spektroskopia ss-NMR	68
5.2.3.	Wyniki.....	68

5.3.	Dyskusja i wnioski	73
6.	Podsumowanie i wnioski	75
7.	Tekst publikacji P.1	79
7.1.	Materiały uzupełniające publikacji P.1	98
8.	Tekst publikacji P.2	101
8.1.	Materiały uzupełniające publikacji P.2	117
9.	Tekst publikacji P.3	123
9.1.	Materiały uzupełniające publikacji P.3	138
10.	Tekst publikacji P.4	146
10.1.	Materiały uzupełniające publikacji P.4	158
11.	Bibliografia	162
12.	Oświadczenia współautorów	171
13.	Życiorys naukowy	179

Lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

Niniejsza rozprawa doktorska jest oparta na cyklu publikacji pod tytułem:

„Zmiany stopnia *O*-acetylacji niecelulozowych polisacharydów podczas rozwoju i dojrzewania owoców i ich wpływ na właściwości mechaniczne i mikrostrukturę tkanki roślinnej”

P.1: Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A. (2023). Interactions between non-cellulosic plant cell wall polysaccharides and cellulose emerging from adsorption studies. *Cellulose*, 30, 9221-9239

Czasopismo umieszczone w bazie ISI Journal Citation Reports,

Impact Factor (2023): 4,9

Punktacja MNiSW (2023): 100

Indywidualny wkład: Przegląd literatury i przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, przygotowanie grafik, udział w korekcie i w odpowiedziach na recenzje.

P.2: Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Cybulska, J., Zdunek, A. (2025). Monosaccharide composition and degree of acetylation of non-cellulosic cell wall polysaccharides and their relationship to apple firmness. *Food Chemistry*, 470, 142639.

Czasopismo umieszczone w bazie ISI Journal Citation Reports,

Impact Factor (2024): 9,8

Punktacja MNiSW (2024): 200

Indywidualny wkład: Przeprowadzenie izolacji materiału ściany komórkowej i ekstrakcji sekwencyjnej polisacharydów, obliczeń stopnia acetylacji i metylacji, testów statystycznych, pomiarów jędrności jabłek i parametrów fizykochemicznych, analiza danych i sporządzenie wniosków. Udział w dyskusji i interpretacji wyników. Przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, udział w korekcie i w odpowiedziach na recenzje.

P.3: Pękała, P., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A. (2025). Acetylated hemicelluloses and esterified pectin alterations in apple cell walls during the development of two apple cultivars: Insights from FT-IR, Raman spectroscopy, and imaging. *Food Chemistry*, 493, 146129.

Czasopismo umieszczone w bazie ISI Journal Citation Reports,

Impact Factor (2024): 9,8

Punktacja MNiSW (2024): 200

Indywidualny wkład: Przygotowanie materiałów do badań, wykonanie widm FT-IR i Ramana, mapowania Ramanowskiego i analizy obrazu, analiza wyników i sporządzenie wniosków. Udział w dyskusji i interpretacji wyników. Przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, udział w korekcie i w odpowiedziach na recenzje.

P.4: Szymańska-Chargot, M., Pękała, P., Myśliwiec, D., Cieśla, J., Pieczywek, P. M., Siemińska-Kuczer, A., Zdunek, A. (2024). A study of the properties of hemicelluloses adsorbed onto microfibrillar cellulose isolated from apple parenchyma. *Food Chemistry*, 430, 137116.

Czasopismo umieszczone w bazie ISI Journal Citation Reports,

Impact Factor (2024): 9,8

Punktacja MNiSW: 200

Indywidualny wkład: Przeprowadzenie badań kinetyki i równowagi adsorpcji. Przygotowanie próbek do badań właściwości elektrokinetycznych. Udział w analizie wyników adsorpcyjnych i przygotowaniu części metodycznej pierwszej wersji manuskryptu. Udział w dyskusji i interpretacji wyników.

Uzupełnieniem opublikowanych badań są wyniki przedstawione w rozdziale 5:

5.1: Opracowanie metody acetylacji hemiceluloz

5.2: Adsorpcja acetylowanych hemiceluloz na celulozie mikrofibrylarnej

Lista skrótów

Skrót	Wyjaśnienie po angielsku	Wyjaśnienie po polsku
AGP	<i>Arabinogalactan proteins</i>	Białka arabinogalaktanowe
Ara	<i>Arabinose</i>	Arabinoza
ATP	<i>Adenosine 5'-triphosphate</i>	Adenozyno5'-trifosforan
CGMD	<i>Coarse-grained Molecular Dynamics</i>	Gruboziarnista dynamika molekularna
CoA	<i>Coenzyme A</i>	Koenzym A
DAC	<i>Degree of acetylation</i>	Stopień acetylacji
DE	<i>Degree of esterification</i>	Stopień estryfikacji
DM	<i>Degree of methylation</i>	Stopień metylacji
DsAc	<i>Degree of substitution of the acetyl groups</i>	Stopień podstawienia grupami acetylowymi
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>	Skaningowa kalorymetria różnicowa
F	<i>Firmness</i>	Jędrność
FT-IR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
Fuc	<i>Fucose</i>	Fukoza
Gal	<i>Galactose</i>	Galaktoza
GalA	<i>Galacturonic acid</i>	Kwas galakturonowy
Gl	<i>β-D-glucan</i>	β -D-glukan
GlcA	<i>Glucuronic Acid</i>	Kwas glukuronowy
Glm	<i>Glucomannan</i>	Glukomannan
HG	<i>Homogalacturonan</i>	Homogalakturonan
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
ISP	<i>Fraction of imidazole soluble pectin</i>	Frakcja pektyn rozpuszczalnych w imidazolu
KOH	<i>Fraction of deacetylated hemicelluloses soluble in KOH</i>	Frakcja deacetylowanych hemiceluloz rozpuszczalnych w KOH

LiCl-DMSO	<i>Fraction of natively acetylated hemicelluloses soluble in LiCl-DMSO</i>	Frakcja natywnie acetylowanych hemiceluloz rozpuszczalnych w LiCl-DMSO
Man	<i>Mannose</i>	Mannoza
MD	<i>Molecular dynamics</i>	Dynamika molekularna
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>	graniczna masa cząsteczkowa
NAD ⁺	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>	Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
PCA	<i>Principal component analysis</i>	Analiza głównych składowych
PCW	<i>Primary cell wall</i>	Pierwotna ściana komórkowa
PVP	<i>Polyvinylpyrrolidone</i>	Poliwinylopirolidon
RG I	<i>Rhamnogalacturonan type I</i>	Ramnogalakturonan typu I
RGII	<i>Rhamnogalacturonan type II</i>	Ramnogalakturonan typu II
Rha	<i>Rhamnose</i>	Ramnoza
SCW	<i>Secondary cell wall</i>	Wtórna ściana komórkowa
SSC	<i>Soluble solid content</i>	Zawartość rozpuszczalnych substancji stałych
WSP	<i>Fraction of water soluble pectin</i>	Frakcja pektyn rozpuszczalnych w wodzie
Xlg	<i>Xyloglucan</i>	Ksyloglukan
Xn	<i>Xylan</i>	Ksylan
XRD	<i>X-ray diffraction</i>	Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego
Xyl	<i>Xylose</i>	Ksyloza
ZP	<i>Zeta Potential</i>	Potencjał zeta (elektrokinetyczny)

1. Wstęp

1.1. Roślinna ściana komórkowa

Ściana komórkowa, zlokalizowana bezpośrednio nad błoną cytoplazmatyczną oddzielającą od niej pozostałe elementy protoplasu, jest niezwykle ważnym komponentem komórki roślinnej. Przede wszystkim stanowi główną barierę między środowiskiem zewnętrznym, a wnętrzem komórki, chroniąc je przed działaniem biotycznych i abiotycznych stresorów (Showalter, 1993; Tenhaken, 2015; Zhong i Ye, 2007). Bierze udział w transporcie wody i składników odżywczych. Nadaje kształt oraz odpowiada za wytrzymałość mechaniczną komórki (Bidhendi i Geitmann, 2016; Cosgrove, 1993; Roland i Vian, 1979), a jednocześnie jej struktura pozostaje elastyczna w czasie wzrostu komórki. Rozróżnia się pierwotną i wtórną roślinną ścianę komórkową. Podczas wzrostu komórki syntetyzowana jest cienka i silnie uwodniona pierwotna ściana komórkowa (PCW, z ang. *primary cell wall*), która jest rozciągliwa i wytrzymała na ciśnienie turgorowe (Geitmann, 2010). Po zakończeniu wzrostu komórki powstaje wtórna ściana komórkowa (SCW, z ang. *secondary cell wall*), która jest grubsza niż PCW, sztywna i odpowiedzialna za wytrzymałość mechaniczną komórki (Zhong i in., 2019). Głównym budulcem roślinnej ściany komórkowej są polisacharydy: celuloza, hemicelulozy i pektyny, przy czym PCW zawiera również białka strukturalne (tj. AGP, białka arabinogalaktanowe), natomiast SCW, która jest uboższa w pektyny, dodatkowo zawiera ligniny (Cosgrove i Jarvis, 2012).

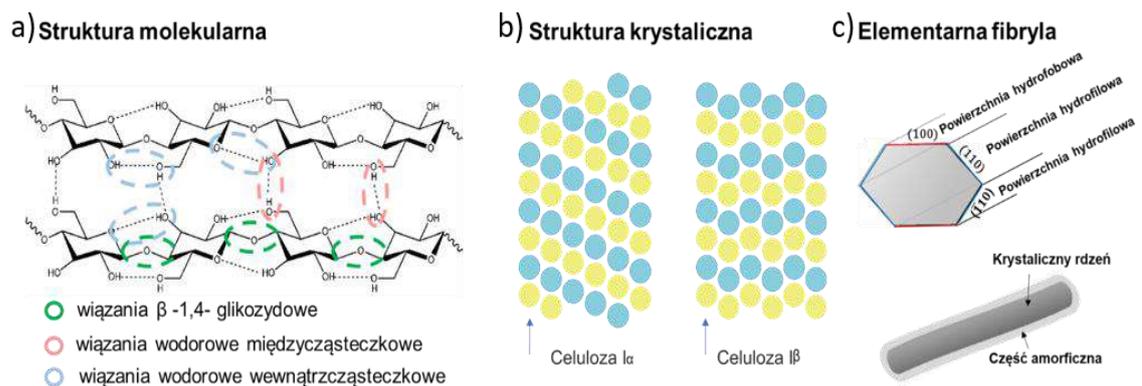
Roślinna ściana komórkowa oprócz pełnionych kluczowych funkcji w roślinie, jest również wartościowym materiałem pod względem gospodarczym. Polisacharydy ściany komórkowej są źródłem błonnika pokarmowego, który jest korzystnym składnikiem diety człowieka i zwierząt (Spiller i in., 1975, van Soest i in., 1991). Dodatkowo, badania nad strukturą roślinnej ściany komórkowej i procesami jakie w niej zachodzą podczas rozwoju rośliny są istotne dla sektora rolno-spożywczego, ponieważ ściana komórkowa warunkuje jakość owoców i warzyw. Między innymi jej struktura wpływa na jędrność owoców, która jest jednym z głównych parametrów w ocenie ich dojrzałości zbiorczej. Utrata jędrności to jeden z kluczowych problemów podczas pozbiornego przechowywania owoców, w tym jabłek (Hasan i in., 2024; Johnston i in., 2002). Ponadto celuloza, hemicelulozy i ligniny są kluczowymi elementami biomasy wykorzystywanej do produkcji biopaliw (de Souza i in., 2013). Odpady rolnicze i przetwórstwa żywnościowego są wciąż niedocenianym źródłem cennych

polisacharydów, które z uwagi na właściwości fizykochemiczne znajdują szereg zastosowań w przemyśle (Li i in., 2020). Kompozyty na bazie celulozy i hemiceluloz to obiecujące materiały, których proces wytwarzania jest wciąż udoskonalany w celu otrzymania materiałów opakowaniowych wysokiej jakości (Chen i in., 2016; Macedo i in., 2022; Mugwagwa i Chimphango, 2020). Ogólnie, włókna celulozowe z uwagi na dobrą wytrzymałość mechaniczną wykorzystywane są w produkcji tekstyliów i papieru (Li i in., 2020). Polisacharydy stosowane są również jako bioadsorbenty w procesach oczyszczania wody z metali ciężkich (Zhao, 2011). Znalazły wiele zastosowań także w kosmetyce, farmacji i medycynie (Bais i in., 2005; Gong i in., 2022; Mohammed i in., 2021).

1.2. Celuloza

Celuloza jest homopolimerem zbudowanym z łańcucha reszt D-glukozy połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Jej właściwości fizyczne, takie jak masa cząsteczkowa i stopień krystaliczności, zależą od źródła pochodzenia (Saxena i Brown, 2005; Szymańska-Chargot i in., 2019), przy czym jej skład chemiczny pozostaje niezmienny. Równoległe ułożenie łańcuchów celulozowych i odpowiednia geometria reszt glukozowych w łańcuchu, tj. dwie sąsiednie jednostki glukozy skrócone o 180° względem siebie, determinują tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi jednostek glukozy a tlenem w pierścieniu cyklicznym kolejnej jednostki glukozy ($O3-H\cdots O5$) oraz ($O2-H\cdots O6$) i międzycząsteczkowych wiązań wodorowych ($O3-H\cdots O6$). Łańcuchy polimerowe celulozy łączą się w mikrofibrele, które zakłada się, że są zbudowane z wysoce krystalicznego rdzenia, otoczonego mniej uporządkowanymi łańcuchami lub z części krystalicznych, które są rozdzielone obszarami amorficznymi wzdłuż fibryli. Na powierzchni mikrofibreli celulozowych występują zarówno obszary hydrofilowe, jak i hydrofobowe (Lin i in., 2016). W roślinnej ścianie komórkowej występuje w większości celuloza krystaliczna, określana jako celuloza typu I, którą rozróżnia się na dwa rodzaje polimorficzne: $I\alpha$ i $I\beta$. Celuloza $I\beta$ dominuje w ścianie komórkowej roślin wyższych, natomiast w glonach i celulozie bakteryjnej przeważa celuloza $I\alpha$. W celulozie typu I łańcuchy polimerowe ułożone są równoległe do siebie. Natomiast rodzaje polimorficzne $I\alpha$ i $I\beta$ celulozy różnią się układem krystalograficznym: dla rodzaju $I\alpha$ występuje układ trójskośny, a dla $I\beta$ jednoskośny (Imai i Sugiyama, 1998; Šturcova i in., 2004), co zostało schematycznie przedstawione na Rysunku 1.

Stopień krystaliczności jest parametrem oceny struktur krystalicznych polimeru - a dokładniej jest to stosunek części krystalicznych do amorficznych, który można wyznaczyć za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej (XRD), metod spektroskopii Ramana lub w podczerwieni (IR) oraz rezonansu magnetycznego (NMR) (Lee i in., 2015). Struktura krystaliczna celulozy wpływa na jej właściwości mechaniczne. Wraz ze wzrostem stopnia krystaliczności wzrasta sztywność fibryli celulozowych oraz zmniejsza się zdolność sorpcji wody (Jarvis, 2023)



Rysunek 1. Struktura molekularna celulozy, przedstawiająca układ poszczególnych wiązań (rys. 1a). Schematyczny układ łańcuchów polimerowych w strukturze celulozy Ia i Ib, różne kolory obrazują reszty glukozy, które są skręcone o 180° względem siebie. Strzałkami zaznaczone są pojedyncze łańcuchy celulozy (rys. 1b). Schematyczny obraz elementarnej fibryli celulozy roślinnej z zaznaczonymi powierzchniami krystalograficznymi oraz powierzchniami hydrofilowymi i hydrofobowymi, a także jeden z proponowanych schematów mikrofibrili celulozowej zawierającej krystaliczny rdzeń i mniej uporządkowaną, amorficzną warstwę zewnętrzną (rys. 1c). Opracowanie własne na podstawie Zugenmaier (2008) i Pękała i in. (2023).

1.3. Hemicelulozy

Hemicelulozy to grupa polisacharydów o budowie podobnej do celulozy pod względem obecności wiązań β -1,4-glikozydowych. Jednak, w ich cząsteczkach dodatkowo występują również reszty cukrowe połączone wiązaniem β -1,3-glikozydowym oraz β -1,6-glikozydowym (Tang i in., 2023). Hemicelulozy, w przeciwieństwie do celulozy, są heteropolisacharydami, które mogą posiadać rozgałęzione łańcuchy boczne, a ich skład jest zależny od gatunku, organu rośliny oraz jej stadium rozwojowego.

Ksyloglukan to główny przedstawiciel hemiceluloz, który obficie występuje w ścianie komórkowej roślin dwuliściennych (Pauly i Keegstra, 2016; Scheller i Ulvskov,

2010). Polimer ten zbudowany jest z łańcucha monomerów β -D-glukozy połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym, z rozgałęzieniami w pozycji O-6 w postaci α -D-ksylozy, do których często są przyłączone reszty β -D-galaktozy występującej pojedynczo lub z dołączonymi do niej resztami α -L-fukozy i α -L-arabinozy (Cavalier i Keegstra, 2006; Fry, 1989; Hayashi, 1989). Ksyloglukukan w roślinnej ścianie komórkowej może być acetylowany, a grupy acetylowe są przyłączone w pozycji O-3, O-4 glukozy (Ray i in., 2014) w łańcuchu głównym oraz w pozycji O-6 galaktozy łańcucha bocznego (Gille i Pauly, 2012).

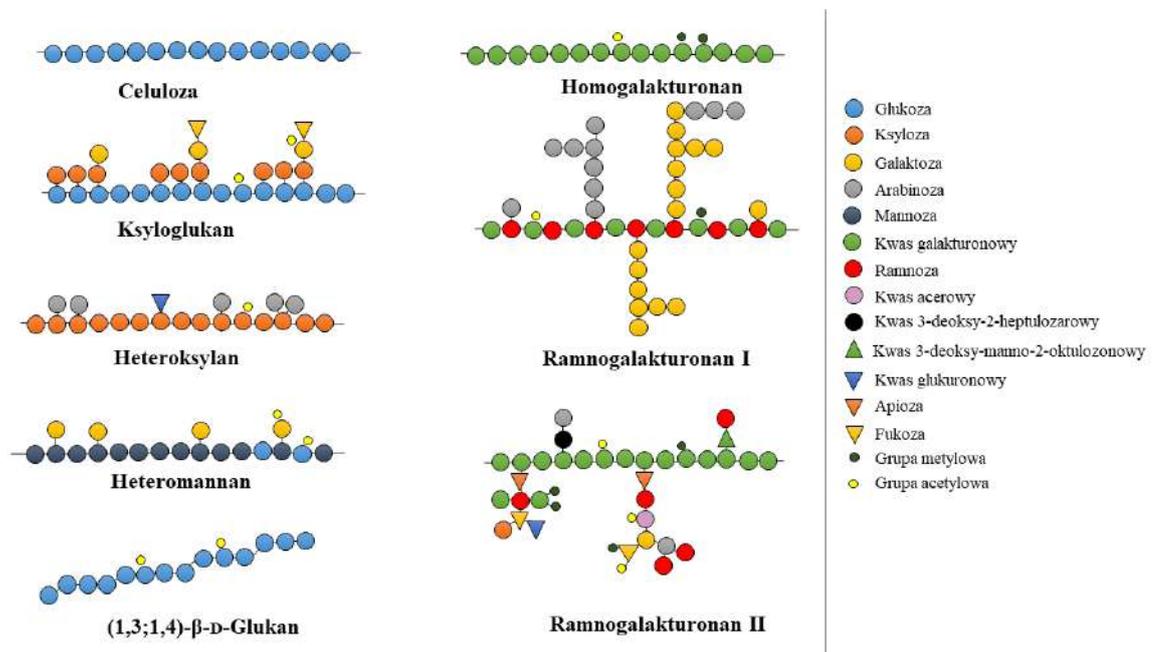
Do hemiceluloz należą również glukomannany - liniowe polimery zbudowane z monomerów D-mannozy i D-glukozy połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Galaktoglukomanny dodatkowo zawierają galaktozę w pozycji O-6 (Scheller i Ulvskov, 2010). Mannany w roślinnej ścianie komórkowej ulegają acetylacji, głównie z podstawieniem grupy acetylowej w pozycjach O-2, O-3 mannozy (Pauly i Ramírez, 2018).

Kolejnymi przedstawicielami hemiceluloz są ksylany, zbudowane z łańcucha β -1,4-D-ksylozy. W pozycjach O-2 i/lub O-3 ksylozy mogą występować podstawienia w postaci α -L-arabinozy, β -D-galaktozy, kwasu glukuronowego oraz innych reszt monosacharydowych, stanowiących od 10 do nawet 90 % szkieletu ksylanu (Albersheim i in., 2010). Xylan występujący w pierwotnej ścianie komórkowej traw składa się w 60 % z arabinozy i w 40 % z ksylozy (Dervilly-Pinel i in., 2004). Natomiast zawartość arabinoksylanu w pierwotnej ścianie komórkowej roślin dwuliściennych jest niska i wynosi ok. 5 %, w przeciwieństwie do roślin jednoliściennych, gdzie sięga ona 30 – 40 % (Dervilly-Pinel i in., 2004). Z kolei glukuronoksylany oraz glukuronoarabinoksylany dodatkowo zawierają reszty kwasu glukuronowego w strukturze, jednakże występują one głównie we wtórnych ścianach komórkowych. Ksylany również ulegają acetylacji w ścianie komórkowej roślin w pozycji O-2 i/lub O-3 ksylozy (Busse-Wicher i in., 2014).

1.4. Pektyny

Pektyny to polisacharydy składające się głównie z łańcucha reszt kwasu D-galakturonowego połączonych wiązaniem α -1,4-glikozydowym (Albersheim i in., 1960; Koller i Neukom, 1964). W roślinnej ścianie komórkowej pektyny tworzą rozbudowane sieci, w których można wyróżnić specyficzne regiony: tj. tzw. „gładkie regiony” (z ang. *smooth*), bogate w homogalakturonany oraz tzw. „rozgałęzione regiony” (z ang. *hairy*),

bogate w ramnogalakturonany. Homogalakturonan (HG) to liniowy homopolimer zbudowany z reszt kwasu D-galakturonowego, który w roślinnej ścianie komórkowej może być metylowany w pozycji O-6 i/lub acetylowany w pozycji O-2 i O-3 (Costa i Plazanet, 2016). Ramnogalakturonan typu I (RG I) to rozgałęziony heteropolimer o powtarzających się sekwencjach disacharydów, składających się z reszt kwasu α -1,4-galakturonowego i α -1,2-ramnozy (Costa i Plazanet, 2016; Heredia i in., 1995). Ponadto, RG I zawiera w rozgałęzieniach arabinany, galaktany i arabinogalaktany (Kaczmarska i in., 2022). RG I również może być metylowany w pozycji O-6 i acetylowany w pozycji O-2 i O-3 reszty kwasu galakturonowego oraz w pozycji O-3 ramnozy (Gille i Pauly, 2012). Ramnogalakturonany typu II (RG II) to najbardziej złożone struktury pektyn, zbudowane z łańcucha głównego reszt kwasu D-galakturonowego, zawierające zróżnicowane i rozbudowane łańcuchy boczne składające się z D-ksylozy, L-arabinozy, L-fukozy, apiozy, L-ramnozy, kwasu D-glukuronowego, D-galaktozy oraz licznie podstawione grupy metylowe i/lub acetylowe.



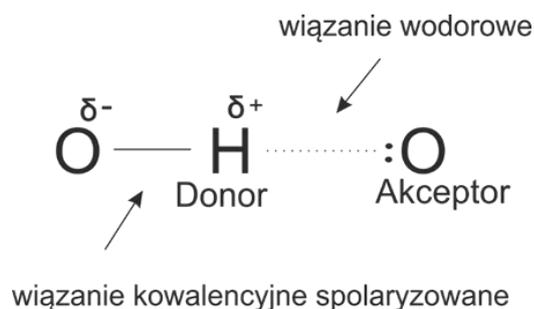
Rysunek 2. Schemat struktury głównych polisacharydów roślinnej ściany komórkowej. Opracowanie własne na podstawie Pękała i in. (2023).

1.5. Oddziaływania w roślinnej ścianie komórkowej

Modele struktury roślinnej ściany komórkowej ukazują, że jest to układ ułożonych warstwowo mikrofibrili celulozowych, umieszczonych w macierzy składającej się z hemiceluloz i pektyn. Mikrofibryle stykają się ze sobą bezpośrednio, a także mogą występować pomiędzy nimi pośrednie połączenia poprzez niekwalencyjne wiązania z polimerami macierzy. Starsze modele ukazywały, że ksyloglukan, który wykazuje duże powinowactwo do celulozy, może pokrywać mikrofibryle celulozowe (Barbacci i in., 2013; Cosgrove, 2005). Z kolei w najnowszym modelu, ksyloglukan jest połączony jedynie z ograniczonymi obszarami mikrofibrili celulozowych, tworząc specyficzne tzw. biomechaniczne połączenia (z ang. *biomechanical hotspots*) (Park i Cosgrove, 2015).

Niekwalencyjne wiązania pomiędzy polisacharydami obejmują oddziaływania międzycząsteczkowe, takie jak: wiązania wodorowe, siły van der Waalsa, siły dyspersyjne i oddziaływania hydrofobowe (Gu i Catchmark, 2013; Pękala i in., 2023; Yang i in., 2019). Badania oddziaływań pomiędzy hemicelulozami, pektynami a celulozą w roślinnej ścianie komórkowej są prowadzone między innymi za pomocą modelowych badań adsorpcji *in vitro* oraz symulacji metodami dynamiki molekularnej (Kishani i in., 2021; Oehme i in., 2015; Yao i in., 2021).

Źródło oddziaływań pomiędzy polisacharydami macierzy a celulozą upatruje się w strukturze tych polisacharydów. Z uwagi na to, że polisacharydy są bogate w grupy hydroksylowe, szczególną uwagę poświęca się możliwym wiązaniom wodorowym typu $O-H\cdots O$. Wiązanie takie to elektrostatyczne oddziaływanie pomiędzy grupą donorową protonu (tj. grupa $-OH$, złożona z silnie elektroujemnego atomu tlenu połączonego wiązaniem kowalencyjnym spolaryzowanym z atomem wodoru; polaryzacja tego wiązania skutkuje powstaniem „niedoboru” elektronów po stronie wodoru) i posiadającym wolną parę elektronową atomem tlenu (akceptorem protonu), co zostało schematycznie przedstawione na Rysunku 3.



Rysunek 3. Schemat wiązania wodorowego O-H...O.

Do niedawna doniesienia literaturowe wskazywały, że wiązania wodorowe pełnią główną rolę w połączeniach pomiędzy celulozą a polimerami niecelulozowymi (Brummell, 2006; Gu i Catchmark, 2013; Hatfield i Ronald, 1993; Heredia i in., 1995). Jednakże, są to wiązania słabe, wrażliwe na otaczające warunki i mogą mieć mniej znaczący udział niż zakładano. Z drugiej strony, z uwagi na ich liczebność w łańcuchu polimerowym, nabierają większego znaczenia w ujęciu całościowym. Pomimo tego, że nie stanowią głównej siły napędowej adsorpcji polisacharydów niecelulozowych na powierzchni celulozy, to mogą przyczyniać się do specyficznego gromadzenia się tych makrocząsteczek oraz stabilizacji zaadsorbowanych łańcuchów polisacharydowych. Jest to zgodne z ostatnimi wynikami badań symulacji MD, które wykazały, że zaadsorbowany ksylan przyjął konformację zbliżoną do celulozy i utworzony kompleks przypominał przedłużenie struktury celulozy, włącznie z siecią wiązań wodorowych (Simmons i in., 2016; Wohlert i in., 2022).

Wohlert i in. (2022) wykazali, że w układach, gdzie rozpuszczalnikiem jest woda, tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy celulozą i innymi polisacharydami macierzy jest procesem konkurencyjnym do tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy celulozą a cząsteczkami wody. Ponadto, z termodynamicznego punktu widzenia, utworzenie słabych wiązań wodorowych nie wpływa na zmianę energii swobodnej układu, a więc nie zapoczątkuje adsorpcji. Najnowsze badania skłaniają się w stronę zastosowania oddziaływań hydrofobowych w opisach procesów adsorpcji hemiceluloz na powierzchni celulozy (Heinonen i in., 2022; Kishani i in., 2021; Yao i in., 2021).

Polisacharydy niecelulozowe w roślinnej ścianie komórkowej są acetylowane, a grupy acetylowe przyłączają się do grup hydroksylowych reszt monosacharydowych. Zgodnie z tym, że grupy acetylowe to grupy hydrofobowe, a grupy hydroksylowe to grupy hydrofilowe, to te substytucje w strukturze polisacharydów mogą wpływać na

zmianę ich właściwości fizykochemicznych. Ponadto, obecność grup acetylowych może również wpływać na zmiany konformacji łańcucha, dostępność wolnych grup hydroksylowych polisacharydów, a w konsekwencji na oddziaływania z celulozą. Jednak w literaturze wciąż brakuje jednoznacznych wyników badań dotyczących roli podstawników grupy acetylowej w oddziaływaniach polisacharydów niecelulozowych z celulożą.

2. Hipoteza badawcza i cele rozprawy doktorskiej

Hipoteza badawcza

Jabłka to owoce przechowalnicze, dla których kluczowym jest utrzymanie wysokiej jakości po zbiorach. Szczególnie ważnym parametrem jakościowym jest jędrność, która warunkuje akceptację konsumencką. Jej utrata stanowi poważny problem podczas przechowywania jabłek. Wraz z rozwojem owoców dochodzi do przebudowy ściany komórkowej, która wpływa na ich właściwości mechaniczne, a w tym jędrność. Zachodzą zmiany w strukturze polisacharydów niecelulozowych, które mogą mieć wpływ na oddziaływania z celulozą. Chociaż struktura polisacharydów jest już dobrze poznana, to wciąż w literaturze brakuje wyjaśnienia w jaki sposób te komponenty są ze sobą połączone i jaki mają wpływ na integralność ściany komórkowej. Polisacharydy niecelulozowe są natywnie acetylowane w ścianie komórkowej, natomiast nadal nie wykazano jednoznacznych zmian stopnia acetylacji zachodzących wraz z rozwojem rośliny. Uważa się, że najbardziej dynamiczne zmiany podczas rozwoju owoców dotyczą struktury pektyn (Zdunek i in., 2016) i to one mają dominujący wpływ na strukturę ściany komórkowej, integralność tkanki, a tym samym na jakość owoców. Z drugiej strony, stosunkowo niedawno zostało podjęte zagadnienie oddziaływań hemiceluloz i celulozy w ścianie komórkowej. Dotychczas przeprowadzono eksperymenty modelowe wykazujące wpływ oddziaływania pomiędzy hemicelulozami i celulozą bakteryjną na właściwości mechaniczne filmów celulozowych (Chibrikov i in., 2024). Jednak w powyższych badaniach został pominięty aspekt stopnia acetylacji polisacharydów niecelulozowych. Grupy acetylowe przyłączają się do grup hydroksylowych reszt monosacharydowych, wpływając na ich właściwości fizykochemiczne, w tym właściwości powierzchniowe i konformację. Dodatkowo, dotychczas podkreślano rolę grup hydroksylowych w liniowych hemicelulozach, tworzących wiązania wodorowe z celulozą. Biorąc powyższe pod uwagę postawiono następującą hipotezę:

Acetylacja polisacharydów niecelulozowych utrudnia ich oddziaływania z mikrofibrilami celulozy, a tym samym zmniejsza integralność ściany komórkowej i tkanki roślinnej.

Cel rozprawy doktorskiej

Głównym celem rozprawy doktorskiej było określenie wpływu stopnia acetylacji polisacharydów niecelulozowych (hemiceluloz, pektyn) na właściwości mechaniczne i mikrostrukturę tkanki roślinnej.

Główny cel badań realizowano poprzez następujące cele szczegółowe:

- Wykazanie zmian stopnia acetylacji polisacharydów niecelulozowych wyizolowanych ze ściany komórkowej jabłek w terminach: przedzbiorczego dojrzewania na drzewie, zbioru i pozbiorczego przechowywania [P.2, P.3];
- Wykazanie wpływu stopnia acetylacji polisacharydów niecelulozowych na utratę jędrności jabłek podczas pozbiorczego przechowywania [P.2];
- Wykazanie różnic w dystrybucji acetylowanych i deacetylowanych polisacharydów niecelulozowych w ścianie komórkowej [P.3];
- Wykazanie oddziaływań pomiędzy polisacharydami niecelulozowymi a celulozą mikrofibrylną [P.4]
- Wykazanie wpływu acetylacji polisacharydów na oddziaływania z celulożą mikrofibrylną [rozdział 5]

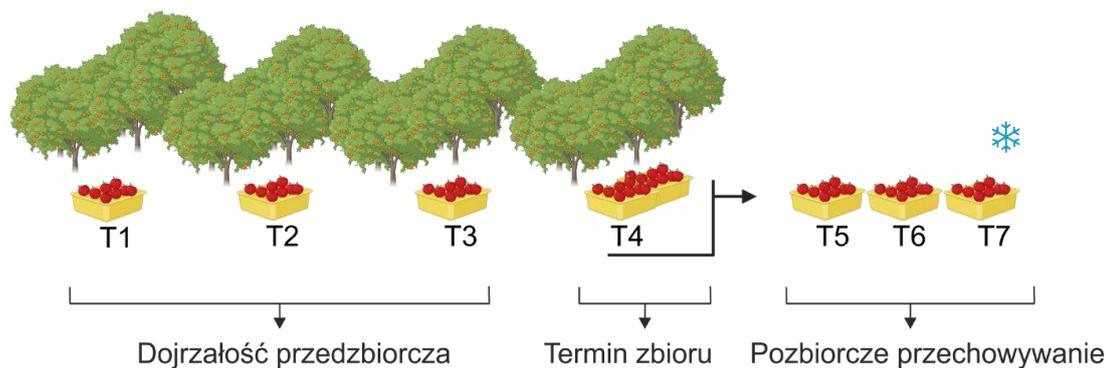
Zaplanowano badania dotyczące analizy zmian strukturalnych polisacharydów bezpośrednio izolowanych ze ściany komórkowej jabłek z różnych terminów dojrzałości przedzbiorczej i pozbiorczego przechowywania oraz ich korelację ze zmianami jędrności. Analizowano mikrostrukturę tkanki roślinnej i dystrybucję głównych polisacharydów. Następnie przeprowadzono modelowe badania adsorpcyjne, które dostarczyły informacji na temat oddziaływań pomiędzy poszczególnymi polisacharydami i pozwoliły nakreślić obraz oddziaływań zachodzących w ścianie komórkowej. Każdy etap badań koncentrował się na roli grup acetylowych w strukturze polisacharydów niecelulozowych.

3. Materiały i metody

3.1. Materiał roślinny

Materiał badawczy stanowiły jabłka (*Malus domestica*) dwóch odmian: Pinova oraz Idared. Jabłka zostały zebrane w 2021 r. z dwóch sadów w miejscowości Stasin, w pobliżu Lublina, z oznaczonych 10 drzew, w odstępach jednego tygodnia od 21 września (T1, T2, T3) do przewidywanej, optymalnej daty zbioru (T4), określonej przez sadownika. Jabłka z (T4) były przechowywane w chłodni w temperaturze 2 °C i normalnej atmosferze przez 1 miesiąc (T5), 2 miesiące (T6) i 3 miesiące (T7). Dla każdego terminu zebrano po 20 jabłek bez szkadek i o podobnej wielkości.

Jabłka z każdego terminu poddano pomiarom jędrności i sporządzono skrawki tkanek do badań mikrospektroskopii Ramana. Następnie, owoce zostały obrane, wydrążone i zhomogenizowane do postaci pulpy przy użyciu homogenizatora laboratoryjnego (Zauberstab, ESGE, Hockenheim, Szwajcaria), którą zamrożono w temperaturze -18 °C do dalszych badań.



Rysunek 4. Schemat terminów zbiorów i pozbiornego przechowywania jabłek. Opracowanie własne z wykorzystaniem Biorender.com.

3.2. Podstawowa ocena dojrzałości zbiorczej owoców

Ocenę dojrzałości zbiorczej owoców przeprowadzano na podstawie podstawowych parametrów przyjętych dla jabłek, tj.: test jodowy, całkowita zawartość rozpuszczalnych substancji stałych (SSC, z ang. *Soluble solid content*), sucha masa oraz jędrność (F, z ang. *Firmness*).

Wykonano test jodowy na obecność skrobi dla jabłek Idared i Pinova T1-T7. Dla każdego przypadku test przeprowadzano na pięciu jabłkach. Jabłka przekrojono dokładnie na pół, wzdłuż równika jabłka, a następnie zanurzono w roztworze jodu (40 g

KI + 10 g I₂ w 1 L wody destylowanej) przez 1 minutę. Kolejno, pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej 23 ± 1 °C i sfotografowano (Doerflinger i in., 2015; Peirs i in., 2002; Szymanska-Chargot i in., 2015).

Całkowitą zawartość rozpuszczalnych substancji stałych (SSC) oznaczano za pomocą cyfrowego refraktometru, opartego na skali Brix (PAL-BX/R1, Atago Co. Ltd., Tokio, Japonia). Pulpę jabłkową przefiltrowano przez filtr nylonowy o średnicy porów 11 µm, a następnie kroplę filtratu umieszczano na pryzmacie refraktometru (Szymanska-Chargot et al., 2012). Pomiar powtarzano pięciokrotnie dla każdej próbki.

Suchą masę miąższu jabłka wyznaczono za pomocą wagosuszarki (RADWAG, MAC 50/1/NP., Radom, Polska). Pomiar wykonywano na próbkach zhomogenizowanej pulpy miąższu jabłka o wadze ok. 1 g w temperaturze 105 °C aż do osiągnięcia stałej wagi. Wykonano trzy powtórzenia dla każdej próbki.

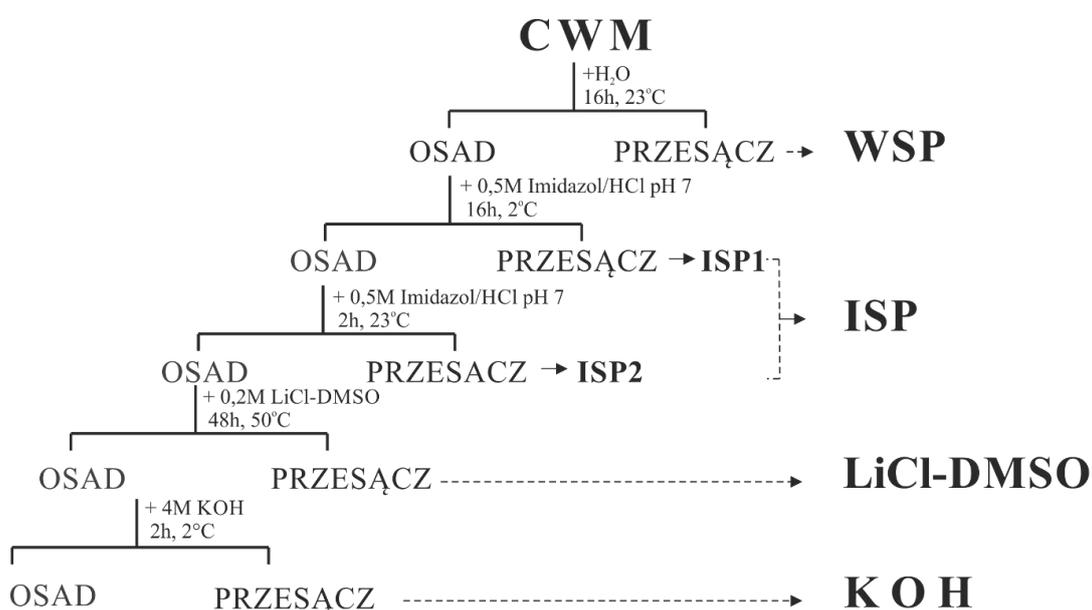
Wyznaczenie jędrności jabłek przeprowadzono przy użyciu maszyny wytrzymałościowej Lloyd LRX (Lloyd Instruments Ltd., Hampshire, Wielka Brytania) z czujnikiem siły o wartości 500 N. Zastosowano standardowy test nakłuwania za pomocą sondy cylindrycznej (o średnicy 11,1 mm) z prędkością 20 mm/min i maksymalną głębokością penetracji 8 mm, zgodnie z metodą opisaną przez Zdunek i in. (2010). Badano jędrność miąższu jabłka, dlatego bezpośrednio przed nakłuciem została usunięta skórka. Jędrność (F) zdefiniowano jako maksymalną wartość siły potrzebnej do przebicia miąższu jabłka i wyrażono ją w niutonach (N). Pomiar przeprowadzono dla ośmiu jabłek z każdego terminu T1-T7 i dwóch odmian jabłek.

3.3. Ekstrakcja materiału ściany komórkowej

Materiał ściany komórkowej (CWM, z ang. *Cell Wall Material*) ekstrahowano z pulpy jabłkowej. Ekstrakcję przeprowadzono zgodnie z metodą ekstrakcji nierozpuszczalnych substancji stałych w gorącym alkoholu, zgodnie z Renard (2005). 150 g pulpy miąższu jabłkowego umieszczono w nadmiarze 70 % roztworu etanolu w stosunku 1:10 (w/v), gotowano przez około 20 minut i przefiltrowano przez filtr nylonowy o średnicy porów 11 µm. Procedurę przemywania 70 % etanolem powtórzono kilkakrotnie, a następnie zastosowano 96 % etanol, aż do uzyskania ujemnego wyniku na obecność cukrów w przesączu, zgodnie z metodą Dubois (Dubois et al., 1956). Otrzymany osad został przemyty acetonem, wysuszony w temperaturze 40 °C i zmielony w młynie kulowym (Retsch MM400) z częstotliwością 20 Hz przez 20 min.

3.4. Ekstrakcja sekwencyjna polisacharydów ściany komórkowej

Przeprowadzono ekstrakcję sekwencyjną polisacharydów z materiału ściany komórkowej (CWM). Frakcje pektyn rozpuszczalnych w wodzie (WSP), pektyn rozpuszczalnych w imidazolu (ISP) oraz hemiceluloz rozpuszczalnych w wodorotlenku potasu (KOH) uzyskano zgodnie z metodą opisaną przez Redgwell i in. (2008) oraz Szymańska-Chargot i in. (2013). Natomiast frakcję natywnie acetylowanych hemiceluloz, rozpuszczalnych w chlorku litu w dimetylosulfotlenku (LiCl-DMSO), ekstrahowano metodą zaproponowaną przez Ray i in. (2014). Schemat ekstrakcji sekwencyjnej przedstawiono na Rysunku 5.



Rysunek 5. Schemat ekstrakcji sekwencyjnej polisacharydów z CWM. Frakcje polisacharydowe bogate w pektyny: WSP – pektyny rozpuszczalne w wodzie, ISP – pektyny rozpuszczalne w imidazolu; bogate w hemicelulozy: LiCl-DMSO – natywnie acetylowane hemicelulozy rozpuszczalne w LiCl-DMSO, KOH – hemicelulozy rozpuszczalne w 4M KOH. Opracowanie własne na podstawie Pękała i in. (2025a).

Do 300 mg CWM dodano 30 mL wody destylowanej i mieszano na rotatorze laboratoryjnym przez noc (ok. 16 h) w temperaturze pokojowej 23 ± 1 °C. Próbkę odwirowano (20 min, 20 °C, $9000 \times g$) i roztwór z nad osadu przefiltrowano przez sącze nylonowy o średnicy porów 11 μm (Millipore), a następnie przesać zamrożono i zliofilizowano. Uzyskano frakcję pektyn WSP.

Do osadu dodano 30 mL imidazolu-HCl ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazolu zobojętnionego do pH 7 za pomocą HCl) i mieszano na rotatorze przez noc (ok. 16 h) w temperaturze 2 °C. Osad odwirowano i roztwór z nad osadu przefiltrowano, uzyskując przesać ISP1.

Następnie do osadu dodano ponownie 30 mL $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ imidazolu-HCl i mieszano na rotatorze przez 2 h w temperaturze pokojowej $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Osad odwirowano i przefiltrowano, uzyskując przesącz ISP2. Przesącze ISP1 i ISP2 połączono w jedną frakcję pektyn ISP.

Do osadu dodano 60 mL roztworu LiCl-DMSO ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LiCl w DMSO, dokładnie: 84 g LiCl w 1 L DMSO) i mieszano w łaźni wodnej w temperaturze $50 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 48 godzin. Zawiesinę schłodzono, odwirowano i przefiltrowano, uzyskując przesącz frakcji hemiceluloz LiCl-DMSO.

Do osadu dodano 15 mL roztworu KOH z NaBH_4 ($4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH + $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaBH_2) i mieszano na rotatorze przez 2 h w temperaturze $2 \text{ }^\circ\text{C}$. Kolejno, próbki odwirowano i przefiltrowano, a przesącz zobojętniono za pomocą HCl. Uzyskano frakcję hemiceluloz KOH.

Przesącze ISP, LiCl-DMSO i KOH dializowano za pomocą membran (Spectra/Por 6 MWCO 1000, Roth) wobec wody destylowanej, aż do uzyskania stałej przewodności wody, a następnie zamrożono i zliofilizowano. Wszystkie liofilizaty przechowywano w eksykatorze przed dalszymi badaniami.

3.4.1. Skład monosacharydowy

Skład monosacharydowy frakcji polisacharydów WSP, ISP, LiCl-DMSO został wyznaczony zgodnie z metodą opracowaną przez Zhang i in. (2018) z pewnymi modyfikacjami, opisanymi przez Cybulska i in. (2022). Do ok. 1 mg próbki danej frakcji dodano $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ metanolowego roztworu HCl i ogrzewano w temperaturze $80 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 72 h, a następnie hydrolizowano z 2 mL $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ roztworu kwasu trifluorooctowego (TFA) w temperaturze $100 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 7 h. Kolejno dodano 1 mL wody, 50 μL $0,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH oraz 50 μL $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ roztworu 1-fenylo-3-metylo-5-pirazolonu (PMP) w metanolu i inkubowano w temperaturze 70°C przez 60 minut. Próbki zneutralizowano 50 μL $0,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl, ekstrahowano chloroformem i przefiltrowano przez membranę o średnicy porów 22 μm bezpośrednio do fiolek HPLC. Dla standardów monosacharydów (arabinoza, fukoza, galaktoza, kwas galakturonowy, glukoza, kwas glukuronowy, mannoza, ramnoza i ksyloza) została przeprowadzona taka sama procedura, jak dla próbek frakcji polisacharydów.

Próbki analizowano przy użyciu systemu HPLC, składającego się z pompy czwartorzędowej 1130 HPLC, podajnika próbek S 5300, termostatu S 4120 i detektora PDA S 3350 (Sykam GmbH, Gewerbering, Niemcy) wyposażonego w kolumnę analityczną Zorbax Eclipse XDB-C18 (średnica wewnętrzna 4,6 mm × 250 mm, 5 μm) połączoną z kolumną ochronną Agilent Eclipse XDB-C18 (średnica wewnętrzna 4,6 mm × 12,5, 5 μm). Zastosowano elucję izokratyczną. Faza ruchoma składała się z A: 0,1 mol·L⁻¹ buforu fosforanowego (pH 6,7) i B: 50 % v/v roztworu 0,1 mol·L⁻¹ buforu fosforanowego w acetonitrylu, w stosunku A:B wynoszącym 69:31 % (v/v). Objętość dozowanej próbki wynosiła 20 μL, prędkość przepływu 1,8 mL/min, temperatura 30 °C, a długość fali detekcji wynosiła 246 nm. Dla każdej próbki wykonano trzy powtórzenia.

3.4.2. Stopień acetylacji i metylacji

Stopień acetylacji (DAc) i metylacji (DM) został wyznaczony dla frakcji polisacharydów. Oznaczenie wykonano za pomocą chromatografu HPLC, zgodnie z metodą opisaną przez Levigne i in. (2002). Do 5 mg próbki dodano 0,5 mL 0,2 mol·L⁻¹ NaOH i inkubowano ją przez 2 h w temperaturze 4 °C. Następnie dodano 0,5 mL 0,2 mol·L⁻¹ H₂SO₄, odwirowano i przefiltrowano przez sączek strzykawkowy o średnicy porów 0,22 μm. Zadozowano 20 μl próbki do systemu HPLC. Parametry analizy chromatograficznej były następujące: faza ruchoma – 4 mmol·L⁻¹ H₂SO₄, prędkość przepływu 0,8 ml/min, kolumna C18 (4,6 x 250 mm, 5 μm) i detektor RI. Kwas octowy i metanol wykorzystano jako standardy zewnętrzne; analizowano je w takich samych warunkach jak próbki frakcji. Dla każdej próbki wykonano trzy powtórzenia.

Stopień acetylacji i metylacji dla frakcji polisacharydów WSP, ISP, LiCl-DMSO, KOH wyrażono jako procentową wagową zawartość kwasu octowego/metanolu w próbce danej frakcji. Ponadto, stopień metylacji i acetylacji dla pektyn frakcji WSP i ISP wyrażono również jako stosunek procentowy liczby moli grupy acetylowej/metylowej do liczby moli GalA.

3.4.3. Spektroskopia FT-IR

Strukturę polisacharydów analizowano w oparciu o widma spektroskopowe w podczerwieni z transformacją Fouriera. Widma FT-IR zebrano przy użyciu spektrometru Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Scientific, Madison, WI, USA) wyposażonego w przystawkę pomiarową Smart iTR. Widma obejmowały zakres 4000 - 650 cm⁻¹. Dla każdej próbki zebrano 200 skanów z rozdzielczością 4 cm⁻¹. Dla każdej próbki wykonano

trzy widma, z których wyznaczono widmo średnie i przeprowadzono korektę linii bazowej za pomocą oprogramowania OMNIC (Thermo Scientific). Widma znormalizowano do obszaru pod widmem i przedstawiono graficznie za pomocą oprogramowania Origin (Origin Lab v8.5 Pro, Northampton, USA).

3.4.4. Spektroskopia Ramana

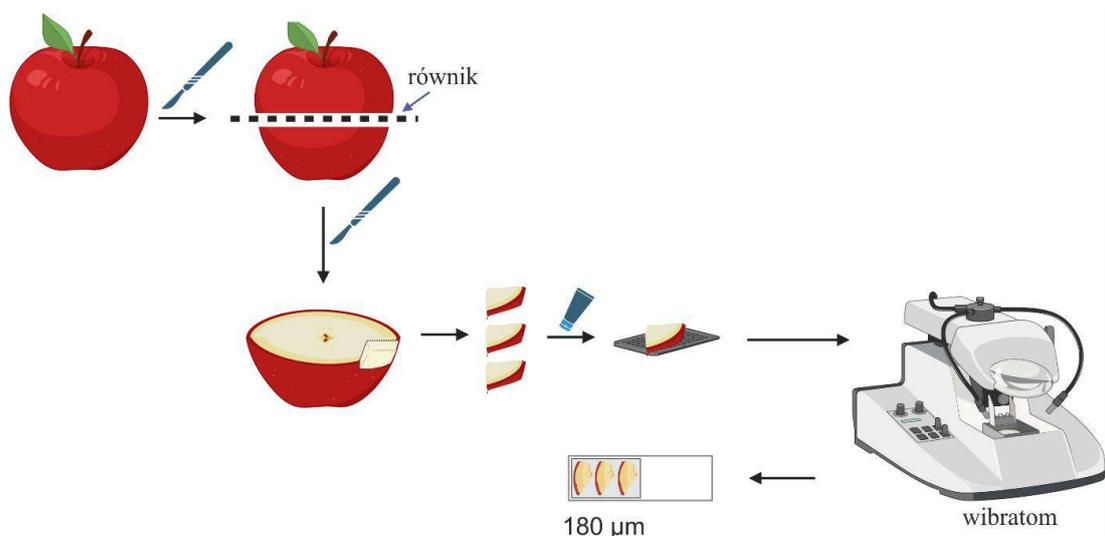
Strukturę polisacharydów badano również wykorzystując widma spektroskopii Ramana, zebrane za pomocą konfokalnego mikroskopu Ramana alpha300RA (WITec GmbH, Niemcy). Zastosowano laser zielony ($\lambda = 532 \text{ nm}$) o mocy roboczej 10–20 mW i czasie integracji 3 s. Do ogniskowania światła lasera na próbce użyto obiektywu Zeiss EC Epiplan-Neofluar Dic 100×/0,9 (Carl Zeiss, Niemcy). Włókno optyczne wielowłókniste (o średnicy 50 μm) stanowiło połączenie ze spektrometrem UHTS 300 (WITec, Niemcy) wyposażonym w siatkę dyfrakcyjną o gęstości 600 g/mm. Sygnał został zarejestrowany za pomocą kamery CCD (DU401A BV, Andor, Belfast, Irlandia Północna). Widma zostały zarejestrowane w zakresie 0 – 4 000 cm^{-1} . Dla każdej próbki zebrano pięć widm, które następnie zostały uśrednione. Graficzne przedstawienie widm Ramana wykonano przy użyciu oprogramowania OriginPro (Origin Lab v8.5 Pro, Northampton, USA). Przeprowadzono korektę linii bazowej, normalizację (powierzchnia do 1) oraz wygładzenie szumów za pomocą korekcji Savitzky-Golay (ProjectSix WITec, Niemcy).

Widma Ramana zgodnie z powyższą procedurą zostały również zebrane dla polisacharydów komercyjnie dostępnych tj.: pektyna wysokoestryfikowana (pektyna z cytrusów, DE $\geq 85\%$, Sigma Aldrich), pektyna niskoestryfikowana (pektyna z cytrusów, DE 20–34%, Sigma Aldrich), celuloza mikrofibrylarna izolowana z jabłek, które wykorzystano w analizie obrazu mapowania ramanowskiego.

3.5. Obrazowanie Ramana

3.5.1. Przygotowanie próbek

Skrawki tkanek jabłek Idared i Pinova z wybranych terminów: T1, T4, T7 przygotowano do obrazowania zgodnie ze schematem przedstawionym na Rysunku 6. Dwa jabłka z każdej próby przekrojono na pół i wykrojono kawałek, z którego za pomocą wibratomu (LEICA VT 1000S) ucięto plaster o grubości 180 μm . Próbkę umieszczono na szkiełku mikroskopowym pokrytym folią aluminiową i pozostawiono do wyschnięcia na powietrzu ($21 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 h).



Rysunek 6. Schemat przygotowania tkanki jabłka do mapowania Ramana. Opracowanie własne na podstawie Pękała i in. (2025b).

3.5.2. Pomiar map ramanowskich

Zebrano mapy Ramana ścian komórkowych próbek za pomocą konfokalnego mikroskopu Ramana alpha300RA (WITec GmbH, Niemcy). Parametry sprzętowe zostały opisane w rozdziale 3.4.4. Zastosowano laser zielony ($\lambda = 532 \text{ nm}$) o mocy roboczej 10 - 20 mW i czasie integracji 3 s. Zakres spektralny wynosił $0 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ a gęstość siatki dyfrakcyjnej spektrometru była równa 600 g/mm . Mapy zostały zarejestrowane z rozdzielczością przestrzenną $0,5 \text{ }\mu\text{m}$ w kierunkach x i y. Zebrano po sześć map dla każdej próbki z obszaru narożnika ściany komórkowej połączeń trzech komórek.

3.5.3. Analiza obrazów Ramana

Analizę obrazów Ramana ścian komórkowych przeprowadzono za pomocą oprogramowania Project Six (WITec, Niemcy). Analizę wstępną stanowiło zlokalizowanie celulozy, pektyn i hemiceluloz, w tym grup karbonylowych, za pomocą filtrów, którymi były liczby falowe odpowiadające charakterystycznym pasmom na widmie Ramana dla poszczególnych polisacharydów. Następnie przeprowadzono bardziej zaawansowaną analizę obrazu składowych rzeczywistych (z ang. *True Component Analysis*), gdzie zbiory danych hiperspektralnych dopasowano do liniowych kombinacji widm składowych. Widma składowe stanowiły unikalne widma średnie frakcji pektyn (WSP, ISP) i hemiceluloz (LiCl-DMSO, KOH) oraz pektyn wysoko- i niskoestryfikowanych bez korekcji.

3.6. Badania adsorpcji

3.6.1. Materiały

Celuloza mikrofibrylarna została wyizolowana z miąższu jabłek metodą opisaną przez Szymańska-Chargot i in. 2017. Jabłka odmiany Gala zakupiono w lokalnym sklepie spożywczym. Jabłka obrano, wydrążono gniazda nasienne, oddzielono sok za pomocą prasy, a otrzymany wyłok jabłkowy poddano izolacji celulozy. Partię 500 g wyłoku jabłkowego zalewano 3 L wody w temperaturze ok. 90 - 100 °C i gotowano przez 10 min. Następnie zawiesinę przefiltrowano, do osadu dodano 3 L 1 mol·L⁻¹ HCl i mieszano przez 30 min w temperaturze 85 °C. Przeprowadzono filtrację i powtórzono etap z HCl. Po kolejnej filtracji do osadu dodano 3 L 1 mol·L⁻¹ NaOH, mieszano przez 30 min w temperaturze 85 °C i przefiltrowano. Ten etap powtórzono trzykrotnie. Osad pozostały po filtracji wybielano 1 – 2 % roztworem podchlorynu sodu przez 60 minut w temperaturze 95 – 96 °C. Osad przemywano wodą dejonizowaną, aż do neutralnego pH przesącza. Otrzymano zawiesinę celulozy mikrofibrylarną w wodzie (stężenie wagowe ok. 10 %) i przechowywano ją w temperaturze 4 °C.

Dla celulozy mikrofibrylarną został wyznaczony skład głównych monosacharydów: glukozy, ksylozy i mannozy. Celulozę zliofilizowano i poddano hydrolizie z 72 % H₂SO₄ przez 1 h w temperaturze pokojowej 21 ± 1 °C, a następnie z 11 % H₂SO₄ przez 2 h w 80 °C. Osad zneutralizowano roztworem NaOH. Stężenie monosacharydów oznaczono za pomocą zestawów Megazyme (Brey, Irlandia): D-Mannose/D-Fructose/D-Glucose Assay kit oraz D-Xylose Assay Kit.

W układzie adsorpcyjnym celuloza była adsorbentem, natomiast adsorbatami były hemicelulozy i pektyny komercyjnie dostępne: β-D-glukan (z jęczmienia, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Niemcy), glukomannan (z konjaku, Megazyme Brey, Irlandia), ksylan (z drewna bukowego, Sigma Aldrich), ksyloglukan (z nasion tamaryndowca, Megazyme, Brey, Irlandia) i pektyny: galaktan (z ziemniaków, Megazyme, Brey, Irlandia), arabinan (z buraków cukrowych, Megazyme, Brey, Irlandia), ramnogalakturonan (z błonnika pektynowego sojowego, Megazyme, Brey, Irlandia), pektyny estryfikowane z owoców cytrusowych o różnym stopniu estryfikacji: 20 – 34 %, 55 – 70 % i ≥ 85 % (Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Niemcy)

3.6.1.1. Całkowita liczba grup kwasowych celulozy

Całkowita liczba grup kwasowych celulozy mikrofibrylarnej została oznaczona zgodnie z SCAN-CM 65:02 (SCAN-CM, 2006). Przeprowadzono miareczkowanie konduktometryczne w temperaturze pokojowej 21 ± 1 °C. Najpierw próbkę ok. 10 g celulozy (1 g suchej masy) protonowano 5 mL $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl przez 15 min. Kolejno osad zawieszono w 490 mL wody i 10 mL $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, następnie miareczkowano wobec $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH. Osad po miareczkowaniu oddzielono za pomocą sączka nylonowego o średnicy porów $11\mu\text{m}$, następnie wysuszono w 40 °C, umieszczono w eksykatorze do wystudzenia i zważono. Oznaczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

3.6.1.2. Krystaliczność celulozy

Krystaliczność celulozy była badana za pomocą dwóch technik XRD i ssNMR. Przy oznaczeniach z wykorzystaniem techniki XRD, badania prowadzono za pomocą dyfraktometru rentgenowskiego Empyrean (PANalytical, Holandia, badania zlecone Laboratorium Analityczne, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie) i zastosowano metodę Segala (Segal i in., 1957). Indeks krystaliczności został określony na podstawie dyfraktogramu XRD i maksimum sygnałów pochodzących od części krystalicznych i amorficznych celulozy, zgodnie z równaniem (1):

$$(1) \text{CrI} = \frac{(I_{002} - I_{\text{am}})}{I_{002}} \cdot 100\%,$$

gdzie CrI to indeks krystaliczności względnej, I_{002} to maksymalna intensywność pasma obszarów krystalicznych, I_{am} to maksymalna intensywność pasma obszarów amorficznych.

Krystaliczność wyznaczono również na podstawie analizy widma CP/MAS ^{13}C NMR celulozy zgodnie z metodyką opisaną przez Johnson i Schmidt-Rohr (2014). Widmo zebrano za pomocą spektrometru Bruker AVANCE NEO Ascend 400 WB, sondy CPMAS 4mm podwójna H/Xm, z akwizycją widma ^{13}C multiCPMAS: akumulacja = 2K; rotacja = 12 kHz; T 293 K. Przetwarzano widma: LB = -20 Hz, GB=0,1 mnożenie Gaussa. W celu określenia powierzchni poszczególnych obszarów na widmie, związanych z krystalicznością, za pomocą programu PeakFit v4.12 przeprowadzono dekonwolucję.

3.6.2. Kinetyka adsorpcji

Badania adsorpcji prowadzono z zastosowaniem statycznej metody pośredniej. Mianowicie, stężenie zaadsorbowanego polisacharydu wyznaczano z różnicy stężenia

wyjściowego i stężenia polisacharydu w filtracji układu adsorpcyjnego. Badania prowadzono w łaźni wodnej z mieszaniem (200 obr./min) w temperaturze 23 ± 1 °C. Układ adsorpcyjny był następujący: 4,83 g pulpy celulozy (0,5 g suchej masy), 5 g buforu PBS (pH 7,4, $C = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 25 g roztworu hemicelulozy/pektyny oraz dodatek wody destylowanej aż do uzyskania 50 g suspensji. Stężenie wyjściowe roztworów hemiceluloz wynosiło: Xlg - 400 mgL^{-1} , Glm - 1600 mgL^{-1} , Gl - 800 mgL^{-1} a dla Xn - 200 mgL^{-1} .

Próbkę suspensji pobierano z układu adsorpcyjnego w konkretnych interwałach czasowych od 10 min do 7,5 h, filtrowano przez filtr strzykawkowy i w otrzymanym roztworze oznaczano spektrofotometrycznie stężenie polisacharydu, z wykorzystaniem metody z kwasem siarkowym. Do 1 mL próby dodano 3 mL stężonego H_2SO_4 , ostudzono i za pomocą spektrofotometru UV-VIS (Thermo Scientific Genesys 10s) zmierzono absorbancję przy 315 nm (Myśliwiec et al., 2016). Wykonano trzy powtórzenia. Taką samą procedurę pomiaru zastosowano dla standardów.

3.6.3. Równowaga adsorpcji

Równowagę adsorpcji wyznaczono dla polisacharydów, które adsorbowały się na celulozie. Badania prowadzono w czasie odpowiadającym osiągnięciu plateau na wykresie ilustrującym kinetykę adsorpcji dla poszczególnych polisacharydów. Układ i schemat oznaczeń był taki sam jak dla kinetyki adsorpcji. Adsorpcję polisacharydów badano w następującym przedziale stężeń: $100 - 2\,000 \text{ mgL}^{-1}$ dla ksyloglukanu, $1500 - 5000 \text{ mgL}^{-1}$ dla glukomannanu, $50 - 1000 \text{ mgL}^{-1}$ dla ksylanu, oraz $300 - 3000 \text{ mgL}^{-1}$ dla β -glukanu. Każdy punkt izoterm był średnią z trzech niezależnych pomiarów.

3.6.4. Model adsorpcji

Przetestowano różne modele adsorpcji, takie jak modele dwuparametrowe: Langmuira, Freundlicha, Jovanovica i Temkina; jak i modele trójparametrowe: Langmuira-Freundlicha, Sipsa, Totha, Fowlera-Guggenheima, Radke-Prausnitza, Redlicha-Petersona; oraz czteroparametrowe: Marczewskiego oraz Fritza-Schlundera. Spośród nich modele Freundlicha i Redlicha-Petersona wykazały najlepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych, na podstawie R^2 dopasowania izoterm. Zastosowane w modelach równania przedstawiono poniżej.

Izoterma Freundlicha:

$$(2) a = k \cdot c^{1/n}.$$

Izoterma Redlicha-Petersona

$$(3) a = a_m \cdot \frac{kc}{1+kc^n}.$$

W równaniach (2) i (3), k ($\text{dm}^3 \cdot \text{mg}^{-1}$) i n (bezwymiarowe) to stałe adsorpcji, a_m ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) to maksymalna adsorpcja, c ($\text{mg} \cdot \text{dm}^3$) to równowagowe stężenie adsorbentu w roztworze.

Do analizy kinetyki adsorpcji zastosowano równanie pierwszego rzędu:

$$(4) \frac{a_m}{a_{eq}} = 1 - \sum_{i=1}^3 A_i \exp(-k_i t).$$

W równaniu (4) a_{eq} oznacza adsorpcję równowagową, A_i to udział i -tego procesu (szybkiego, umiarkowanego, wolnego) w całkowitej adsorpcji, a k_i (min^{-1}) oznacza stałą kinetyczną i -tego procesu, t (min) czas.

3.7. Analiza statystyczna

Wszystkie analizy wykonano z co najmniej trzykrotnym powtórzeniem, podając wartość średnią z odchyleniem standardowym. Konkretnie testy statystyczne zostały wybrane po sprawdzeniu podstawowych założeń, takich jak normalność, homogeniczność wariancji. Przeprowadzono je za pomocą programu Statistica 13.1 (StatSoft, Kraków, Polska). Zastosowane testy statystyczne dla wyników jędrności, składu monosacharydowego, stopnia acetylacji, zostały podane w publikacji P.2 Analiza statystyczna głównych składowych (PCA) dla danych spektroskopowych została przeprowadzona za pomocą programu Unscrambler 10.1 (Camo Software AS., Norwegia) i przedstawiona w publikacji P.3. Istotność statystyczną we wszystkich analizach oceniano na poziomie $p < 0,05$.

4. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach

4.1. Publikacja P.1

Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A. (2023). Interactions between non-cellulosic plant cell wall polysaccharides and cellulose emerging from adsorption studies. *Cellulose*, 30.15: 9221-9239

W publikacji przeglądowej P.1 podsumowano doniesienia literaturowe dotyczące oddziaływań pomiędzy polisacharydami niecelulozowymi roślinnej ściany komórkowej i celulozą, uzyskane w wyniku badań adsorpcyjnych. Szczegółowo opisano strukturę polisacharydów ściany komórkowej, z wyraźnym podkreśleniem jej wpływu na oddziaływanie. Wyjaśniono zastosowanie modelowych badań adsorpcyjnych w odniesieniu do oddziaływań pomiędzy polisacharydami oraz przedstawiono ogólną metodykę badań. Opisano zjawisko adsorpcji wraz z przytoczeniem modeli adsorpcyjnych dla układów celuloza – polisacharydy niecelulozowe oraz wymieniono rodzaje oddziaływań pomiędzy nimi.

Modelowe badania adsorpcji polisacharydów dostarczają cennych informacji na temat oddziaływań pomiędzy komponentami roślinnej ściany komórkowej. W badaniach, adsorbent stanowi celuloza, a adsorbaty to hemicelulozy i pektyny. Kinetyka adsorpcji określa dynamikę procesu nagromadzenia adsorbentu na powierzchni adsorbentu. Natomiast równowaga adsorpcji wskazuje maksymalną adsorpcję danego związku, a tym samym, który polisacharyd niecelulozowy ma największe powinowactwo do celulozy. Dopasowanie modelu adsorpcyjnego informuje o rodzaju adsorpcji, chemicznej czy fizycznej, a więc o rodzaju oddziaływań pomiędzy adsorbentem i adsorbentem. Metoda badań adsorpcji polisacharydów może przebiegać w sposób bezpośredni i pośredni. Pośrednia metoda polega na oznaczeniu stężenia substancji zaadsorbowanej przez wyznaczenie różnicy pomiędzy stężeniem wyjściowym adsorbentu a stężeniem roztworu nad adsorbentem. Stężenie jest określane za pomocą różnych metod analitycznych, np. chromatografii i spektroskopii UV-VIS. Druga metoda, polega na bezpośrednim oznaczeniu stężenia adsorbentu z możliwością monitorowania w czasie rzeczywistym grubości warstwy adsorpcyjnej, z wykorzystaniem mikrowagi kwarcowej z monitorowaniem dyssypacji energii (QCM-D) oraz spektroskopii powierzchniowego rezonansu plazmowego (SPR).

Najwięcej badań poświęcono oddziaływaniom celulozy z ksyloglukanem, czyli głównym przedstawicielem hemiceluloz. Badania adsorpcyjne wykazały, że ksyloglukan charakteryzuje się silnym powinowactwem do celulozy. Adsorbuje się na jej powierzchni oraz wykazuje zdolność nie tylko do lokalnych oddziaływań z mikrofibrilami celulozy, ale także do ich powlekania. Ksyloglukan z roztworu o niskim stężeniu adsorbuje się w ułożeniu płaskim, określanym jako pociągi (z ang. *trains*), podczas gdy tzw. ogony i pętle (z ang. *tails and loops*) tworzą się przy wysokim stężeniu. Ponadto, ksyloglukan o mniejszej masie cząsteczkowej wykazuje większą adsorpcję na celulozie. Co więcej, ksyloglukan może pełnić rolę promotora dalszych połączeń, na przykład z pektynami. Z badań literaturowych wynika, że ksylan również adsorbuje się na powierzchni celulozy, ale z uwagi na to, że jest mniejszą makrocząsteczką niż ksyloglukan, nie tworzy „tails and loops” na jej powierzchni. Badania donoszą, że makrocząsteczki ksylanu adsorbują się wielowarstwowo na powierzchni celulozy i co ciekawe, w pierwszej warstwie adsorpcyjnej łańcuchy polimerowe przyjmują strukturę dwuskrętną, a więc dopasowują się do struktury celulozy.

Jeżeli zaś chodzi o pektyny, badania adsorpcyjne wykazały ich ograniczoną zdolność do oddziaływań z celulozą. Miały one miejsce jedynie pomiędzy neutralnymi cukrami w strukturze pektyn, takimi jak: arabinoza, galaktoza i ksyloza.

W badaniach adsorpcyjnych istotna jest analiza struktury morfologicznej celulozy. Krystaliczna struktura celulozy jest powiązana z większą adsorpcją hemiceluloz. Ponadto, adsorpcja hemiceluloz na celulozie mikrofibrylarnej może wpływać na agregację fibryli, a nawet na tworzenie części krystalicznych celulozy. Istotna jest również szczegółowa analiza struktury głównych składników układu. Identyfikacja grup funkcyjnych w strukturze polisacharydów może wskazać typ oddziaływań pomiędzy makrocząsteczkami. Polisacharydy w swojej strukturze mają wiele grup hydroksylowych, które mogą tworzyć wiązania wodorowe. Wiele doniesień literaturowych podkreśla znaczenie wiązań wodorowych pomiędzy polisacharydami niecelulozowymi a celulożą. Natomiast najnowsze badania donoszą, że wiązania wodorowe nie są bezpośrednio odpowiedzialne za te oddziaływania, ale pełnią istotną rolę stabilizującą już połączonych układów. Wykazano również, że pomiędzy hemicelulozą a celulożą występują głównie oddziaływania hydrofobowe. W przypadku pektyn, nie wykazano znaczącej adsorpcji na celulozie, natomiast badania gruboziarnistej dynamiki molekularnej (CGMD, z ang. *Coarse-grained Molecular Dynamics*) wskazują,

że pektyny są w bliskim kontakcie z celulozą. Świadczy to o tym, że mogą być zatrzymane pomiędzy mikrofibrilami celulozy w wyniku upakowania przestrzennego, nieuwarunkowanego konkretnymi oddziaływaniami. Ponadto badania celulozy po ekstrakcji w środowisku wysokostężonych alkaliów wykazały pewne pozostałości hemiceluloz i pektyn, które potwierdzają prawdopodobne uwięzienie tych polisacharydów pomiędzy mikrofibrilami.

Podkreślono również, że badania adsorpcyjne polisacharydów niecelulozowych z celulożą to badania modelowe, prowadzone doświadczalnie *in vitro*. Dostarczają one informacji na temat oddziaływań pomiędzy wybranymi komponentami ściany komórkowej, określając ich rodzaj, fizyczny bądź chemiczny, ale nie odzwierciedlają w pełni obrazu roślinnej ściany komórkowej.

4.2. Publikacja P.2

Pękała, P., Szymańska-Chargot, M., Cybulska, J., Zdunek, A. (2025). Monosaccharide composition and degree of acetylation of non-cellulosic cell wall polysaccharides and their relationship to apple firmness. *Food Chemistry*, 470, 142639.

W publikacji P.2 przedstawiono wyniki badań dotyczących składu monosacharydowego i stopnia acetylacji polisacharydów niecelulozowych oraz ich wpływu na jędrność jabłek. Głównym celem pracy było wyznaczenie jak zmienia się stopień acetylacji i skład polisacharydów niecelulozowych podczas dojrzewania i pozbiorczego przechowywania jabłek. Kolejnym celem pracy było wykazanie zależności tych zmian z utratą jędrności jabłek podczas pozbiorczego przechowywania.

4.2.1. Ocena dojrzałości owoców

Badania prowadzono na dwóch odmianach jabłek Idared i Pinova w terminach dojrzewania na drzewie/dojrzałości przedzbiorczej (T1-T3), terminie zbioru (T4) oraz podczas pozbiorczego przechowywania (T5-T7). Przedstawiono wyniki podstawowych parametrów służących do oceny i monitorowania dojrzałości jabłek, takich jak: test skrobiowy, jędrność oraz całkowita zawartość rozpuszczalnych substancji stałych (SSC). Zaobserwowano spadek zawartości skrobi i wzrost zawartości SSC wraz dojrzewaniem jabłek. Początkowo jędrność jabłek Idared i Pinova była podobna i wynosiła ok. 70 N dla terminów dojrzewania na drzewie i terminu zbioru T1-T4. Natomiast, po trzech miesiącach przechowywania w chłodni, T7, odnotowano znaczną utratę jędrności jabłek

Idared. Jędrność jabłek odmiany Idared wynosiła wówczas 43 N, w przeciwieństwie do odmiany Pinova, której jabłka wciąż utrzymywały wysoką jędrność – 66 N.

Idared i Pinova to tzw. odmiany późne, które osiągają dojrzałość zbiorczą w październiku. Wyniki podstawowych parametrów dojrzałości zbiorczej jabłek wykazały, że dla odmiany Idared T4 był rzeczywiście optymalnym terminem zbioru. W przypadku odmiany Pinova, wyniki jędrności i SSC dla T4 były właściwe dla optymalnego terminu zbioru, natomiast indeks skrobiowy był wysoki, co wskazywałoby na wybór przez sadownika zbyt wczesnego terminu zbioru. Jednakże, jabłka odmiany Pinova wykazały stabilną jędrność podczas przechowywania.

4.2.2. Skład monosacharydowy

Wyznaczono skład monosacharydowy frakcji pektyn rozpuszczalnych w wodzie (WSP), pektyn rozpuszczalnych w imidazolu (ISP), natywnie acetylowanych hemiceluloz rozpuszczalnych w LiCl-DMSO (LiCl-DMSO) oraz hemiceluloz rozpuszczalnych w 4 M KOH (KOH), ekstrahowanych z materiału ściany komórkowej jabłek odmian Idared i Pinova w terminach T1-T7.

We frakcji WSP udział procentowy liczby moli kwasu galakturonowego (GalA) wzrósł w okresie dojrzewania na drzewie i przechowywania. Dla frakcji pozyskanej z jabłek odmiany Idared było to od 23 mol% (T1) do 45 mol% (T6), a dla frakcji wyekstrahowanej ze ściany komórkowej jabłek odmiany Pinova - od 25 mol% (T1) do 38 mol% (T7). Efekt ten był związany z tym, że w trakcie rozwoju owoców zachodzą zmiany struktury ściany komórkowej, m.in. rozpuszczanie pektyn ściśle związanych w ścianie, skutkujące wzrostem zawartości pektyn słabo związanych, rozpuszczalnych w wodzie. Ponadto, odnotowano wzrost udziału arabinozy (Ara) w składzie frakcji WSP, wynoszący z 9 mol% (T1) do 33 mol% (T7) dla odmiany Idared oraz z 18 mol% (T1) do 32 mol% (T5) dla odmiany Pinova. Udział galaktozy (Gal) wzrósł z 5 do 11 mol% dla odmiany Idared w terminach (T1-T4) a następnie zmalał podczas pozbiorczego przechowywania do 6 mol% (T7). W przypadku odmiany Pinova udział Gal w składzie monosacharydowym frakcji WSP był większy niż dla odmiany Idared i różnice pomiędzy odmianami były statystycznie istotne. Maksymalna wartość Gal dla odmiany Pinova wynosiła 15 mol% (T2), a podczas przechowywania zmniejszyła się do 11 mol% (T7). Udział procentowy ramnozy (Rha) w składzie frakcji WSP statystycznie istotnie różnił się pomiędzy odmianami, dla odmiany Idared był mniejszy niż dla odmiany Pinova i

wynosił odpowiednio 3 mol% i 5 mol% (T4). Ponadto, liniowość pektyn danej frakcji analizowano na podstawie stosunku udziału procentowego liczby moli GalA, który stanowi łańcuch główny pektyn, do sumy udziałów procentowych liczby moli monosacharydów występujących w rozgałęzieniach. Wykazano, że frakcja WSP z jabłek odmiany Idared zawierała pektyny o większej liniowości niż ta z jabłek odmiany Pinova.

We frakcji ISP również zaobserwowano wzrost udziału GalA, wynoszący 34 - 57 mol% (T1-T5) dla odmiany Idared i 30 - 37 mol% (T1-T7) dla odmiany Pinova. Udział Gal zmniejszył się podczas przechowywania jabłek. W T7 wynosił on 5 mol% dla odmiany Idared, a 12 mol% dla odmiany Pinova. Podobnie jak dla frakcji WSP, występowały istotne statystycznie różnice w udziale GalA i Gal w składzie frakcji pomiędzy odmianami. Wykazano, że udział ramnogalakturonanów był większy we frakcji ISP niż WSP oraz wyższy dla odmiany Pinova niż Idared. Ponadto, frakcja wyekstrahowana z jabłek Pinova zawierała ramnogalakturonan typu I o dłuższym łańcuchu bocznym niż w przypadku odmiany Idared, obfitej w liniowe pektyny.

We frakcji LiCl-DMSO zaobserwowano wzrost udziału głównych monosacharydów wchodzących w skład hemiceluloz: ksylozy (Xyl), galaktozy (Gal), mannozy (Man) i arabinozy (Ara). Udział Xyl wynosił 11 - 32 mol% (T2-T6) dla odmiany Idared i 9 - 31 mol% (T1-T7) dla odmiany Pinova. Udział Gal wynosił 6 - 11 mol% dla odmiany Idared i 6 - 16 mol% dla odmiany Pinova. Udział Man stanowił 8 - 23 mol% (T2-T7) dla odmiany Idared i 7-17 mol% (T1-T6) dla odmiany Pinova. Dodatkowo wykazano niski udział liczby moli fukozy (Fuc) i kwasu glukuronowego (GlcA), wynoszący maksymalnie dla Fuc 4 mol% we frakcji z odmiany Idared i 2 mol% z odmiany Pinova, a dla GlcA 2 mol% we frakcji z odmiany Idared i 3 mol% z odmiany Pinova. Głównym składnikiem hemiceluloz była również glukoza (Glc), natomiast w przedstawionych wynikach jej udział w składzie frakcji LiCl-DMSO z jabłek w terminach T1-T4 był zawyżony, z uwagi na obecność skrobi, natomiast w terminach T5-T7 nie ulegał statystycznie istotnym zmianom, wynosząc 24 -19 mol% dla odmiany Idared i 17 - 15 mol% dla odmiany Pinova. Przedstawiony skład monosacharydowy frakcji LiCl-DMSO wskazuje na obecność fukogalkatoksyloglukanu, glukuronoarabinoksyłanu i galaktoglukomannanu. Ponadto wykazany wzrost udziału procentowego liczby moli poszczególnych monosacharydów może świadczyć o wzroście zawartości fukogalkatoksyloglukanu, glukuronoarabinoksyłanu i galaktoglukomannanu w ścianie komórkowej jabłek podczas dojrzewania i pozbiorczego przechowywania.

We frakcji KOH udział Xyl był większy niż we frakcji LiCl-DMSO, co z kolei świadczy o większej zawartości ksyloglukanów. Udział Xyl w składzie frakcji KOH statystycznie istotnie różnił się pomiędzy wynikami 34 mol% (T2) i 50 mol% (T6) dla Idaredu, oraz 44 mol% (T3) i 50 mol% (T7) dla Pinovy. Dodatkowo odnotowano, że we frakcji KOH był on bardziej stabilny w badanych terminach niż we frakcji LiCl-DMSO. Udział Fuc był wyższy w składzie hemicelulozowych frakcji KOH niż LiCl-DMSO, ponadto statystycznie istotne różnice odnotowano pomiędzy odmianami (wyższy udział, wynoszący maksymalnie 6 mol%, zaobserwowano dla odmiany Pinova). Udział Glc był również stabilny w terminach przechowalniczych (T5-T7) i wynosił 17 - 19 mol% dla odmiany Idared i 15 mol% dla odmiany Pinova. Podobnie dla Gal i Man nie zaobserwowano trendu zmian w badanych terminach. Wykazano, że udział mannanów we frakcji KOH był mniejszy niż we frakcji LiCl-DMSO, natomiast we frakcji KOH dominowały ksyloglukany. Przedstawiony skład monosacharydowy wskazywał na obecność fukoksyloglukanu, którego zawartość w jabłkach była stabilna w badanych terminach.

4.2.3. Stopień acetylacji

Nie zaobserwowano trendu zmian stopnia acetylacji pektyn frakcji WSP i ISP w terminach dojrzewania na drzewie i terminie zbioru (T1-T4) oraz przechowywania pozbiorniczego (T5-T7) dla obydwu odmian jabłek. Maksymalna wartość DAc dla frakcji pektyn była stosunkowo niska i oscylowała w granicy 3%.

Wykazano, że frakcję LiCl-DMSO stanowią głównie acetylowane hemicelulozy. Ponadto, zaobserwowano wzrost stopnia acetylacji hemiceluloz podczas dojrzewania i przechowywania jabłek (T1-T7) dla obydwu badanych odmian, co zostało poparte analizą statystyczną. Dla odmiany Idared wykazano statystycznie istotne różnice między 3,24 % dla T2 i 6,32 % dla T7, a dla odmiany Pinova między 1,60 % (T1) i 4,33 % (T7). Stopień acetylacji hemiceluloz był wyższy w jabłkach odmiany Idared niż Pinova.

Potwierdzono, że hemicelulozy frakcji KOH to hemicelulozy deacetylowane. Silnie alkaliczne warunki ekstrakcji hemiceluloz frakcji KOH spowodowały wystąpienie hydrolizy estrów i usunięcie grup acetylowych w hemicelulozach.

4.2.4. Analiza statystyczna

Przeprowadzono dwie analizy statystyczne PCA uzyskanych wyników, w celu wyznaczenia najistotniejszych zmian zachodzących w przebudowie ściany komórkowej

podczas dojrzewania i przechowywania jabłek oraz wykazania różnic pomiędzy odmianami. Ponadto wykonano analizę korelacji składu polisacharydowego z jędrnością jabłek.

Pierwsza analiza PCA opierała się na wynikach jędrności, zawartości monosacharydów, stopnia acetylacji (DAc) i metylacji (DM). Wykres wyników PCA wykazał grupowanie danych według terminu i odmiany jabłek. Na grupowanie wyników według terminu najbardziej wpłynęła jędrność, a także udział procentowy liczby moli GalA w składzie frakcji WSP, DAc hemiceluloz frakcji LiCl-DMSO oraz stopień metylacji pektyn frakcji WSP. Natomiast na grupowanie wyników według odmiany najbardziej wpłynął udział procentowy liczby moli Ara we frakcji ISP, Fuc w hemicelulozach frakcji LiCl-DMSO i KOH i Gal we frakcjach pektyn WSP i ISP.

Druga analiza PCA opierała się również na wynikach jędrności, DAc i DM, ale zamiast składu frakcji testowano współczynniki przedstawiające: liniowość pektyn, stosunek RG I do HG, średnią długość łańcucha bocznego RG I, udział mannanów w hemicelulozach, procentową molową zawartość HG (HG%) i procentową molową zawartość RG I (RG%). Uzyskano rozkład wyników ze względu na odmiany, na który głównie wpłynęła jędrność, stosunek RG I do HG i RG% we frakcji ISP oraz liniowość pektyn i HG% we frakcji WSP i ISP, potwierdzając że odmiana Idared była obfitsza w homogalakuronany, a Pinova w ramnogalakuronany. Ponadto, na ten rozkład istotnie wpłynęły: DM i DAc hemiceluloz LiCl-DMSO oraz DM frakcji WSP.

Analiza korelacji wykazała statystycznie istotną ujemną korelację jędrności z udziałem GalA i ramnogalakuronanów i DM pektyn frakcji WSP oraz dodatnią korelację jędrności z udziałem Gal w składzie frakcji ISP. Co istotne, odnotowano również korelację jędrności ze zmianami zachodzącymi dla frakcji acetylowanych hemiceluloz LiCl-DMSO. Mianowicie wykazano statystycznie istotną negatywną korelację jędrności ze stopniem acetylacji DAc i udziałem Man, Gal, Xyl, Ara i Fuc w składzie tej frakcji.

4.2.5. Wnioski

Stopień acetylacji hemiceluloz frakcji LiCl-DMSO wzrósł podczas dojrzewania i pozbiornego przechowywania jabłek Idared i Pinova. Natomiast, dla frakcji pektyn nie wykazano specyficznych zmian stopnia acetylacji polisacharydów. Utrata jędrności jabłek Idared podczas pozbiornego przechowywania wykazała negatywną korelację ze składem i cechami strukturalnymi pektyn, tj. DM i udziałem mol% GalA dla frakcji WSP

oraz dodatnią korelację z udziałem mol% Gal frakcji ISP. Ponadto, zaobserwowano negatywną korelację jędrności z zawartością acetylowanych hemiceluloz frakcji LiCl-DMSO, a dokładnie z DAc oraz udziałem mol% Man, Gal, Xyl, Ara i Fuc. Uzyskane wyniki podkreślają rolę nie tylko pektyn, lecz także acetylowanych hemiceluloz w dynamice zmian zachodzących w ścianie komórkowej.

4.3. Publikacja P.3

Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A. (2025). Acetylated hemicelluloses and esterified pectin alterations in apple cell walls during the development of two apple cultivars: Insights from FT-IR, Raman spectroscopy, and imaging. *Food Chemistry*, 493, 146129.

W publikacji P3 przedstawiono wyniki badań spektroskopii FT-IR i Ramana oraz obrazowania Ramanowskiego modyfikacji strukturalnych polisacharydów i ich rozmieszczenia w ścianie komórkowej jabłek. Głównym celem pracy była identyfikacja za pomocą metod spektroskopowych zmian strukturalnych acetylowanych hemiceluloz i estryfikowanych (metylowanych/acetylowanych) pektyn w ścianie komórkowej, zachodząca podczas dojrzewania na drzewie i pozbiornego przechowywania dwóch, różniących się odmian jabłek.

Kolejnym celem pracy było zlokalizowanie celulozy, pektyn i hemiceluloz w ścianie komórkowej jabłek, z rozróżnieniem na pektyny wysoko- i niskoestryfikowane oraz, co było nowatorskie, na acetylowane i deacetylowane hemicelulozy.

4.3.1. Frakcje polisacharydów izolowanych ze ściany komórkowej jabłek

Tak jak w pracy P.2, badano strukturę polisacharydów frakcji pektyn (WSP, ISP) i hemiceluloz (LiCl-DMSO, KOH) izolowanych z materiału ściany komórkowej dwóch odmian jabłek w terminach dojrzewania na drzewie/dojrzałości przedzbiornych (T1-T3), w terminie zbioru (T4) i w czasie pozbiornego przechowywania (T5-T7). Wybrane odmiany, Idared i Pinova, wykazywały podobną wartość jędrności w terminach (T1-T4), natomiast parametr ten różnił się istotnie dla owoców podczas pozbiornego przechowywania (T5-T7). Odmiana Idared charakteryzowała się znaczną utratą jędrności (owoce miękkie), podczas gdy Pinova zachowała wysoką jędrność (owoce twarde).

4.3.2. Wyniki spektroskopii FT-IR

Obecność grupy acetylowej w hemicelulozach i pektynach identyfikowano na podstawie pasm charakterystycznych: $1730\text{--}1740\text{ cm}^{-1}$ drganie rozciągające grupy karbonylowej $\nu\text{C=O}$, 1370 cm^{-1} drganie deformacyjne grupy metylowej, znajdującej się w grupie acetylowej $\delta\text{C-H}$ w CH_3 i $1242\text{--}1230\text{ cm}^{-1}$ drganie rozciągające części grupy estrowej w octanie νCOC .

Widma FT-IR frakcji WSP i ISP wykazały pasma charakterystyczne dla pektyn. Było to przede wszystkim pasmo przy 832 cm^{-1} , przypisywane drganiom wiązania α -glikozydowego. Pasma przy 1601 cm^{-1} odpowiada drganiom rozciągającym anionu karboksylanowego νCOO^- i pasmo przy 1740 cm^{-1} drganiom rozciągającym grupy karbonylowej $\nu\text{C=O}$. Jednakże, grupa karbonylowa jest zarówno częścią grupy karboksylowej GalA, jak też grupy acetylowej i estrowej w pektynach, co może prowadzić to pewnych trudności w identyfikacji pasm. Natomiast, stosunek intensywności tych dwóch pasm (tj. 1600 i 1740 cm^{-1}) pozwala oszacować poziom estryfikacji pektyn. Niższa intensywność pasma 1600 cm^{-1} , a wyższa intensywność pasma 1740 cm^{-1} świadczy o wysokim stopniu estryfikacji pektyn. Zgodnie z tym, wykazano że pektyny frakcji WSP miały wysoki stopień estryfikacji, a pektyny frakcji ISP niski stopień estryfikacji. Pektyny roślinnej ściany komórkowej mogą być metylowane i acetylowe. Niemniej występują pewne przesunięcia charakterystycznych pasm dla grupy estrowej z uwagi na rodzaj podstawnika: grupa metylowa/acetylowa, co zostało szczegółowo opisane w publikacji. Na widmach pektyn frakcji WSP i ISP w zakresie $900 - 1300\text{ cm}^{-1}$ zlokalizowano pasma, które przypisano homogalakturonanom i ramnogalakturonanom typu I.

Widma FT-IR hemiceluloz frakcji LiCl-DMSO i KOH wykazały pasma charakterystyczne dla hemiceluloz: 896 cm^{-1} drgania wiązania β -glikozydowego oraz 1028 cm^{-1} drgania rozciągające w łańcuchu cyklicznym monosacharydów $\nu\text{C-O}$, C-C . Intensywność pasma 896 cm^{-1} wzrosła w badanych terminach T1-T7 dla frakcji LiCl-DMSO w przeciwieństwie do KOH. Potwierdza to doniesienia z wcześniejszej publikacji P.2, gdzie na podstawie składu monosacharydowego wykazano wzrost zawartości hemiceluloz frakcji LiCl-DMSO. Na widmach hemiceluloz frakcji LiCl-DMSO i KOH zlokalizowano pasma pochodzące od glukomannanów i ksyloglukanów, z przeważającym udziałem glukomannanów we frakcji LiCl-DMSO, a ksyloglukanów we frakcji KOH. Na widmach hemiceluloz frakcji LiCl-DMSO zlokalizowano obecność pasm charakterystycznych dla podstawienia grupy acetylowej: 1730 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} i 1242 cm^{-1} , które potwierdziły, że LiCl-DMSO ekstrahuje natywnie acetylowane hemicelulozy ze ściany komórkowej jabłek. Co więcej, zaobserwowano wzrost intensywności tych pasm w okresie T1-T7. Frakcja LiCl-DMSO to frakcja hemiceluloz, jednak doniesienia literaturowe wskazują, że może ona zawierać pozostałości pektyn. Zatem, pasmo 1074 cm^{-1} mogło pochodzić od galaktanów w ramnogalakturonanie, a 1625

cm^{-1} od grupy karboksylowej kwasów uronowych w pektynach lub kwasu glukuronowego, który jest obecny w glukuronoksylanie. Jednakże, dane monosachrydowe publikacji P2 wykazują niską zawartość kwasów uronowych we frakcji LiCl-DMSO, porównywalną do KOH.

Na widmach FT-IR hemiceluloz frakcji KOH nie odnotowano pasm charakterystycznych dla podstawienia grupy acetylowej.

Analiza PCA danych FT-IR ujawniła wyraźny rozkład wyników acetylowanych hemiceluloz frakcji LiCl-DMSO na konkretne terminów: okres przedzbiorczy (T1-T3), termin zbioru (T4) i okres pozbiorczego przechowywania (T5-T7). Co istotne, na ten rozkład miały wpływ pasma pochodzące od grupy acetylowej i mannozy. Stąd, acetylowany glukomannan może być istotnym markerem zmian zachodzących w roślinnej ścianie komórkowej podczas rozwoju owoców.

4.3.3. Wyniki spektroskopii Ramana

Widma Ramana frakcji pektyn WSP i ISP wykazały podobieństwa wynikające z pasm charakterystycznych dla pektyn, ale zaobserwowano różnice wynikające z różnej estryfikacji. Mianowicie, dla ISP odnotowano przesunięcie pasma odpowiadającego drganiom $\nu\text{C-H}$ do wartości 2937 cm^{-1} w porównaniu do WSP, gdzie występowało przy 2957 cm^{-1} , co można powiązać z niższym stopniem estryfikacji pektyn frakcji ISP w porównaniu do WSP. Na to przesunięcie pasma mają wpływ estry acetylowe i metylowe, przy czym pasmo w okolicy 2940 cm^{-1} jest związane z obecnością estrów acetylowych, a 2960 cm^{-1} z estrami metylowymi. Ponadto, pasmo 1747 cm^{-1} $\nu\text{C=O}$ miało wyższą intensywność na widmach frakcji WSP.

Widma Ramana frakcji LiCl-DMSO i KOH wykazały podobieństwa wynikające z pasm charakterystycznych dla hemiceluloz, ale zaobserwowano różnice wynikające z obecności grup acetylowych. Tylko na widmie frakcji LiCl-DMSO zidentyfikowano pasma przypisywane grupom acetylowym w hemicelulozach: 2937 cm^{-1} i 1730 cm^{-1} . Najintensywniejsze pasmo na widmie LiCl-DMSO miało dwa maksima przy 2897 cm^{-1} i 2937 cm^{-1} . Co istotne, dla T4 – T7 odnotowano przesunięcie pasma w kierunku ramienia przy 2937 cm^{-1} , a tym samym wzrost stopnia acetylacji hemiceluloz w okresie T4-T7. Pasma w zakresie $1000 - 1200\text{ cm}^{-1}$ są specyficzne dla hemiceluloz. Dla glukomananów występują dwa maksima przy ok. 1116 i 1087 cm^{-1} , a dla ksyloglukanu przy ok. 1120 i 1097 cm^{-1} . Na tej podstawie stwierdzono, że frakcja LiCl-DMSO była obfita w

glukomannany w przypadku odmiany Idared, natomiast Pinova zarówno w glukomannany jak i ksyloglukan. Natomiast widma Ramana wykazały typowe pasma dla ksyloglukanu, przy czym nie odnotowano wyraźnych zmian w zakresie T1-T7.

4.3.4. Obrazowanie Ramana

Mikroskopię Ramana zastosowano do analizy dystrybucji polisacharydów w ścianie komórkowej i jej zmian podczas rozwoju jabłek Idared i Pinova (T1, T4, T7).

Hiperspektralne mapy ramanowskie poddano dwóm oddzielnym analizom. Najpierw przeprowadzono analizę wstępną rozkładu intensywności pojedynczego pasma, a następnie wielowymiarową analizę obrazu, opartą na widmach referencyjnych polisacharydów frakcji WSP, ISP, LiCl-DMSO oraz pektyn wysoko- i niskiestryfikowanych.

W analizie rozkładu intensywności pojedynczego pasma wybrano pasma markerowe: 2933 cm^{-1} (ściana komórkowa), 1090 cm^{-1} (celuloza), 850 cm^{-1} (pektyny), 1750-1720 cm^{-1} (grupa karbonylowa). Wykazano, że w ścianie komórkowej jabłek w terminie przedzbiorczym (T1) i terminie zbioru (T4) dominującym polisacharydem były pektyny, a po trzech miesiącach przechowywania (T7) prawdopodobnie hemicelulozy. Jednoznaczne rozróżnienie hemiceluloz i celulozy w ścianie komórkowej za pomocą pasma 1090 cm^{-1} było niemożliwe, z uwagi na podobną strukturę tych polisacharydów. Dlatego też, została przeprowadzona analiza składowych rzeczywistych (z ang. *True Component Analysis*), opierająca się na widmach w pełnym zakresie liczby falowej, 4000-0 cm^{-1} , które są unikalne dla danego polisacharydu. Co więcej, zastosowano widma polisacharydów frakcji bezpośrednio izolowanych ze ściany komórkowej jabłek: pektyny o wyższym stopniu estryfikacji (WSP), pektyny o niższym stopniu estryfikacji (ISP), acetylowane hemicelulozy (LiCl-DMSO) i deacetylowane hemicelulozy (KOH). Analiza wykazała, że w okresie T1-T4 dominowały pektyny frakcji WSP w ścianie komórkowej. Co więcej, pektyny frakcji WSP były równomiernie rozłożone w ścianie komórkowej, a pektyny frakcji ISP wykazały tendencję do gromadzenia się w pobliżu narożnika ściany. W celu sprawdzenia tej zależności przeprowadzono dodatkową analizę na podstawie widm pektyny o wysokim stopniu estryfikacji ($\text{DE} \geq 85\%$) i pektyny o niskim stopniu estryfikacji ($\text{DE} 20-35\%$). Potwierdziła ona, że pektyny o wysokim stopniu estryfikacji rozłożone są równomiernie wzdłuż całej ściany, a pektyny o niskim stopniu estryfikacji gromadzą się w narożnikach połączeń trzech komórek. Analiza umożliwiła lokalizację

celulozy i hemiceluloz w ścianie komórkowej oraz, co istotne, rozróżnienie między hemicelulozami acetylowanymi (LiCl-DMSO) i deacetylowanymi (KOH). Wykazano, że w T7 dominowały acetylowane hemicelulozy frakcji LiCl-DMSO. Ogólnie hemicelulozy nie tworzyły skupisk, przy czym acetylowane hemicelulozy (LiCl-DMSO) wykazały bardziej jednolity rozkład wzdłuż ściany komórkowej.

4.3.5. Wnioski

Wyniki PCA danych FT-IR wykazały wyraźne grupowanie wyników dla hemiceluloz frakcji LiCl-DMSO na terminy: przedzbiórce (T1-T3), termin zbioru (T4) i okres pozbiorczego przechowywania (T5-T7). Na ten rozkład wpłynęły pasma pochodzące od grupy acetylowej i mannozy, co podkreśla ich specyficzne zmiany, zachodzące w ścianie komórkowej podczas rozwoju owoców. Badania mikrostruktury ściany komórkowej przeprowadzone za pomocą obrazowania Ramana wykazały, że acetylowane hemicelulozy są obfite w ścianie komórkowej jabłek podczas pozbiorczego przechowywania (T7). Zastosowanie unikalnych widm polisacharydów izolowanych ze ściany komórkowej w analizie True Component Analysis pozwoliło na rozróżnienie hemiceluloz acetylowanych i deacetylowanych w ścianie.

4.4. Publikacja P.4

Szymańska-Chargot, M., Pękała, P., Myśliwiec, D., Cieśla, J., Pieczywek, P. M., Siemińska-Kuczer, A., Zdunek, A. (2024). A study of the properties of hemicelluloses adsorbed onto microfibrillar cellulose isolated from apple parenchyma. *Food Chemistry*, 430, 137116.

W publikacji P.4 przedstawiono badania adsorpcji hemiceluloz na celulozie mikrofibrylarnej izolowanej z miąższu jabłka. Celem badań było wykazanie oddziaływań pomiędzy polisacharydami niecelulozowymi a celulozą mikrofibrylarną oraz właściwości fizykochemicznych i mechanicznych folii celulozowo-hemicelulozowych.

Badania adsorpcji prowadzono dla celulozy mikrofibrylarnej wyizolowanej z jabłek oraz polisacharydów niecelulozowych: komercyjnie dostępne hemicelulozy (β -D-glukan, glukomannan, ksylan, ksyloglukan) i pektyny (galaktan, arabinan, ramnogalakturonan, pektyny z cytrusów o różnym stopniu estryfikacji: 20–34%, 55–70%, and $\geq 85\%$).

4.4.1. Kinetyka i równowaga adsorpcji

Przeprowadzone badania wykazały, że zaszła adsorpcja hemiceluloz: ksyloglukanu, ksylanu, glukomannu i β -D-glukanu na celulozie. Natomiast dla pektyn nie odnotowano oddziaływań z celulożą. Kinetyka adsorpcji prowadzona była przez 7,5 h, lecz równowaga adsorpcyjna badanych układów została osiągnięta stosunkowo szybko, już po około 3-4 godzinach. Analiza parametrów kinetycznych ujawniła, że dla β -D-glukanu i ksylanu dominował szybki proces adsorpcji, a w przypadku glukomannanu znaczący udział miały procesy szybkie i średnie. Natomiast dla ksyloglukanu odnotowano średnie i wolne procesy adsorpcji. Zaproponowano, że procesy szybkiej adsorpcji związane były z mechanizmem tworzenia ogonów i pętli (z ang. *tails and loops*) przez makrocząsteczki hemiceluloz, które tylko fragmentami łańcucha były połączone z celulożą. Natomiast podczas procesów wolnych mogło dochodzić do zmiany konformacji makrocząsteczek i dopasowywania się do powierzchni celulozy.

Najlepsze dopasowanie wyników równowagi adsorpcji uzyskano dla modeli izoterm Freundlicha i Redlicha-Petersona. Plateau adsorpcji dla ksyloglukanu i ksylanu osiągnięto przy stosunkowo niskich wartościach maksymalnej adsorpcji, natomiast dla β -D-glukanu i glukomannu maksymalna pojemność adsorpcyjna nie została osiągnięta w badanym zakresie stężeń, co wskazuje na ich duże powinowactwo do celulozy.

4.4.2. Charakterystyka układów celuloza – hemiceluloza

Adsorpcja hemiceluloz na celulozie mikrofibrylarnej wpływała na właściwości fizykochemiczne powstałych układów, tj. wielkość cząstek i ich stabilność koloidalną. Wykazano, że obecność β -D-glukanu i ksyloglukanu w układzie z celulożą prowadziła do wyraźnego zwiększenia średnicy cząstek i polidispersyjności. Ponadto, potencjał elektrokinetyczny (ZP, z ang. *Zeta Potential*) różnił się statystycznie pomiędzy celulożą a układami celuloza- β -D-glukan i celuloza-glukomannan.

Analiza termiczna DSC układów poadsorpcyjnych celuloza-hemiceluloza wykazała, że dodatek hemiceluloz powodował niewielki wzrost temperatury degradacji. Odnotowano również obniżenie entalpii dla tych układów, z największą zmianą dla układu celuloza-ksyloglukan, co może wskazywać, że ksyloglukan najsilniej modyfikował właściwości celulozy.

Analiza widm FT-IR i Ramana układów poadsorpcyjnych celuloza-hemiceluloza ujawniła jedynie niewielkie różnice, z uwagi na podobną strukturę celulozy i

hemiceluloz. Różnice zaobserwowano dla układów celuloza- β -D-glukan i celuloza-glukomannan, gdzie pasmo 997 cm^{-1} (C-C, C-OH, C-H drgania pierścienia i grup bocznych) zwiększyło intensywność w porównaniu do widma celulozy. Na widmie Ramana pasmo 896 cm^{-1} zmniejszyło intensywność dla układów celuloza-hemiceluloza, co sugeruje wzrost uporządkowania mikrofibryli celulozy w obecności hemiceluloz.

4.4.3. Właściwości mechaniczne filmów celulozowo-hemicelulozowych

Dodatek hemiceluloz do folii celulozowych spowodował zmniejszenie ich elastyczności, a jednocześnie zwiększenie odporności na zerwanie. Badane kompozyty celuloza-hemiceluloza były zatem bardziej sztywne i wytrzymałe, ale mniej podatne na deformacje.

4.4.4. Wnioski

W badaniach wykazano adsorpcję hemiceluloz: glukomannanu, ksyloglukanu, β -D-glukanu i ksylanu na celulozie mikrofibrylarnej w przeciwieństwie do pektyn, które nie wykazały oddziaływań z celulozą. Kinetyka adsorpcji wykazała różnice pomiędzy hemicelulozami w mechanizmie nagromadzenia na powierzchni celulozy. Osiągnięcie równowagi adsorpcji dla ksyloglukanu trwało dłużej niż dla pozostałych hemiceluloz, co może wynikać z dłuższych procesów dopasowania łańcuchów do powierzchni adsorbentu. Największą adsorpcję zaobserwowano dla glukomannu, wskazując na jego wysokie powinowactwo do celulozy.

5. Omówienie wyników przedstawionych w materiałach uzupełniających

5.1. Opracowanie metody acetylacji hemiceluloz

5.1.1. Wstęp

Hemicelulozy, zaraz po celulozie, to jedne z najpowszechniej występujących biopolimerów, które stanowią około 25-35% biomasy lignocelulozowej (Baruah i in., 2018). Zyskały zainteresowanie ze względu na modyfikowalne właściwości fizykochemiczne, nietoksyczność i dostępność, w tym możliwość pozyskania z odpadów poprodukcyjnych i rolniczych, co czyni je atrakcyjnymi pod względem ekonomicznym (Martins i in., 2024; Mugwagwa i Chimphango, 2020; Rao i in., 2023).

Ksyloglukan, glukomannan i ksylan są głównymi przedstawicielami hemiceluloz. Jest to grupa polisacharydów o zróżnicowanym składzie, zależnym od źródła występowania. Ogólnie, hemicelulozy zbudowane są z łańcucha głównego monosacharydów połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Ksyloglukany składają się z łańcucha jednostek glukozy, która w pozycji O-6 ma przyłączoną ksylozę, przy której dodatkowo może występować galaktoza z fukożą i arabinozą (Fry, 1989; Hayashi, 1989). Glukomannany to łańcuch połączonych jednostek mannozy i glukozy, a galaktoglukomany dodatkowo mają przyłączoną galaktozę w pozycji O-6 glukozy (Aspinall, 1959; Melton i in., 2009). Łańcuch główny ksylanów składa się z jednostek ksylozy z dodatkowymi rozgałęzieniami, np. w postaci jednostek arabinozy tak, jak w przypadku arabinoksyłanu (Aspinall, 1959). Dodatkowo w strukturze hemiceluloz roślinnej ściany komórkowej mogą występować grupy acetylowe (Gille i Pauly, 2012; Pauly i Ramírez, 2018), które ulegają odłączeniu w wyniku hydrolizy zasadowej, mającej miejsce przy zasadowej ekstrakcji hemiceluloz z materiału ściany komórkowej.

Hemicelulozy, ze względu dużą liczbę grup hydroksylowych w swojej strukturze, mogą wykazywać właściwości hydrofilowe i zdolność do rozpuszczania w rozpuszczalnikach polarnych. Natomiast właściwości powierzchniowe polimerów są również zależne od ich konformacji, długości łańcucha i jego rozgałęzień oraz zdolności do tworzenia sieci wodorowych pomiędzy łańcuchami. Przeprowadzając dodatkowe procesy chemiczne, takie jak estryfikacja, eteryfikacja, kopolimeryzacja, można ulepszać właściwości fizykochemiczne hemiceluloz i dopasować je do konkretnych zastosowań. Acetylacja jest przykładem derywatywacji hemiceluloz, która wpływa na ich właściwości

powierzchniowe, takie jak amfifilowość/hydrofilowość/hydrofobowość (Gordobil i in., 2014), reologiczne (Trejo-Cáceres i in., 2024), termiczne (de Carvalho i in., 2019) i adsorpcyjne (Gautam i in., 2018). Wysoka acetylacja powoduje zwiększenie właściwości hydrofobowych hemiceluloz, co jest szczególnie istotne w materiałach, które wymagają odporności na wodę. Z drugiej strony, niska acetylacja hemiceluloz może również wpłynąć na redukcję sieci wiązań wodorowych i poprawę rozpuszczalności w wodzie, co zostało potwierdzone przez Liu i innych (2012) dla glukomannanu o stopniu podstawienia grupami acetylowymi (DsAc) w zakresie 0,05-0,23. Ogólnie, acetylacja polisacharydów wpływa na zwiększenie stabilności emulsji (Huang i in., 2022; Li i in., 2016), co jest szczególnie pożądane w zastosowaniach farmaceutycznych, gdzie emulsje są wykorzystywane do enkapsulacji i kontrolowanego uwalniania składników aktywnych. Ponadto, acetylacja zwiększa aktywność przeciwutleniającą polisacharydów (Xie i in., 2015).

Acetylacja to reakcja estryfikacji, polegająca na przyłączeniu grupy acetylowej do grupy hydroksylowej reszty monosacharydu w hemicelulozie. Grupa acetylowa ($\text{CH}_3\text{CO}-$) jest przedstawicielem grup acylowych ($\text{RCO}-$). Powszechnie stosowaną metodą acetylacji hemiceluloz jest reakcja z bezwodnikiem octowym w obecności kwasu siarkowego, jako katalizatora (Belmokaddem i in., 2011; Mugwagwa i Chimphango, 2020; Trejo-Cáceres i in., 2024). Wydajność tego procesu zależy m.in. od stosunku hemicelulozy do bezwodnika octowego i katalizatora. Reakcja acetylacji może być katalizowana zarówno kwasem, jak i zasadą. W literaturze opisano stosowanie katalizatorów zasadowych, takich jak wodorotlenek potasu (Koroskenyi i McCarthy, 2001), pirydyna (Fundador i in., 2012), 4-dimetyloaminopirydyna, N-metylo-pirolidyna, N-metylo-pirolidynon, N-bromosukcynimid (Xu i in., 2004). W procesach acetylacji hemiceluloz wykorzystywane są również ciecze jonowe, które jako reaktywne rozpuszczalniki niszczą sieci wiązań wodorowych i ułatwiają rozpuszczanie polisacharydów. Ayoub i inni (2013), przeprowadzili skuteczną acetylację hemiceluloz bezwodnikiem octowym w cieczy jonowej chlorku 1-allylo-3-metyloimidazoliowym ($[\text{Amim}]^+\text{Cl}^-$) bez użycia katalizatora. Wykazali, że wraz ze wzrostem temperatury reakcji w zakresie 30 - 80 °C i wydłużeniem czasu reakcji od 1 do 20 h stopień podstawienia (DsAc) zwiększył się z 0,03 do 1,25. Chociaż ciecze jonowe mają wiele zalet i należą grupy zielonych rozpuszczalników, to ich proces biodegradacji jest długotrwały i może dochodzić do kumulacji w środowisku naturalnym związków

toksycznych, do których należą kationowe fragmenty cieczy jonowych, takich jak np. kation imidazoliowy. Ponadto kolejną wadą cieczy jonowych jest ich stosunkowo wysoka cena, a ten aspekt ekonomiczny może być istotny w procesach acetylacji na większą skalę niż laboratoryjna.

W moich badaniach opracowałam metodę acetylacji hemiceluloz w środowisku bezwodnym, z bezwodnikiem octowym, jako reagentem acetylującym i bezwodnym octanem sodu w roli zasadowego katalizatora reakcji. Przedstawione zostały warunki reakcji acetylacji ksylanu, ksyloglukanu i glukomannanu, uwzględniające różną dostępność wolnych grup hydroksylowych w strukturze monosacharydów. Opracowano również hydrolizę acetylowanych produktów, która jest istotnym krokiem przy oznaczaniu stopnia podstawienia, DsAc. Produkty acetylacji scharakteryzowano za pomocą spektroskopii FT-IR oraz w sposób ilościowy wyznaczono ich stopień podstawienia DsAc.

5.1.2. Metody

5.1.2.1. Metody acetylacji

W celu wyboru optymalnej metody acetylacji hemiceluloz przeprowadzono wstępne próby na modelowym układzie z wykorzystaniem ksylanu. Testowano wpływ różnych czynników, takich jak rodzaj reagenta acetylującego, czas reakcji, obecność bądź brak katalizatora, rodzaj katalizatora. Reakcję prowadzono zarówno w układzie jednoetapowym, jak i dwuetapowym.

(M1) Proces acetylacji przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez Mugwagwa i Chimphango (2020) z pewnymi modyfikacjami. Mianowicie, 0,5 g ksylanu umieszczono w probówce szklanej z zakrętką, dodano 1,25 mL 99 % kwasu octowego i umieszczono w łaźni wodnej z mieszaniem 140 min^{-1} , w temperaturze $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 5 min. Po tym czasie reakcję zatrzymano przez umieszczenie probówki w łaźni lodowej, schładzając ją do $21 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Następnie dodano 3,3 mL bezwodnika octowego oraz katalizator reakcji - 0,1 mL 95 % kwas siarkowy VI i ponownie probówkę umieszczono w łaźni wodnej z mieszaniem 140 min^{-1} , $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 1 h. Po tym czasie produkt reakcji acetylacji strącano za pomocą 125 mL zimnego 96% etanolu przez 24 h w temperaturze $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Mieszaninę przesączono przez sączek nylonowy o porach wielkości $11 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore). Otrzymany osad przemyto czterokrotnie 100 mL 96 % etanolem i suszono w $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 24 h. Uzyskano acetylowany ksylan Xn_M1.

(M2) Przeprowadzono dwukrotny proces acetylacji (M1). Osad po pierwszym etapie acetylacji, Xn_M1, został powtórnie acetylowany zgodnie z tą samą procedurą, opisaną w (M1). Uzyskano acetylowany ksylan po dwuetapowym procesie acetylacji Xn_M2.

(M3) Proces acetylacji (M1) przeprowadzono bez obecności katalizatora, ale wydłużając czas reakcji z bezwodnikiem octowym do 24 h. Oprócz tych zmian, reakcję acetylacji ksylanu prowadzono zgodnie z metodą (M1). Uzyskano acetylowany ksylan Xn_M3.

(M4) Proces acetylacji przeprowadzono za pomocą metody opracowanej przeze mnie. Bazując na znanej reakcji acetylacji glukozy z bezwodnikiem octowym i bezwodnym octanem sodu (Bonner, 1961; Jarczewski, 2007; McMurry, 2000) zostały dobrane warunki odpowiednie dla hemiceluloz. Ok. 0,5 g ksylanu ucierano w moździerzu z 0,33 g bezwodnego octanu sodu. Następnie mieszaninę przeniesiono do szklanej probówki z zakrętką i dodano 2,5 mL bezwodnika octowego, po czym umieszczono w łaźni wodnej z mieszaniem 140 min^{-1} , w temperaturze $60 \text{ }^\circ\text{C}$, przez 2 h. Po tym czasie zawartość probówki wylano do 60 mL zimnej H_2O i mieszano szklaną bagietką przez 1 h, w celu rozpuszczenia octanu sodu. Mieszaninę przefiltrowano przez sącdek nylonowy o porach wielkości $11 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore). Przesącz wodny zebrano i dializowano wobec wody destylowanej (Spectra/Por 6 MWCO 1000, Roth), zamrożono i liofilizowano. Osad umieszczono w 60 mL zimnego 96 % etanolu i pozostawiono w temperaturze $4 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 24 h, w celu rozpuszczenia możliwych pozostałości bezwodnika octowego. Mieszaninę przesączono przez sącdek nylonowy o porach wielkości $11 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore). Otrzymany osad dodatkowo przemyto czterokrotnie 100 mL 96 % etanolu i suszono w $40 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 24 h. Uzyskano acetylowany ksylan Xn_M4.

(M5) Dwukrotny proces acetylacji (M4). Osad po pierwszym etapie acetylacji, Xn_M4, został powtórnie acetylowany, zgodnie z tą samą procedurą opisaną w (M4). Uzyskano acetylowany ksylan po dwukrotnym procesie acetylacji z bezwodnikiem octowym i bezwodnym octanem sodu Xn_M5.

5.1.2.2. Otrzymywanie acetylowanego ksyloglukanu i glukomannanu

Na podstawie wstępnie przeprowadzonych procesów acetylacji ksylanu, wybrano metodę najbardziej efektywną (M4) w celu uzyskania wysoko acetylowanego ksyloglukanu i glukomannanu. Ok. 1 g hemicelulozy ucierano z 0,67 g bezwodnego octanu sodu, przeniesiono do butelki szklanej z zakrętką i dodano nadmiarową ilość, 15

mL, bezwodnika octowego. Mieszaninę umieszczono w łaźni wodnej z mieszaniem 140 min⁻¹, 60 °C, przez 2 h. Po tym czasie zawartość próbki wylano do 120 mL zimnej H₂O i mieszano szklaną bagietką przez 1 h, w celu rozpuszczenia octanu sodu. Mieszaninę przefiltrowano przez sączone nylonowy o porach wielkości 11 μm (Millipore). Przesącz wodny zebrano i dializowano wobec wody destylowanej (Spectra/Por 6 MWCO 1000, Roth), zamrożono i liofilizowano. Natomiast osad umieszczono w 120 mL zimnego 96% etanolu przez 24 h w temperaturze 4 °C, w celu rozpuszczenia możliwych pozostałości bezwodnika octowego. Mieszaninę przesączono przez sączone nylonowy o średnicy porów 11 μm (Millipore). Otrzymany osad dodatkowo przemyto czterokrotnie 100 mL 96% etanolu i suszono w 40 °C przez 24 h. Uzyskano acetylowany ksyloglukan Xlg_M4 i acetylowany glukomannan Glm_M4.

5.1.2.3. Charakterystyka acetylowanych hemiceluloz

5.1.2.3.1. Oznaczenie DsAc hemiceluloz

Stopień podstawienia (DsAc) hemiceluloz oznaczano w dwóch etapach. Najpierw przeprowadzono hydrolizę hemiceluloz, której produktem był kwas octowy. Następnie oznaczono stężenie kwasu octowego w próbce, obliczono procentową zawartość grup acetylowych w danej masie próbki oraz stopień podstawienia acetylowego poszczególnych hemiceluloz.

5.1.2.3.1.1. Hydroliza

Hydrolizę zasadową acetylowanych hemiceluloz przeprowadzono z założeniem maksymalnego podstawienia grup hydroksylowych (-OH) jednostek monosacharydowych przez grupy acetylowe. Dla ksylanu stopień maksymalnego podstawienia to 2, a dla ksyloglukanu i glukomannu 3. Zgodnie z tym, że 1 mol ksylozy zawiera dostępne 2 mole grup (-OH), przyjęto, że 10 mg ksylanu zawiera 0,152 mmoli grup (-OH). Natomiast dla ksyloglukanu i glukomannu, gdzie 1 mol glukozy/mannozy zawiera dostępne 3 mole grup (-OH), przyjęto, że 10 mg próbki zawiera 0,185 mmoli (-OH). Na podstawie tych założeń obliczono ilość zasady potrzebnej do całkowitej hydrolizy estrów acetylowych. Mianowicie, do 10 mg ksylanu dodano 1,5 mL 0,1 molL⁻¹ NaOH, a do 10 mg ksyloglukanu/glukomannu dodano 1,9 mL 0,1 molL⁻¹ i mieszano na rotatorze przez 24 h w temperaturze pokojowej 21 ± 1 °C, a na koniec zneutralizowano odpowiadającą ilością 0,1 molL⁻¹ HCl.

5.1.2.3.2. Oznaczenie stężenia kwasu octowego

Stężenie kwasu octowego oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 340 nm, z wykorzystaniem zestawu odczynników i procedury (Acetic Assay Kit, k-ACETIC, Megazyme). Pomiary wykonywano w kuwetach kwarcowych o drodze optycznej 1 cm. Do 2 mL próbki ($0,4 - 1,7 \text{ mgmL}^{-1}$) dodano 0,5 mL reagenta 1 (bufor o pH 8,4 kwasu L-jabłkowego i azydku sodu ($0,02 \text{ \% w/v}$) oraz 0,2 mL reagenta 2 (NAD^+ , adenozylo5'-trifosforan (ATP), poliwinylpirolidon (PVP), koenzym A (CoA)), wymieszano i zmierzono absorbancję po 3 min. Kolejno dodano 0,02 mL reagenta 3 (dehydrogenaza L-jabłczanowa, syntaza cytrynianowa), wymieszano i zmierzono absorbancję po 4 min. Następnie dodano 0,02 mL reagenta 4 (syntetaza acetylokoenzymu A (acetylo-CoA)), wymieszano i zmierzono absorbancję po 12, 16 i 20 min. Dla oznaczeń próbek o bardzo małej ilości kwasu octowego zastosowano metodę dodatku wzorca wewnętrznego - kwasu octowego ($0,10 \text{ mgmL}^{-1}$). Wykonano po trzy pomiary dla każdej próbki.

5.1.2.3.3. Obliczenia DsAc

Na podstawie wyników stężenia kwasu octowego w próbce obliczono procentową zawartość grup acetylowych (%acetyl). Następnie, wyznaczono stopień podstawienia acetylowego DsAc zgodnie z równaniem (5), które uwzględnia masę molową podstawionych jednostek monosacharydowych. Dla ksylanu jest to $132 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, masa molowa reszt anhydroksylozy, która należy do pentoz, a dla glukomannanu i ksyloglukanu $162 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ - masa molowa anhydroglukozy, anhydromannozy, należących do heksoz.

$$(5) \text{ DsAc} = \frac{M_{\text{mon}} \times \% \text{acetyl}}{(M_{\text{acetyl}} \times 100) - (M_{\text{acetyl}} - 1) \times \% \text{acetyl}}$$

DsAc – stopień podstawienia acetylowego,

M_{mon} – masa cząsteczkowa reszty monosacharydowej: anhydroksyloza, $132 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$;
anhydroglukoza/anhydromannoza, $162 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$,

%acetyl – procentowa zawartość grup acetylowych,

M_{acetyl} – masa cząsteczkowa grup acetylowych: $43 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$,

$(M_{\text{acetyl}} - 1)$ – różnica w masie cząsteczkowej po podstawieniu atomu wodoru w grupie hydroksylowej.

5.1.2.4. Spektroskopia FT-IR

Spektroskopię FT-IR wykorzystano do analizy struktury hemiceluloz wyjściowych i po acetylacji. Widma FT-IR uzyskano za pomocą spektrometru Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Scientific, Madison, WI, USA), wyposażonego w przystawkę Smart iTR ATR. Widma obejmowały zakres liczb falowych 4000–650 cm^{-1} . Dla każdego widma wykonano 200 skanów z rozdzielczością 4 cm^{-1} . Dla każdej próbki wykonano po trzy widma, z których wyliczono średnią i wykonano korektę linii bazowej za pomocą oprogramowania OMNIC (Thermo Scientific). Widma znormalizowano do [0, 1] i przedstawiono graficznie przy użyciu oprogramowania Origin (Origin Lab v8.5 Pro, Northampton, USA).

5.1.3. Wyniki

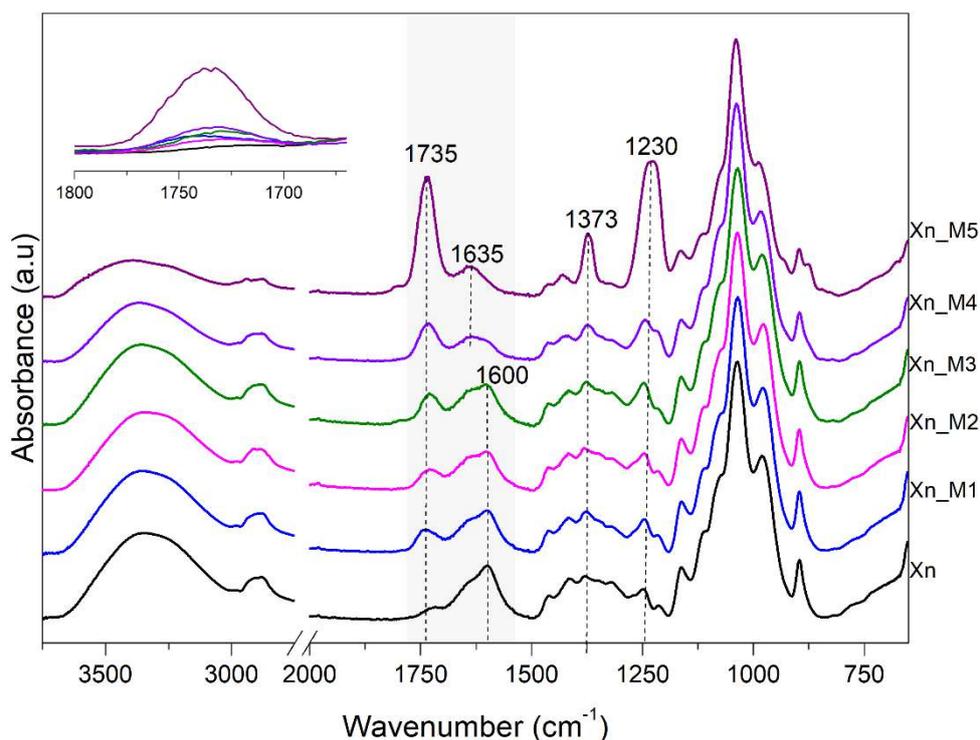
5.1.3.1. Charakterystyka acetylowanych hemiceluloz

Skuteczność metod acetylacji hemiceluloz wstępnie oceniano na podstawie widm FT-IR, analizując charakterystyczne pasma związane z podstawieniem grupy acetylowej: 1735-40, 1370, 1230 cm^{-1} . Pasma z maksimum przy długości fali 1735-40 cm^{-1} odpowiada drganiom rozciągającym grupy karbonylowej (ν C=O), pasmo z maksimum przy około 1370 cm^{-1} odpowiada drganiom deformacyjnym grupy metylowej w grupie acetylowej (δ C-CH₃), a pasmo z maksimum przy około 1220 cm^{-1} - drganiom rozciągającym (ν C-O) w octanie (Bi i in., 2026; Mohebbi, 2008; Stepan i in., 2013). Założono, że intensywność tych pasm wzrośnie wraz ze wzrostem stopnia podstawienia acetylowego, a zmniejszy się intensywność szerokiego pasma pochodzącego od niepodstawionych grup hydroksylowych (ν OH), które występuje w zakresie ok. 3000-3500 cm^{-1} liczby falowej.

Rysunek 7. przedstawia widma FT-IR ksylanu przed i po przeprowadzeniu acetylacji różnymi metodami. Zaobserwowano wzrost intensywności charakterystycznego pasma 1735 cm^{-1} (ν C=O) dla wszystkich wariantów acetylowanych (Xn_M1-5) w porównaniu do ksylanu przed acetylacją (Xn), co potwierdziło zajście acetylacji. Dla ksylanu komercyjnego odnotowano również obecność pasma przy 1735 cm^{-1} (ν C=O), ale o bardzo małej intensywności, co może wskazywać na niewielkie pozostałości grup acetylowych po hydrolizie, a także może pochodzić od kwasu glukuronowego. Widma ksylanu acetylowanego kwasem octowym i bezwodnikiem octowym (Xn_M1-3) wykazały niską intensywność pasma 1735 cm^{-1} . Ponadto, na

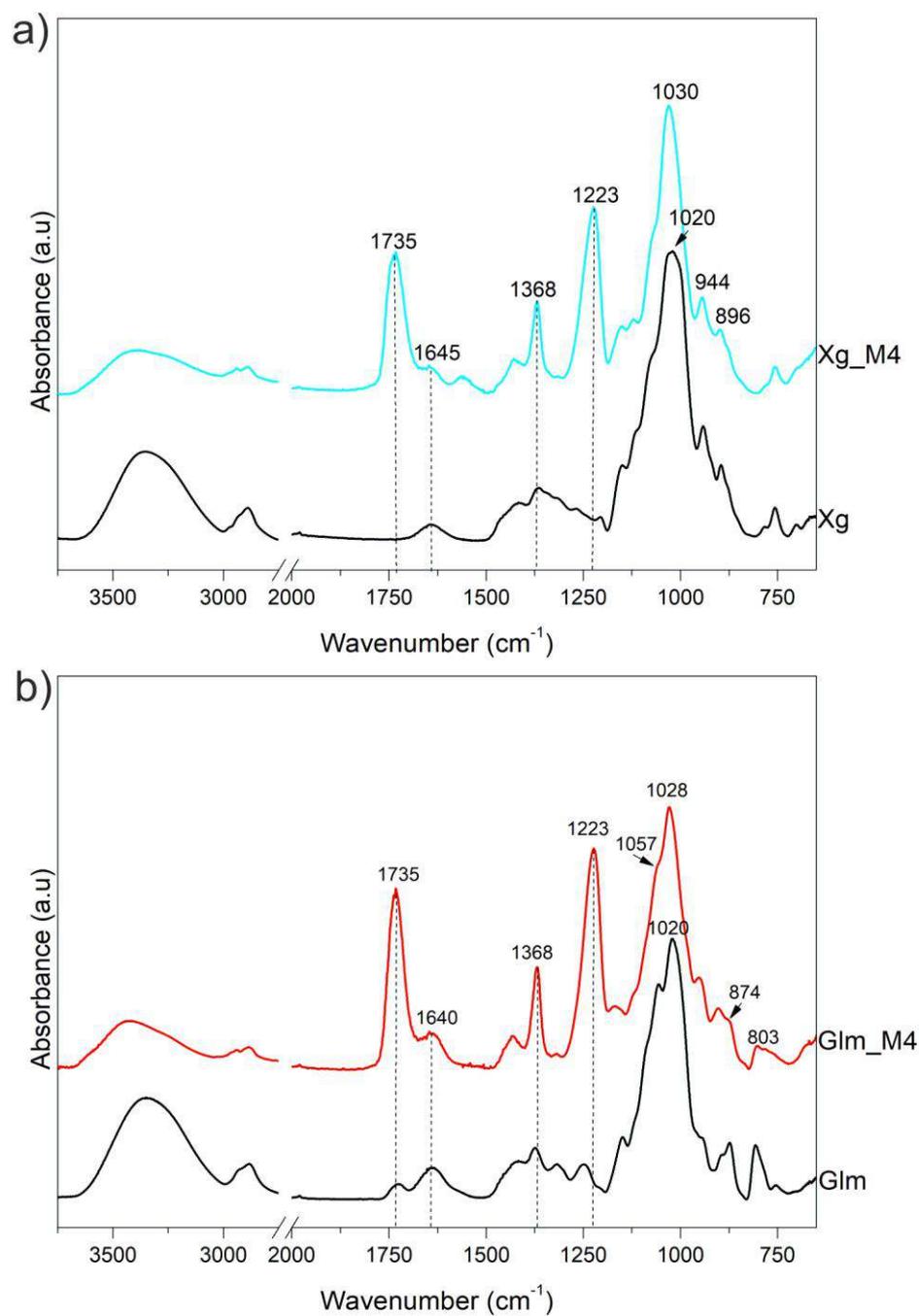
widmach nie zaobserwowano znaczących zmian, wynikających z prowadzenia dwuetapowej acetylacji (Xn_M2), ale zauważono niewielki wzrost intensywności tego pasma dla wariantu o acetylacji wydłużonej do 24 h, bez katalizatora (Xn_M3).

Wyraźnie większą intensywność pasma przy 1735 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$) wykazały widma ksylanu acetylowanego bezwodnym octanem sodu i bezwodnikiem octowym (Xn_M4-5), co świadczy o bardziej efektywnej acetylacji w tych wariantach. W tym przypadku zauważalne są znaczne różnice, wynikające z dwuetapowej acetylacji (Xn_M5), gdzie widoczny jest wzrost nie tylko pasma 1735 cm^{-1} , ale i pozostałych pasm charakterystycznych dla estrów octanowych: 1370 cm^{-1} ($\delta\text{ C-CH}_3$) i 1230 cm^{-1} ($\nu\text{ C-O}$). Pasma przy $1600\text{-}1635\text{ cm}^{-1}$, przypisywane drganiom zginającym ($\delta\text{ O-H}$) zaabsorbowanej wody w hemicelulozach (Farhat et al., 2017; Kačuráková et al., 1998), wykazało zmniejszenie intensywności po acetylacji M4 i M5. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami Ren i in. (2007), którzy wykazali zmniejszenie intensywności pasma 1627 cm^{-1} wraz ze wzrostem acetylacji. Szerokie pasmo w zakresie $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, pochodzące od wolnych grup hydroksylowych ($\nu\text{ OH}$), wykazało zmniejszenie intensywności po acetylacji, co może wskazywać, że wolne grupy hydroksylowe zostały częściowo podstawione grupami acetylowymi.



Rysunek 7. Widma FT-IR ksylanu przed i po acetylacji różnymi metodami. Xn- ksylan; Xn_M1 – acetylowany ksylan metodą z kwasem octowym/bezwodnikiem octowym/ $\text{H}_2\text{SO}_4/50^\circ\text{C}/1\text{h}$; Xn_M2 – dwukrotnie acetylowany ksylan metodą z kwasem octowym/bezwodnikiem octowym/ $\text{H}_2\text{SO}_4/50^\circ\text{C}/1\text{h}$ (x2); Xn_M3 – acetylowany ksylan metodą z kwasem octowym/bezwodnikiem octowym/ $50^\circ\text{C}/24\text{h}$ bez katalizatora; Xn_M4 – acetylowany ksylan metodą z octanem sodu/bezwodnikiem octowym/ $60^\circ\text{C}/2\text{h}$; Xn_M5 – dwukrotnie acetylowany ksylan metodą z octanem sodu/bezwodnikiem octowym/ $60^\circ\text{C}/2\text{h}$ (x2).

Analizowano również widma FT-IR ksyloglukanu (Rysunek 8a) i glukomannanu (Rysunek 8b) przed i po acetylacji wybraną metodą z bezwodnym octanem sodu i bezwodnikiem octowym. Potwierdzono acetylację z uwagi na obecność pasm charakterystycznych dla podstawienia grupy acetylowej: 1735 (ν C=O), 1368 (δ C-CH₃) i 1223 cm^{-1} (ν C-O). Co więcej, na podstawie intensywności tych pasm, stwierdzono efektywną acetylację już po jednokrotnym procesie acetylacji, w przeciwieństwie do acetylacji ksylanu.



Rysunek 8. Widma FT-IR hemiceluloz przed i po acetylacji metodą z bezwodnym octanem sodu i bezwodnikiem octowym M4; a) Xlg – ksyloglukan, Xlg_M4 – acetylowany ksyloglukan metodą z octanem sodu/bezwodnikiem octowym/60°C/2h; b) Glm – glukomannan, Glm_M4 – acetylowany glukomannan metodą z octanem sodu/bezwodnikiem octowym/ 60°C/2h.

Tabela 1. Stopień podstawienia acetylowego (DsAc), zawartość grup acetylowych i odzysk masy po acetylacji hemiceluloz uzyskany metodami o podanych warunkach reakcji. Różne litery wskazują różnice istotne statystycznie (ANOVA jednoczynnikowa, test Tukeya $p < 0,05$). AcetAcid, kwas octowy; AcetAnhyd, bezwodnik octowy; sulfAcid, kwas siarkowy; NaAc, bezwodny octan sodu.

Próbka	Warunki acetylacji	Zawartość grup acetylowych%	DsAc	Odzysk masy (%)
Xn	-	0,08±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	-
Xn_M1	AcetAcid/AcetAnhyd/sulf Acid/50°C/1h	0,39±0,07 ^{ab}	0,01±0,00 ^{ab}	53,01
Xn_M2	AcetAcid/AcetAnhyd/sulf Acid/50°C/1h (x2)	1,23±0,58 ^{bc}	0,04±0,00 ^{ab}	30,90
Xn_M3	AcetAcid/AcetAnhyd/50°C /24h	2,67±0,13 ^d	0,08±0,00 ^{cd}	85,82
Xn_M4	NaAc/AcetAnhyd/60°C/2h	3,66±0,38 ^e	0,12±0,01 ^d	78,54
Xn_M5	NaAc/AcetAnhyd/60°C/2h (x2)	14,44±0,49 ^f	0,52±0,02 ^e	53,66
Xlg	-	0,05±0,03 ^a	0,00±0,00 ^a	-
Xlg_M4	NaAc/AcetAnhyd/60°C/2h	21,39±0,49 ^g	1,02±0,03 ^f	128,97
Glm	-	1,42±0,05 ^c	0,05±0,00 ^{bc}	-
Glm_M4	NaAc/AcetAnhyd/60°C/2h	24,63±0,31 ^h	1,22±0,02 ^g	109,88

Ilościowe wyniki acetylacji hemiceluloz przedstawiono w Tabeli 1. Zgodnie z wynikami FT-IR, ksylan modyfikowany kwasem octowym i bezwodnikiem octowym Xn_M1 był nisko acetylowany, a jego stopień podstawienia to 0,01. Proces dwuetapowej acetylacji tą metodą skutkowało czterokrotnym zwiększeniem stopnia podstawienia DsAc 0,04, przy czym nadal uzyskano jego bardzo niską wartość. Ponadto w tej metodzie stosowany był kwasowy katalizator – stężony kwas siarkowy VI, który w kontakcie przez godzinę z ksylanem (Xn_M1), a następnie w drugim etapie acetylacji kolejną godzinę (Xn_M2), spowodował częściową hydrolizę acetylowanego ksylanu, otrzymując odzysk masy odpowiednio 53,01 i 30,90 %. Wydłużenie czasu reakcji do 24 h i zrezygnowanie z dodatku kwasu siarkowego pozwoliło otrzymać ksylan (Xn_M3) o DsAc równym 0,08. Ponadto, w wyniku niezastosowania kwasu siarkowego uzyskano wysoki odzysk masy po acetylacji, wynoszący 85,82 % dla Xn_M3. DsAc 0,12 i stosunkowo wysoki odzysk masy (78,54 %) uzyskano metodą z bezwodnym octanem sodu i bezwodnikiem octowym. Czas reakcji wynosił 2 h, więc znacznie krócej niż przy wariacie Xn_M3, dla którego

otrzymana wartość DsAc była niewiele niższa. Efektywne okazało się przeprowadzenie dwukrotnej acetylacji ksylanu bezwodnym octanem sodu i bezwodnikiem octowym, otrzymując DsAc 0,52 i odzysk masy 53,66 %, większy w porównaniu do dwukrotnej acetylacji ksylanu w obecności kwasu siarkowego (Xn_M2). W wyniku acetylacji ksyloglukanu i glukomannanu bezwodnym octanem sodu i bezwodnikiem octowym otrzymano produkt o stosunkowo wysokim stopniu acetylacji już po jednokrotnym procesie acetylacji. Acetylowany ksyloglukan (Xlg_M4) miał zawartość grup acetylowych równą 21,39 %, a stopień podstawienia 1,02 i odzysk masy 128,97 %. Dla glukomannanu (Glm_M4) również uzyskano wysoką zawartość grup acetylowych (24,63 %) i wysoki stopień podstawienia DsAc (1,22) oraz odzysk masy (109,88 %). De Carvalho i inn. (2019) również podaje, że w przypadku acetylacji, gdy produkt osiąga wysoki stopień podstawienia grupami acetylowanymi, jego masa jest większa niż masa hemicelulozy przed modyfikacją

5.1.4. Dyskusja i wnioski

Acetylacja hemiceluloz zachodzi w grupach hydroksyloowych monomerów cukrowych, które są słabymi nukleofilami O, więc reakcja estryfikacji wymaga określonych warunków, aby przebiegała efektywnie. Na powodzenie acetylacji hemiceluloz ma wpływ odpowiedni stosunek środka acetylującego do hemicelulozy, a także obecność i rodzaj katalizatora oraz warunki reakcji, takie jak temperatura i czas. Jako środki acetylujące hemicelulozy stosuje się halogenki acetylu, bezwodniki octowe i kwas octowy. Chlorek acetylu jest najczęściej stosowanym halogenkiem, który jest wysoce reaktywny (McMurry, 2000) i nie wymaga wysokiej temperatury reakcji. Ponadto chlorki acetylu, jako najbardziej reaktywne pochodne kwasu octowego, są stosowane do syntezy acetylowanych związków organicznych, których nie można uzyskać przy użyciu słabszych reagentów, takich jak kwas karboksylowy - kwas octowy. Jednak metoda acetylacji przy użyciu halogenków ma istotną wadę, mianowicie w reakcji z chlorkiem acetylu powstaje kwas solny (HCl). Należy zaznaczyć, że obecność mocnych kwasów może prowadzić do degradacji hemiceluloz. W związku z tym, konieczny jest dodatek zasady w celu neutralizacji kwasu. Bezwodniki octowe to słabsze reagenty acetylujące w porównaniu do chlorków acetylowych, ale mocniejsze niż kwas octowy. Co istotne, wymagają one bezwodnego środowiska reakcji, podwyższonej temperatury oraz obecności katalizatora.

W niniejszych badaniach testowych acetylacja ksylanu została przeprowadzona za pomocą metody z użyciem kwasu octowego i bezwodnika octowego w różnych warunkach reakcji: w obecności katalizatora kwasowego – kwasu siarkowego VI oraz bez katalizatora, wydłużając czas reakcji z 1 h do 24 h, a także prowadząc dwuetapową acetylację. Wykazano, że ta metoda acetylacji jest mało efektywna, gdyż otrzymano ksylan o niskim stopniu podstawienia. Zastosowanie mocnego kwasu, jako katalizatora reakcji, spowodowało częściową degradację hemicelulozy. Natomiast proces acetylacji bez katalizatora z użyciem kwasu octowego i bezwodnika octowego był wolny i wciąż mało efektywny. Opracowano zatem metodę acetylacji hemiceluloz z użyciem bezwodnika octowego, ale zamiast kwasowego katalizatora zastosowano zasadowy bezwodny octan sodu, uzyskując satysfakcjonujący stopień podstawienia (DsAc), wynoszący 0,52 dla ksylanu, 1,02 dla ksyloglukanu oraz 1,22 dla glukomannanu. Metoda acetylacji hemiceluloz była wzorowana na metodzie całkowitej acetylacji glukozy do pentaacetyloglukozy. Z uwagi na zastosowanie bezwodnika octowego, jako reagenta acetylującego, reakcję prowadzono w środowisku bezwodnym i w podwyższonej temperaturze. Bezwodny octan sodu, jako katalizator reakcji acetylacji hemiceluloz, jest w literaturze wciąż niedoceniany i brakuje szczegółowej metodyki z jego zastosowaniem do hemiceluloz. Akkus i in. (2018) wykazali pozytywny wpływ octanu potasu, który został w osadzie po zasadowej ekstrakcji hemiceluloz, na efektywność acetylacji hemiceluloz bezwodnikiem octowym, jednakże nie opracowali ilościowej metody dodatku tej soli w roli katalizatora. Metody acetylacji hemiceluloz z użyciem zasadowych katalizatorów wykorzystują głównie roztwór wodorotlenku sodu, a więc rezygnują z warunków bezwodnych reakcji, a także pirydynę, która jest związkami drażniącym i toksycznym. Natomiast octan sodu jest uważany za substancję bezpieczną dla zdrowia i tańszą niż pirydyna.

5.2. Adsorpcja acetylowanych hemiceluloz na celulozie mikrofibrylarnej

5.2.1. Wstęp

Roślinna ściana komórkowa to złożona struktura zbudowana głównie z polisacharydów, takich jak celuloza, hemicelulozy i pektyny, pomiędzy którymi zachodzą wzajemne oddziaływania. Oddziaływania te są istotne dla właściwości mechanicznych ściany komórkowej oraz mogą wpływać na jej integralność.

Wcześniejsze modele roślinnej ściany komórkowej zakładały, że ksyloglukan może rozległe pokrywać mikrofibryle celulozowe. Najnowszy model wskazuje jednak, że ksyloglukan wiąże się z mikrofibrylami celulozy jedynie w ograniczonych miejscach, tworząc tzw. biomechaniczne połączenia (z ang. *biomechanical hotspots*) (Park i Cosgrove, 2015). Natomiast wciąż oddziaływania hemiceluloz z celulozą pozostają nie w pełni poznane.

Badania adsorpcji hemiceluloz na celulozie to modelowe badania *in vitro*, które upraszczają złożoność roślinnej ściany komórkowej, jednakże umożliwiają badanie mechanizmów oddziaływań pomiędzy tymi polisacharydami na podstawie zjawisk powierzchniowych. Adsorpcja zależy w dużej mierze od rodzaju adsorbentu, dlatego tak ważna jest analiza struktury celulozy, jej krystaliczności czy ładunku powierzchniowego. Również istotne są cechy strukturalne hemiceluloz, tj. konformacja, łańcuchy boczne oraz stopień podstawienia grup hydroksylowych. Modelowe badania adsorpcyjne wykazały, że adsorpcja ksyloglukanu może przebiegać z przyjęciem przez ksyloglukan płaskiego ułożenia na powierzchni celulozy, określanego jako „pociągi” (z ang. *trains*), oraz w ograniczonych połączeniach z mikrofibrylami, gdzie tylko część łańcucha jest bezpośrednio związana z celulozą a pozostałe części tworzą tzw. „pętle i ogony” (z ang. *loops and tails*) (Pękala i in. 2023). Masa cząsteczkowa i stężenie hemicelulozy w układzie adsorpcyjnym może wpływać na ten mechanizm nagromadzenia.

Hemicelulozy w roślinnej ścianie komórkowej są acetylowane a ich stopień acetylacji zmienia się wraz z rozwojem rośliny. Przypuszcza się nawet, że acetylowany glukomannan może być markerem zmian w ścianie komórkowej. Co więcej, wykazano, że stopień acetylacji glukomannanu był modyfikowany po utworzeniu ściany (Kim et al., 2010). Ponadto stopień acetylacji hemiceluloz wpływa na ich właściwości fizykochemiczne, konformację łańcucha oraz dostępność wolnych grup hydroksylowych, które mogą tworzyć wiązania wodorowe z innymi makrocząsteczkami lub wodą. W związku z tym, istotne wydaje się zbadanie, w jaki sposób stopień acetylacji hemiceluloz wpływa na ich zdolność do oddziaływań z celulożą.

Dlatego też, przeprowadzono modelowe badania *in vitro* adsorpcji celulozy z acetylowanymi hemicelulozami oraz celulozy z hemicelulozami niemodyfikowanymi. Badania te wyjaśniają rolę struktury hemiceluloz, z uwzględnieniem ich stopnia podstawienia grupami acetylowymi, w procesach ich oddziaływań z celulożą.

5.2.2. Materiały i metody

Celuloza mikrofibrylarna została wyizolowana z miąższu jabłek za pomocą metody opisanej przez Szymańska-Chargot i in. (2017) i w rozdziale 3.6.1. Badano właściwości celulozy, tj. krystaliczność za pomocą NMR i XRD oraz całkowitą zawartość grup kwasowych za pomocą standardowej metody SCAN-CM 65:02 (SCAN-CM, 2006), opisanej w rozdziale 3.6.1.1., która wynosiła 82 $\mu\text{mol/g}$.

Hemicelulozy komercyjnie dostępne: glukomannan (Glm) (Megazyme), ksyloglukan (Xlg) (Megazyme) i ksylan (Xn) (Sigma Aldrich).

5.2.2.1. Acetylowane hemicelulozy

Glukomannan, ksyloglukan i ksylan acetylowano zgodnie z opracowaną metodą acetylacji hemiceluloz z bezwodnikiem octowym i octanem sodu, przedstawioną w rozdziale 5.1. Otrzymano acetylowane hemicelulozy o wysokim i średnim stopniu podstawienia (Glm 1,22, Xlg 1,02, Xn 0,52), które były nierozpuszczalne w wodzie. Dlatego też w eksperymencie adsorpcyjnym wykorzystano rozpuszczalny w wodzie acetylowany Xn (po jednym etapie acetylacji) o DsAc 0,12, a Glm i Xlg częściowo deacetylowano w środowisku zasadowym, uzyskując DsAc 0,23 dla Glm i 0,26 dla Xlg. Hemicelulozy użyte w eksperymencie adsorpcji oznaczono: Xn_Ac (DsAc 0,12), Glm_Ac (DsAc 0,23) i Xlg_Ac (DsAc 0,26).

5.2.2.2. Eksperyment adsorpcji

Badania adsorpcji hemiceluloz na celulozie mikrofibrylarniej przeprowadzono metodą statyczną pośrednią, zgodnie z metodyką opisaną w P.4. Stężenie adsorbentu obliczano na podstawie różnicy stężenia wyjściowego hemicelulozy i stężenia adsorbentu (hemiceluloza niezaadsorbowana w układzie adsorpcyjnym). Eksperyment prowadzono w temperaturze pokojowej (23 ± 1 °C), pH buforu fosforanowego (PBS, pH 7,4, C = 0,1 M, I = 0,1). Do ok. 4,83 g pulpy celulozowej (0,5 g suchej masy celulozy) dodano 50 g roztworu, składającego się z 5 g PBS, 25 g roztworu wyjściowego hemicelulozy oraz wody destylowanej. Zawiesiny wytrząsano z wykorzystaniem łaźni wodnej z mieszaniem ($200 \text{ obr.} \cdot \text{min}^{-1}$). Po zadanym czasie pobierano próbkę zawiesiny i filtrowano przez filtr strzykawkowy (NYL 0,45 μm , Millipore, Merck). Następnie w roztworze danej próbki wyznaczano stężenie hemicelulozy, za pomocą metody spektrofotometrycznego oznaczania cukrów przy 315 nm z użyciem kwasu siarkowego (z ang. sulphuric acid-UV method) (Myśliwiec et al., 2016).

Kinetykę adsorpcji prowadzono w czasie 7,5 h, pobierając 15 próbek roztworu z układu adsorpcyjnego w określonych interwałach czasowych. Stężenia wyjściowe hemiceluloz wybrano na podstawie wcześniejszego eksperymentu adsorpcji w publikacji P.4. Dla Xlg i Xlg_Ac wynosiło 800 mgL^{-1} , dla Glm i Glm_Ac - 1600 mgL^{-1} , a dla Xn i Xn_Ac - 200 mgL^{-1} .

Równowagę adsorpcji prowadzono przez 5 h, dla roztworów wyjściowych hemiceluloz Xlg i Xlg_Ac w zakresie stężeń $100\text{-}1500 \text{ mgL}^{-1}$, Glm i Glm_Ac $200\text{-}3500 \text{ mgL}^{-1}$, Xn i Xn_Ac $50\text{-}500 \text{ mgL}^{-1}$. Każdy punkt izotermy jest średnią z trzech powtórzeń. Ilość zaadsorbowanej hemicelulozy (a) obliczano zgodnie ze wzorem (6):

$$(6) a = \frac{V \times (C_0 - C_k)}{m}$$

gdzie C_0 oznacza stężenie hemicelulozy w roztworze wyjściowym, a C_k - stężenie równowagowe w supernatancie po procesie adsorpcji, m - masa celulozy, V - objętość roztworu hemicelulozy.

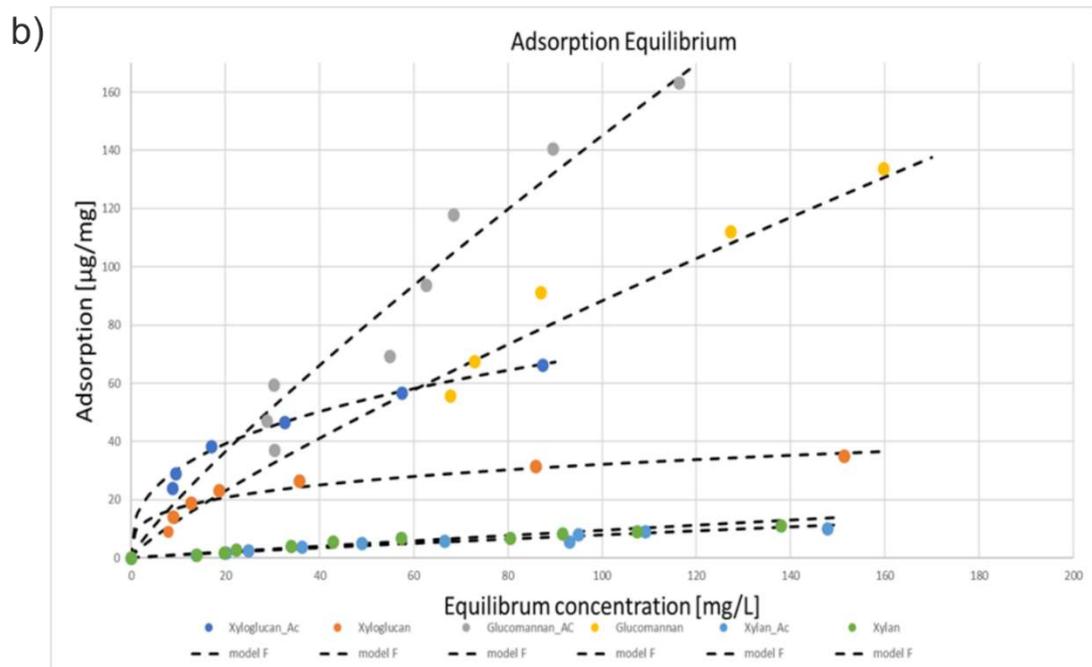
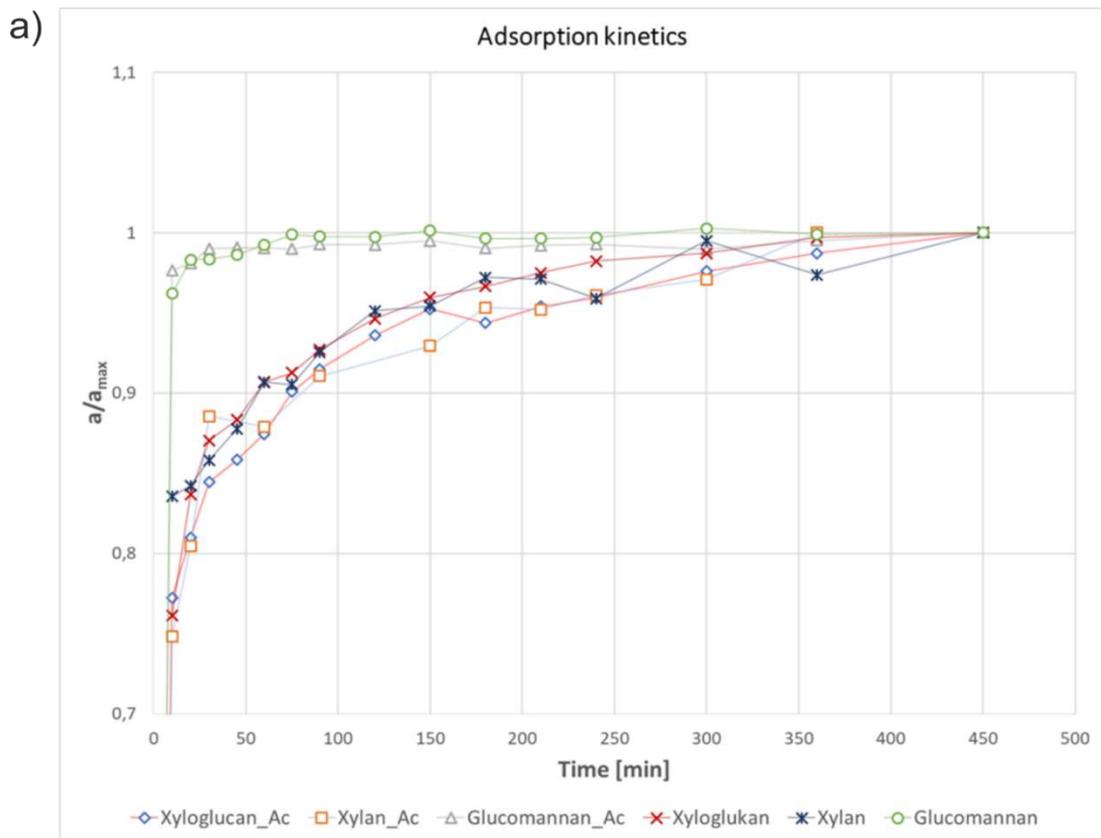
5.2.2.3. Spektroskopia ss-NMR

Dla celulozy mikrofibrylarnej i układów poadsorpcyjnych celuloza-hemiceluloza, celuloza-hemiceluloza_Ac zostały wykonane widma NMR. Próbki zliofilizowano, a kolejno przed analizą uwodniono poprzez dodanie $23,2 \pm 0,1\%$ masy ultraczystej wody. Dla każdej próbki uzyskano widmo CP/MAS ^{13}C NMR zgodnie z metodyką opisaną przez Johnson i Schmidt-Rohr (2014). Parametry sprzętowe i pomiarowe były takie same, jak dla oznaczeń indeksu krystaliczności celulozy, opisane w 3.6.1.2.

5.2.3. Wyniki

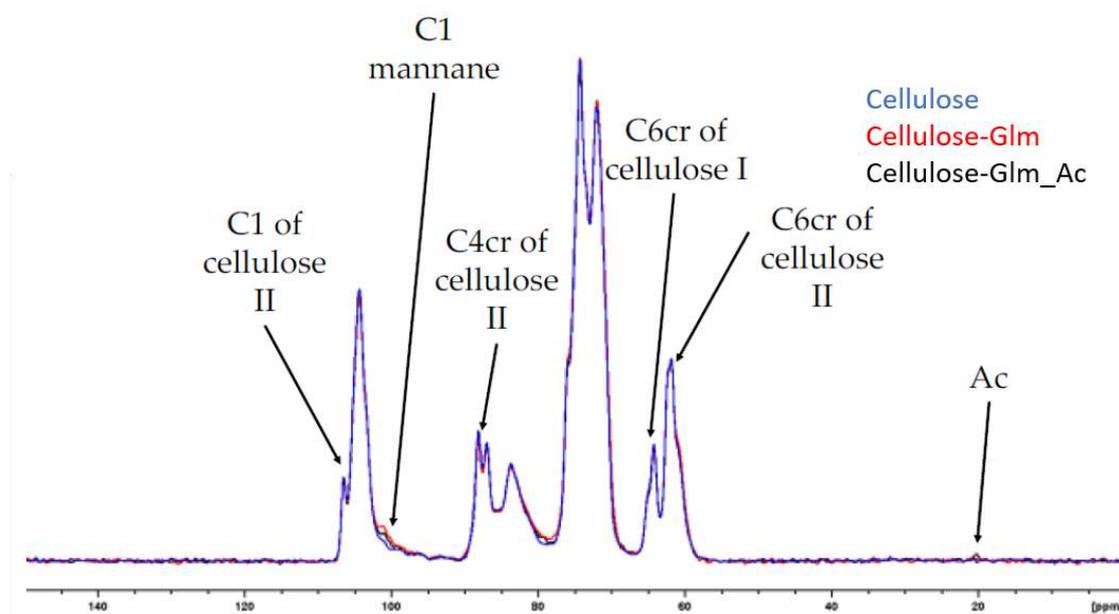
Wykazano adsorpcję Xn, Glm, Xlg i Xn_Ac, Glm_Ac, Xlg_Ac na celulozie mikrofibrylarnej. Natomiast nie wykazano znaczącego wpływu obecności grup acetylowych hemiceluloz na kinetykę procesu adsorpcji na celulozie (Rysunek 9a). Najszybciej, już po ok. 60 min, plateau adsorpcji zostało osiągnięte przez glukomannany, natomiast wolniej, dopiero po ok 200 min dla ksyloglukanów i ksylanów. W badaniu równowagi adsorpcji wykazano najwyższą adsorpcję na celulozie dla glukomannanów, niższą dla ksyloglukanów, a najniższą dla ksylanów (Rysunek 9b). Co istotne, wyniki dotyczące równowagi adsorpcji wskazują również na wpływ acetylacji glukomannanu i ksyloglukanu na oddziaływania z celulozą mikrofibrylarną. Mianowicie adsorpcja acetylowanego glukomannanu i ksyloglukanu była wyższa niż hemiceluloz

niemodyfikowanych: Gln_Ac $a=163 \mu\text{g}/\text{mg}$, Gln $a=153 \mu\text{g}/\text{mg}$, Xlg_Ac $a=66 \mu\text{g}/\text{mg}$, Xlg $a=42 \mu\text{g}/\text{mg}$; natomiast dla ksylanów nie zaobserwowano różnic w ilości zaadsorbowanej hemicelulozy: Xn_Ac $a=10 \mu\text{g}/\text{mg}$, Xn $a=11 \mu\text{g}/\text{mg}$. Najlepsze dopasowanie do wyników eksperymentu uzyskano dla izotermy Freundlicha.



Rysunek 9. Wykres (a) przedstawia kinetykę adsorpcji, a wykres (b) równowagę adsorpcji.

Dla celulozy i kompleksów poadsorpcyjnych celuloza-Glm, celuloza-Glm_Ac uzyskano widma CP/MAS ^{13}C NMR. Z uwagi na czułość i koszt techniki, analizę NMR ograniczono do glukomannanu o największej adsorpcji.



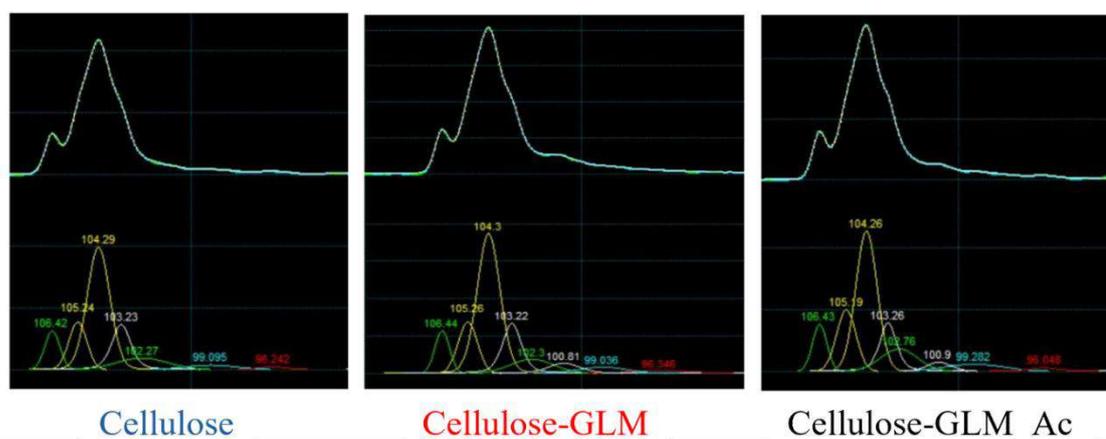
Rysunek 10. Widmo CP/MAS ^{13}C NMR dla celulozy (na niebiesko), celulozy-Glm (na czerwono) i celulozy_Glm_Ac (na czarno), cr = krystaliczny.

Jak pokazano na Rysunku 10, widma CP/MAS ^{13}C NMR dla celulozy mikrofibrylarnej i układów poadsorpcyjnych celuloza-Glm, celuloza-Glm_Ac, przedstawiają charakterystyczne widmo mieszaniny celulozy typu I i II. Zaobserwowano przesunięcie chemiczne celulozy II w obszarze C1, C4cr i C6cr. Obszar C6cr obserwowany przy ~ 65 ppm jest typowy dla celulozy typu I. Dla układów poadsorpcyjnych celuloza-Glm, celuloza-Glm_Ac wykryto pasmo ~ 100 ppm, związane z mannanem. Dodatkowo, w próbce celuloza-Glm_Ac również wykryto pasmo związane z acetylacją ~ 20 ppm.

Tabela 2. Wyniki dekonwolucji obszaru widma związanego z C6 dla próbki celulozy, przedstawiające udział poszczególnych obszarów w próbce celulozy, cr – krystaliczne, am – amorficzne.

	C6cr celuloza I	C6cr celuloza II	C6am
celuloza	26%	39%	35%
celuloza-Glm	26%	39%	35%
celuloza-Glm_Ac	27%	35%	38%

Obszar widma NMR, umożliwiający rozróżnienie między współistniejącymi typami celulozy, to obszar C6. Pozwala on oszacować względne proporcje celulozy krystalicznej typu I i II oraz części amorficznych, związanych z sygnałem C6. Wykazano, że celuloza mikrofibrylarna składa się z części krystalicznych: celuloza typu I i II oraz amorficznych. Nie wykazano różnic pomiędzy celulozą a układem celuloza-Glm. Natomiast dla Glm_Ac wzrósł udział części amorficznych C6am, a zmalał części krystalicznych celulozy typu II.



Rysunek 11. Wyniki dekonwolucji obszaru widma NMR związanego z C1 i otrzymanego dla różnych próbek.

Na Rysunku 11 pokazano, że dekonwolucja obszaru spektralnego związanego z C1 ujawniła przesunięcie chemiczne przy $100,85 \pm 0,05$ ppm, obecne w próbkach zawierających glukomannan, które przypisuje się mannanom, zgodnie z Ekholm i inni (2012).

5.3. Dyskusja i wnioski

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że acetylacja hemiceluloz nie wpływa na kinetykę adsorpcji na celulozie, a więc na sam mechanizm „gromadzenia się” makromolekuł na powierzchni celulozy. Zaobserwowano jedynie różnice pomiędzy różnymi hemicelulozami, mianowicie równowaga adsorpcji została znacznie szybciej osiągnięta dla glukomannanów (Glm_Ac i Glm) niż dla ksyloglukanów (Xlg i Xlg_Ac) i ksylanów (Xn i Xn_Ac). Zapewne, glukomannan wykazuje strukturę o dużym powinowactwie do celulozy i nie wymaga zmian konformacyjnych. Dla ksyloglukanu i ksylanu zachodzą bardziej skomplikowane procesy, które prawdopodobnie wymagają odpowiedniego ustawienia makrocząsteczek względem celulozy. Badania równowagi adsorpcji wykazały, że niski stopień podstawienia acetylowego glukomannanu (DsAc 0,23) i ksyloglukanu (DsAc 0,26) wpływa na większą adsorpcję, co może wynikać z tego, że częściowa obecność grup acetylowych w łańcuchach hemiceluloz ogranicza ich samoasocjację, która jest procesem konkurencyjnym do oddziaływań z mikrofibrylami celulozy. Ponadto, najwyższą adsorpcję odnotowano dla glukomannanów, co potwierdziło ich wysokie powinowactwo do celulozy. Widma spektroskopii CP/MAS ^{13}C NMR potwierdziły obecność mannanów w kompleksach poadsorpcyjnych celuloza-Glm oraz mannanów i grup acetylowych w układzie celuloza-Glm_Ac. Badania CP/MAS ^{13}C NMR wykazały wzrost udziału części amorficznych dla układu celulozy z acetylowanym glukomannanem.

Z uwagi na to, że mikrofibryle celulozowe zawierają części hydrofilowe i hydrofobowe, mechanizm nagromadzania hemiceluloz na tych obszarach może być różny. Można zakładać, że na częściach hydrofilowych mikrofibryli celulozowych będą istotne oddziaływania z częściami hydrofilowymi hemiceluloz, a więc z grupami hydroksylowymi, które będą tworzyły wiązania wodorowe. Natomiast na częściach hydrofobowych będą istotne oddziaływania hydrofobowe z domenami hydrofobowymi hemiceluloz, tj. grupy acetylowe. Dlatego, wzrost adsorpcji dla Glm_Ac i Xlg_Ac mógł być spowodowany ich większym powinowactwem do części hydrofobowych celulozy. Badania metodami obliczeniowymi dynamiki molekularnej prowadzone przez Kundu i in. (2025), również wykazały, że niski stopień podstawienia grupami acetylowymi wpływał na większą adsorpcję danej hemicelulozy, a wysoki stopień podstawienia wręcz ją ograniczał. Berglund i in. (2020) w badaniach z użyciem mikrowagi kwarcowej z rozpraszaniem energii również wykazali, że obecność grup acetylowych w

glukomannanie ma wpływ na jego adsorpcję na celulozie; acetylowany glukomannan o niskim stopniu podstawienia (DsAc 0,2 – 0,3) wykazał większą adsorpcję niż glukomannan niemodyfikowany, natomiast przy większej zawartości grup acetylowych o stopniu podstawienia na poziomie 0,6 – 1 zaobserwowali oni spadek adsorpcji.

Podsumowując, modelowe badania adsorpcji *in vitro* wykazały wpływ acetylacji hemiceluloz na oddziaływanie z celulozą: wzrost adsorpcji acetylowanego glukomannanu i ksyloglukanu o niskim stopniu podstawienia. Natomiast, ze względu na brak rozpuszczalności wysokoacetylowanych hemiceluloz w wodzie, nie badano wpływu wysokiego stopnia podstawienia grupami acetylowymi hemiceluloz na ich zdolność do oddziaływań z celulożą.

6. Podsumowanie i wnioski

W pracy doktorskiej przedstawiono wyniki badań dotyczących acetylacji polisacharydów niecelulozowych roślinnej ściany komórkowej. Przede wszystkim wykazano, że acetylacja odgrywa istotną rolę w strukturze hemiceluloz i zmian zachodzących podczas przebudowy roślinnej ściany komórkowej. Przypuszcza się, że acetylowany glukomannan może być markerem zmian zachodzących w roślinie. Stopień acetylacji hemiceluloz wzrastał w terminach dojrzałości przedzbiorczej i pozbiorcze go przechowywania oraz wykazał negatywną korelację z jędrnością jabłek. Co więcej, szczegółowa analiza widm FT-IR i Ramana w połączeniu z analizą PCA również wykazała istotne różnice w strukturze hemiceluloz, wynikające z obecności grup acetylowych i zawartości mannozy. Natomiast w przypadku pektyn nie zaobserwowano specyficznych zmian stopnia acetylacji w badanych terminach i jego wpływu na utratę jędrności. W pektynach rozpuszczalnych w wodzie (WSP) o wysokim stopniu estryfikacji dominowały grupy metylowe i to one determinowały właściwości pektyn, wykazując silną, negatywną korelację z jędrnością owoców jabłoni.

Zostały przeprowadzone modelowe badania adsorpcyjne, które dostarczają informacji na temat mechanizmu i rodzaju możliwych oddziaływań pomiędzy celulozą a hemicelulozami. Badania te pokazały, że jedynie hemicelulozy wykazują oddziaływania z celulozą, a pektyny pozostają obojętne w stosunku do celulozy. Glukomannan szybko osiągnął równowagę adsorpcji, co świadczy o jego korzystnej konformacji łańcucha, która nie wymaga dopasowania do celulozy. Ponadto, glukomannan wykazał największą adsorpcję na celulozie, a tym samym wysokie powinowactwo do celulozy. Acetylacja hemiceluloz nie wpłynęła na kinetykę adsorpcji, ale spowodowała wzrost adsorpcji acetylowanego glukomannanu i ksyloglukanu na celulozie, wskazując wpływ acetylacji hemiceluloz na oddziaływania z celulożą. Jednakże, należy podkreślić, że modelowe badania adsorpcyjne nie odwzorowują w pełni oddziaływań zachodzących w tak skomplikowanym układzie, jakim jest roślinna ściana komórkowa. Nie uwzględniają obecności innych polisacharydów, pomiędzy którymi mogą występować oddziaływania konkurencyjne do oddziaływań z celulożą. Natomiast, wciąż badania adsorpcyjne dostarczają cennych informacji i umożliwiają wgląd w mechanizm interakcji pomiędzy poszczególnymi polisacharydami ściany komórkowej. Mają one również istotne zastosowanie aplikacyjne w projektowaniu nowych biomateriałów i bioadsorbentów, a także materiałów wysokiej jakości, zgodnych z zasadami zielonej chemii. Ponadto

opracowana i zaprezentowana w niniejszej pracy metoda acetylacji, to prosta i wydajna technika, która pozwala modyfikować właściwości fizykochemiczne hemiceluloz i z powodzeniem może być konkurencyjna do tych, które już teraz znajdują zastosowanie w przemyśle.

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

- Stopień acetylacji hemiceluloz frakcji ekstrahowanej chlorkiem litu w dimetylosulfotlenku (LiCl-DMSO) z materiału ściany komórkowej jabłek wzrósł w terminach przedzbiorczego dojrzewania na drzewie, zbioru i pozbiorczego przechowywania jabłek. Natomiast, stopień acetylacji pektyn frakcji izolowanych wodą i imidazolem (WSP, ISP) nie wykazał specyficznych zmian w powyższych terminach.
- Wykazano korelację ujemną stopnia acetylacji i zawartości acetylowanych hemiceluloz ze zmianami jędrności jabłek.
- Wykazano dystrybucję polisacharydów w ścianie komórkowej jabłek, z rozróżnieniem na acetylowane i deacetylowane hemicelulozy oraz pektyny wysoko- i niskoestryfikowane. Wykazano bardziej równomierny rozkład w ścianie komórkowej hemiceluloz acetylowanych niż deacetylowanych. Ściana komórkowa jabłek po trzech miesiącach przechowywania w chłodni (T7) zawierała najwięcej acetylowanych hemiceluloz. Pektyny niskoestryfikowane gromadziły się w narożnikach ścian komórkowych trzech sąsiadujących komórek, a wysokoestryfikowane były równomiernie rozmieszczone w ścianie komórkowej.
- Badania adsorpcyjne pokazały, że oddziaływania z celulozą mikrofibrylarną wyizolowaną z jabłek miały miejsce jedynie w przypadku hemiceluloz (glukomannan, ksyloglukana, β -D-glukan i ksylan), natomiast nie wykazano adsorpcji pektyn lub jej wartość była poniżej granicy detekcji.
- Wykazano przy użyciu technik adsorpcyjnych, że acetylacja hemiceluloz miała wpływ na oddziaływania z celulozą. Najwyższą adsorpcję odnotowano dla glukomannanu i ksyloglukanu o niskim stopniu podstawienia grupami acetylowymi (na poziomie 0,2 - 0,3).

Podsumowując, wyniki badań uzyskane w ramach pracy doktorskiej odrzucają postawioną na początku hipotezę, że acetylacja polisacharydów niecelulozowych

utrudnia ich oddziaływania z mikrofibrylami celulozy, a tym samym zmniejsza integralność ściany komórkowej i tkanki roślinnej. Stopień acetylacji hemiceluloz wykazał negatywną korelację ze zmianami jędrności jabłek, natomiast nie można stwierdzić jednoznacznie, że grupy acetylowe w strukturze hemiceluloz bezpośrednio wpływają na mięknięcie owoców. Utrata jędrności owoców jest przede wszystkim spowodowana relokacją wody i w efekcie utratą turgoru przez komórkę, a także modyfikacjami w strukturze pektyn, tj. zmianą stopnia metylacji. Natomiast wzrost stopnia acetylacji hemiceluloz może odgrywać rolę, która jest powiązana ze zmianami zachodzącymi w ścianie komórkowej podczas utraty jędrności owoców, ale nie wpływa bezpośrednio na to zjawisko. Prawdopodobnie wzrost ilości grup acetylowych w strukturze hemiceluloz może stanowić pewnego rodzaju mechanizm obronny rośliny, mający na celu kompensację zmian zachodzących głównie z udziałem pektyn.

Ponadto, w badaniach adsorpcyjnych, które stanowiły modelowe badania interakcji pomiędzy hemicelulozami a celulozą mikrofibrylarną, wykazano wyższą adsorpcję glukomannanu i ksyloglukanu o niskim stopniu podstawienia acetylowego na celulozie niż dla hemiceluloz bez tej modyfikacji. Świadczy to o tym, że niski stopień podstawienia hemiceluloz nie tylko nie utrudnia interakcji z celulożą, ale co więcej wpływa na nie korzystnie, zwiększając powinowactwo tych makrocząsteczek do celulozy. Prawdopodobnie niska acetylacja hemiceluloz zmniejsza agregację ich łańcuchów polimerowych, która jest procesem konkurencyjnym do oddziaływań z celulożą. Ponadto, acetylacja hemiceluloz powoduje wzrost ich właściwości hydrofobowych, a tym samym może wpływać na większy udział oddziaływań hydrofobowych z celulożą. Natomiast, konieczne są dalsze badania struktury kompleksów poadsorpcyjnych, które dokładnie zlokalizują grupy acetylowe w częściach bezpośrednio związanych (oddziaływania hydrofobowe) i niezwiązanych w tych kompleksach (zapobieganie agregacji łańcuchów). Dodatkowo odpowiedni stopień acetylacji hemiceluloz może nadawać im również właściwości amfifilowe, które wpływają na zmianę napięcia powierzchniowego, a więc i na adsorpcję, dlatego ważne są również badania właściwości powierzchniowych tych hemiceluloz.

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej wnoszą istotny wkład w dyscyplinę rolnictwo i ogrodnictwo. Przede wszystkim dostarczają informacji na temat zmian zachodzących w strukturze roślinnej ściany komórkowej, które wpływają na

właściwości mechaniczne ściany, a w efekcie na utratę jędrności owoców podczas pozbiorniczego przechowywania.

7. Tekst publikacji P.1

Cellulose (2023) 30:9221–9239
<https://doi.org/10.1007/s10570-023-05442-y>

REVIEW PAPER



Interactions between non-cellulosic plant cell wall polysaccharides and cellulose emerging from adsorption studies

Patrycja Pękala · Monika Szymańska-Chargot · Artur Zdunek

Received: 26 January 2023 / Accepted: 7 August 2023 / Published online: 24 August 2023
© The Author(s) 2023

Abstract Recent studies on the plant cell wall assume that hemicellulosic polysaccharides interact closely with cellulose microfibrils through hydrophobic forces. In contrast, hydrogen bonds, which are still emphasized, play a significant role in stabilizing the conformation of the hemicellulose bound on the cellulose surface. However, there is still no consensus on the nature of the interactions between these polysaccharides and on potential interactions of pectins also with cellulose microfibrils. Since the natural plant cell wall is a very complex system, studies of model

systems (in vitro) provide information about the interaction between plant polysaccharides. Adsorption studies, which describe the interactions between non-cellulosic polysaccharides and cellulose, are one of these methods. They help to determine the type of these interactions and characterize the adsorption process. This review aims to summarize the knowledge of the interactions between cellulose and representatives of hemicelluloses and pectins, which was mainly provided by adsorption studies.

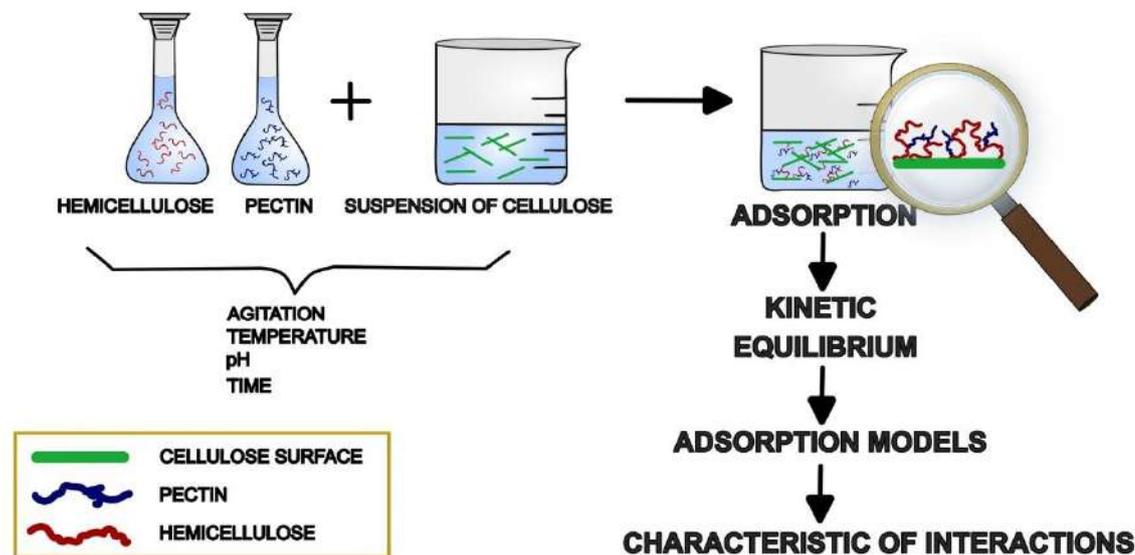
Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10570-023-05442-y>.

P. Pękala · M. Szymańska-Chargot (✉) · A. Zdunek
Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences,
Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27, Poland
e-mail: m.szymanska@ipan.lublin.pl

P. Pękala
e-mail: p.pekala@ipan.lublin.pl

A. Zdunek
e-mail: a.zdunek@ipan.lublin.pl

Graphical abstract



Keywords Adsorption · Cellulose · Pectins · Hemicelluloses · Plant cell wall

Abbreviations

AFM	Atomic force microscopy
AX	Arabinoxylan
CGMD	Coarse-grained molecular dynamics
CNW	Cellulose nanowhiskers
DE	Degree of esterification
DSC	Differential scanning calorimetry
GGM	Galactoglucomannan
HG	Homogalacturonan
MLG	Mixed-linkage glucan
NFC	Nanofibrillar cellulose
PASCNW	Phosphoric acid swollen cellulose nanowhiskers
QCM-D	Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring
RC	Regenerated cellulose
RGI	Rhamnogalacturonan I
RGII	Rhamnogalacturonan II
SEM	Scanning electron microscopy
SPR	Surface plasmon resonance
SS-NMR	Solid-state nuclear magnetic resonance
XG	Xyloglucan

Introduction

Understanding the mechanisms of interactions between different polysaccharides in cell walls is critical for the sustainable development of multiple social and economic sectors. The cell wall assembly, i.e. components and their interrelationships, are very important for multiple functions of cell walls in plants: growth, mechanical resistance, plant adaptation to given conditions, and many others (Kączkowski 2003; Park and Cosgrove 2015). Interactions between non-cellulosic polysaccharides and cellulose in the plant cell wall are also of an inestimable value to a multitude of industry sectors, e.g. biofuel production, crop production, paper industry, and packaging manufacturing (Souza et al. 2013; Li et al. 2020; Merino et al. 2019). Furthermore, agricultural wastes containing cellulose, hemicelluloses, and lignin are promising biosorbents characterized by a low cost, a neutral impact on the environment, and above all, high efficiency (Zhao 2011).

The plant cell wall is a complex structure surrounding the cytoplasmic membrane. It is the main safeguard between the external environment and the interior of the cell facilitating the transport of essential substances and serving as a defense against biotic and abiotic stresses (Rui and Dinneny 2020;

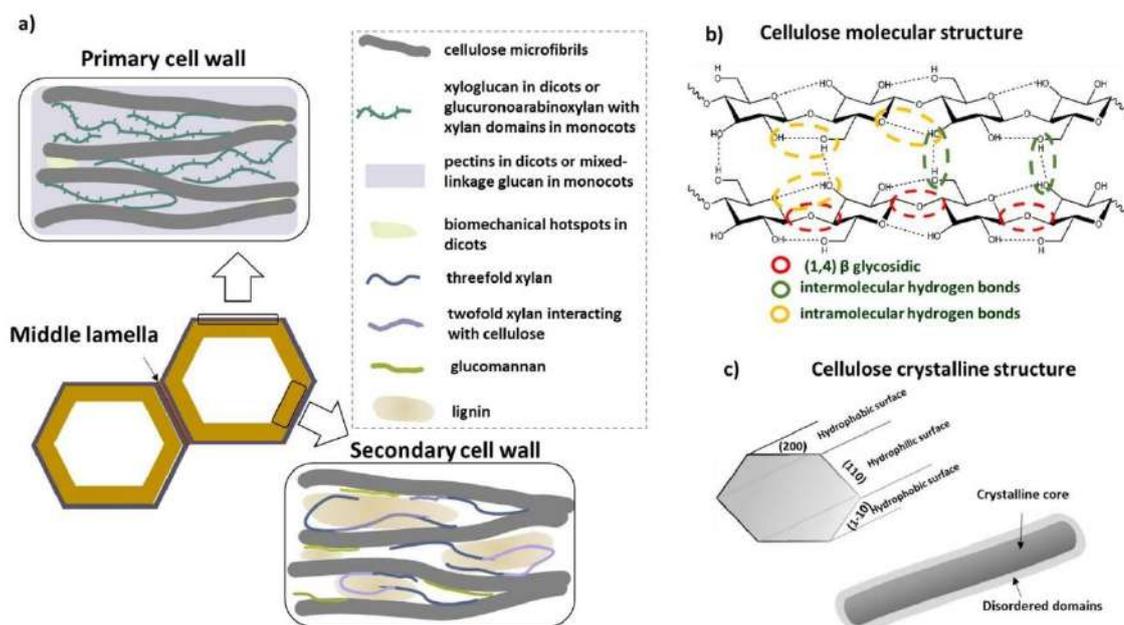


Fig. 1 Schematic representation of the primary and secondary plant cell wall with visualization of the arrangement of a cellulose microfibril, pectin, hemicellulose, and lignin (a), cellulose

molecular structure (b), cellulose crystalline structure (c) (Jarvis 2018, 2023; Moon et al. 2011, Kozlova et al. 2020)

Tenhaken 2015). Plant cell walls are mainly classified into primary and secondary cell walls differing in their structure and function. The primary cell wall is thinner and more flexible, as it is formed during cell growth and must resist stretching. It consists mainly of cellulose, hemicellulose, pectin, and a small number of proteins (Fig. 1a). The composition of plant cell wall polysaccharides differs among plant types. Homogalacturonan, rhamnogalacturonan type I, and rhamnogalacturonan type II are the typical pectic polysaccharides. The primary cell wall of dicotyledons and gymnosperms is rich in xyloglucan hemicelluloses (30 and 20%, respectively) (Albersheim et al. 2010), while arabinoxylans and β -(1,3)(1,4)-D-glucan (mixed-linkage glucan, MLG) are the main hemicelluloses in the grass family. Compared to the primary cell wall, the secondary cell wall contains less pectin but more cellulose and, additionally, lignin, which gives stiffness and increases the mechanical resistance of the cell (Fig. 1a). Lignin is a branched phenolic polymer based on hydrophobic subunits. Xylan and galactoglucomannan are the dominant secondary cell wall hemicelluloses (Terrett and Dupree 2019).

In the case of some fibers, tertiary cell walls are distinguished as well (Gorshkova et al. 2022). The tertiary cell walls are mainly composed of cellulose, and the other predominant polysaccharides are rhamnogalacturonan type I substituted by galactan and fewer mannans (Gorshkova et al. 2022).

Until recently, it was common to use a plant cell wall model where cellulose microfibrils conferred resistance and mechanical strength, while matrix polysaccharides acted as a charge carrier (Cosgrove 2005). Furthermore, the arrangement of the microfibrils influenced the anisotropy of cell growth, which efficiently took place along fibers (Barbacci et al. 2013). In contrast, a more up-to-date model emphasizing the occurrence of ‘biomechanical hotspots’ seems to be interesting. It reveals that microfibrils are locally connected with a small proportion of xyloglucan and these connections can control the extensibility of the wall (Cosgrove 2014).

The available plant cell wall models have emphasized covalent and non-covalent bonding interactions between plant cell wall polysaccharides (Albersheim et al. 2010). This knowledge was acquired indirectly

from the sequential solubilization of each group of polysaccharides in different media (enzymes, chelators, and other chemicals) and from investigations of the interaction between isolated cell wall macromolecules in laboratory conditions. The interaction between cellulose and xyloglucan, i.e. the main representative of hemicelluloses, has been investigated most comprehensively so far. It has been shown that particularly this hemicellulose has a strong affinity for cellulose. It adsorbs on its surface and can even act as a promoter for further binding, for example with pectins, in certain conditions (Zykwinska et al. 2008b). Furthermore, xyloglucan shows the ability not only to interact locally with the surface of cellulose fibrils but also to coat them (Park and Cosgrove 2015). Hence, most of the cell wall models recognize that the xyloglucan-cellulose network is the most important structural element. Currently, pectins are believed to have the ability to interact with cellulose microfibrils mainly through their sidechains: galactose, arabinose, and xylose residues. However, this ability is much weaker than that of hemicelluloses. Therefore, in the commonly used cell wall models, pectins are considered to form an independent matrix-gel network, in which the hemicellulose-cellulose network is embedded (Willats et al. 2001). In contrast, a more recent model of the plant cell wall emphasizes greater contact between cellulose and pectins which is not necessarily stabilized by binding (Cosgrove 2014; Zhang et al. 2021). Additionally, the morphological structure of cellulose microfibrils cannot be neglected in the picture of the interaction between cell wall macromolecules, as it has a significant influence on adsorption efficiency. It is known that cellulose with a more ordered and highly crystalline structure exhibits higher capacity of interaction with cell wall polysaccharides (Gu and Catchmark 2013).

In vivo research of native plant tissues can provide valuable data, but such studies have some limitations due to the complex and multiscale assembly of cell walls. Therefore, in vitro models of plant cell wall analogs based on cellulose microfibrils formed by cellulose-synthesizing bacteria (*Komagataei-bacter xylinus*) have been proposed (Cybulska et al. 2010a, b; Gu and Catchmark 2014). Despite the many advantages of using bacterial cellulose for testing, this method has some drawbacks. For example, after addition of different polysaccharides to the medium in which cellulose-producing bacteria grow, it not

possible to control the number of substances incorporated by the bacteria into the cellulose composite. Therefore, to avoid these disadvantages, the adsorption phenomenon where plant cellulose is an adsorbent, while pectin and hemicellulose are polymers that can accumulate on the adsorbent can be used in the research. Investigations of pectin and hemicellulose adsorption on cellulose microfibrils have already been conducted (Myśliwiec et al. 2016; Zykwinska et al. 2005, 2008a, b). The occurrence of interactions between polysaccharides in adsorption experiments can be analyzed using several research methods. They are based on indirect determination of the amount of the adsorbed substance using UV–VIS spectroscopy, chromatography, and other techniques, or direct analysis of the adsorbate concentration in real-time using, for example, quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) monitoring and surface plasmon resonance spectroscopy (SPR). Experimental results illustrating the quantitative adsorption are used to choose an appropriate adsorption model giving information on the nature of the interaction. Additionally, infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC), atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM), microelectrophoresis, and potentiometric titration are used to support and complete the adsorption data.

It is extremely important to conduct research on a given topic from different perspectives, as in this way, the common parts of conclusions can be highlighted. This review mainly presents experimental research, while it is worth highlighting the relevance of molecular dynamics simulations in this field. For example, the significant role of cellulose as a backbone and, innovatively, a tensile force-transfer network non-covalently linked to hemicelluloses and embedded in a hydrated pectin matrix, was confirmed by coarse-grained molecular dynamics (CGMD) (Zhang et al. 2021).

Importance of plant cell wall polysaccharides structure

The greatest influence on the interaction between cellulose and non-cellulosic cell wall polysaccharides is exerted by the structure of these compounds. Cellulose is a homopolymer consisting of D-glucose molecules linked by a β -1,4-glycosidic bond. In nature,

cellulose I exists in the crystalline form and is a mixture of two distinct crystalline phases: cellulose I α and I β whose proportion depends on the source of the cellulose. The cell walls of higher plants have greater amounts of cellulose I β than I α , whereas cellulose I α is abundant mostly in algal cell walls or in cellulose produced by some bacteria as biofilms (Saxena and Brown 2005). Moreover, cellulose I α and I β have the same pattern of hydrogen bonds: O3–H \cdots O5 and O2–H \cdots O6 intrachains as well as O3–H \cdots O6' interchains with parallel cellulose chain alignment (Moon et al. 2011) (Fig. 1b). The difference between the two cellulose I forms lies in their sheet alignment: two chains in each monoclinic unit cell of cellulose I β and one chain in the triclinic unit cell of cellulose I α (Gümüşkaya et al. 2003; Festucci-Buselli et al. 2007). The cellulose supramolecular structure is mainly the result of the conformation at C-6. The tg conformation is necessary for the crystalline (ordered) form of cellulose, while the gt and gg conformations are typical for the less ordered forms (Jarvis 2018). This, in turn, influences the structure of the cellulose microfibril; one of the most common models describes the cellulose microfibril as a highly crystalline core surrounded by less ordered regions (Nishiyama 2009;

Jarvis 2018). Another model presents microfibrils as crystalline regions disrupted by so-called amorphous cellulose (Moon et al. 2011) (Fig. 1c). It is assumed that the crystalline/amorphous ratio influences the reactivity and water binding capacity of cellulose and the mechanical properties of cellulose-based materials (Jarvis 2023). The structure of cellulose microfibrils necessitates the existence of both hydrophilic and hydrophobic surfaces (Fig. 1c) (Lin et al. 2016). The number of cellulose chains as well as the length and diameter of cellulose microfibrils depend on the plant species (Northcote 1972; Ding and Himmel 2006; Patel 2009; Niimura et al. 2010; Thomas et al. 2013; Jarvis 2023). The physical dimensions of cellulose microfibrils, such as the crystalline structure, also affect the level of adsorption (Salmén 2022). Although cellulose from different sources is chemically identical, its physical forms may differ (Albersheim et al. 2010; Park and Cosgrove 2015).

For example, similar to cellulose, the most abundant hemicellulose in dicots, i.e. xyloglucan, is composed of β -1,4 linked glucose molecules substituted by α -D-xylosyl residues. In most dicots and gymnosperms, xylose units can be decorated by galactose or galactose-fucose units. Xyloglucans undergo only

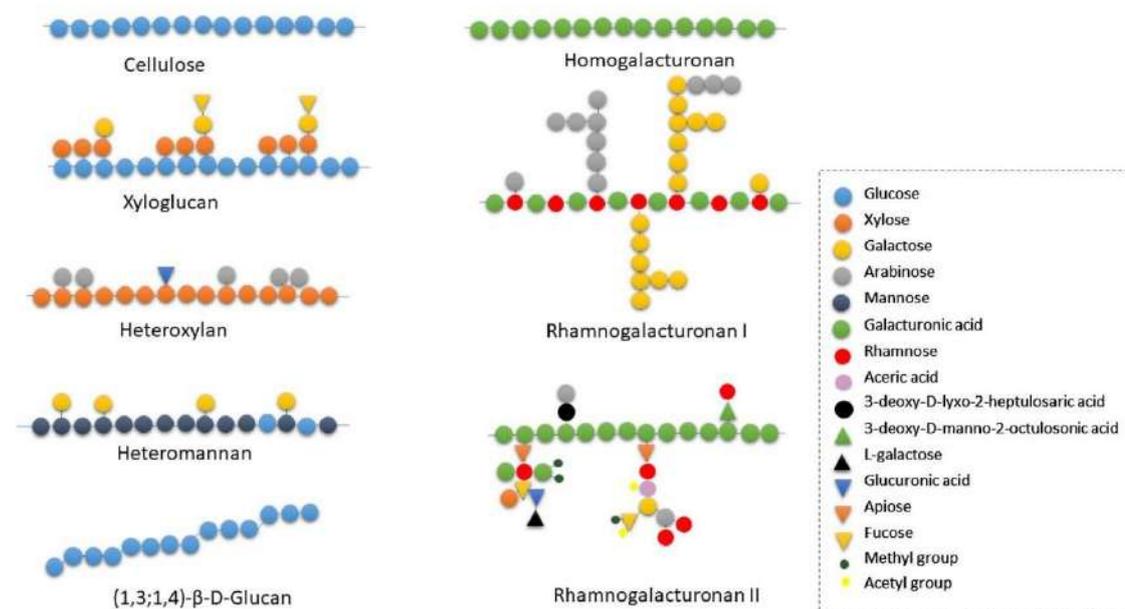


Fig. 2 Simplified schematic diagram of the structure of plant cell wall polysaccharides. A more detailed description is to be found in this review (Albersheim et al. 2010; Costa and Plazanet 2016; Heredia et al. 1995; Kaczmarek et al. 2022)

minor galactosylation and contain no fucose units only in the *Solanaceae* family. In dicots, xyloglucan also contains α -L-arabinosyl residues. Xyloglucan isolated from grasses (*Poaceae monocotyledons*) contains only small amounts of galactose units. In some plants, the additional monosaccharide residues of xyloglucan can undergo O-acetylation (Albersheim et al. 2010). Xylans are made up of xylosyl units linked by a β -1,4-glycosidic bond with numerous substitutions at C-2 and/or C-3 of the main chain by arabinose, galactose, glucuronic acid, and other monosaccharides, constituting from 10 to 90% of the xylan backbone (Fig. 2) (Albersheim et al. 2010). For example, arabinoxylan, which is the predominant hemicellulose in *Poaceae monocotyledons* primary cell walls (30–40% of the grass cell wall compared with approx. 5% of the dicotyledon cell wall), contains arabinose residues in an arabinose-to-xylose ratio of 0.6 (Derilly-Pinel et al. 2004). In turn, xylans are mainly found in secondary cell walls, where they are mostly substituted by glucuronic acid. Xylans in secondary cell walls very frequently undergo O-acetylation (Albersheim et al. 2010). In addition to their role as storage polysaccharides, mannans are present abundantly in secondary cell walls of soft and hardwood and in lower amounts (less than 2 mol%) in primary cell walls. Galactomannans are mannans containing α -1,6-galactose as the sidechain, whereas galactoglucomannans contain additional β -1,4-glucose as the sidechain (Held et al. 2015). Glucomannans and glucuronoxylan are abundant in the secondary cell wall of hardwood (Melton et al. 2009). An important feature of mannans is their O-acetylation (Melton et al. 2009). Finally, β -(1,3)(1,4)-D-glucan (mixed-linkage glucan, MLG) is an unbranched polymer composed of D-glucose molecules connected via a β -1,4-glycosidic bond forming blocks connected with each other by a β -1,3-glycosidic bond. This polysaccharide is especially important during rapid growth (Albersheim et al. 2010).

Homogalacturonans (HG), rhamnogalacturonans I (RGI), and rhamnogalacturonans II (RGII) are the main representatives of pectins. Homogalacturonan (HG), a linear homopolymer composed of D-galacturonic acid, can be methylated and/or acetylated (Costa and Plazanet 2016; Ochoa-Villarreal et al. 2012). Rhamnogalacturonan I (RGI) is a branched polymer of repeating sequences of disaccharides composed of α -1,4-galacturonic acid and α -1,2-rhamnose residues.

In addition to being methylated and/or acetylated, it also contains branched structures of arabinans and galactans (Costa and Plazanet 2016; Heredia et al. 1995; Kaczmarek et al. 2022). Rhamnogalacturonan II (RG II), the most complex polysaccharide present in the plant cell wall, is composed of α -1,4-galacturonic acid units which are substituted by branched structures composed of monosaccharides such as xylose, arabinose, fucose, apiose, rhamnose, and galacturonic and glucuronic acids, very often methylated or O-acetylated (Fig. 2) (Albersheim et al. 2010).

Adsorption method in the investigation of interactions between polysaccharides

Interactions between polysaccharides can be characterized using several research methods. One of them is the use of sequential extraction and enzymatic digestion, which gives insight into the possible binding between polysaccharides (Broxterman and Schols 2018). Another method is an in vitro approach using the adsorption technique (Dammak et al. 2015; Gu and Catchmark 2013; Myśliwiec et al. 2016; Villares et al. 2015; Zykwińska et al. 2005, 2008a, b). Interfacial surface studies provide a range of valuable information about the adsorbent and the adsorbate, the type of interactions between them, and the characteristics of the adsorption layer.

Methods for analysis of the level of the adsorption of polysaccharides on cellulose often involve indirect determination of the amount of the adsorbed substance. For this purpose, the concentration of the adsorptive before and after contact with the adsorbent is compared. The concentration can be determined using various analytical methods, e.g. chromatography and UV–VIS spectroscopy. In the general scheme of adsorption studies in xyloglucan/cellulose and pectin/cellulose systems, the xyloglucan or pectin solution is mixed with cellulose for a given time, the filtrate is centrifuged from the sediment, and the total sugar and/or galacturonic acid content in the filtrate is determined colorimetrically. The amount of the adsorbed substance is indirectly determined by subtracting the concentration remaining in the filtrate from the initial concentration of the test compound in relation to the weight of cellulose (Terashima et al. 2004).

Adsorption studies of these systems can also be carried out directly by determination of the adsorbate concentration. In this case, complementary sensor techniques, such as quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) monitoring and surface plasmon resonance spectroscopy (SPR), are used for real-time monitoring of the thickness and mass of the model cellulose film (Bensselfelt et al. 2016; Lin et al. 2018; Jaafar et al. 2019; Yao et al. 2021). The QCM-D technique is based on the piezoelectric properties of the quartz crystal, and the measurement involves determination of changes in the resonant frequency of the oscillating crystal occurring during adsorption (Eronen et al. 2011a, b; Paananen et al. 2004). Changes in the dissipation energy (ΔD) are determined to define the mechanical properties of the adsorbed layer, such as viscoelasticity (Eronen et al. 2011a, b). Briefly, SPR is an optical technique that allows determination of the concentration of analyzed compounds in the vicinity of a gold sensor surface by measuring changes in the refractive index. Laser light falls at a specific angle on the sensor, causing the excitation of surface plasmons (interaction with free gold electrons). A change in the concentration of the compound on the sensor is accompanied by a change in the refractive index, which affects the resonance conditions (Bensselfelt et al. 2016; Guo et al. 2021).

The phenomenon of adsorption depends on many factors. The adsorbent and the adsorbate play a key role in this process; therefore, it is important to characterize both. The most common adsorbents are solids classified by their surface porosity and chemical nature; hence, it is useful to determine their specific surface area and surface charge. As far as adsorbates are concerned, their structure, above all the presence and type of functional groups, and their ability to dissociate in the pH conditions of the experiment are certainly crucial (Terashima et al. 2004). Polydispersity and molecular weight are determined in the case of polymers. In addition, the type of basic electrolyte and its ionic strength, the pH of the system, and the temperature may affect the adsorption process (Grzadzka and Chibowski 2009). The adsorption of macromolecules is significantly influenced by their conformation, which can be changed as a result of interactions with the electrolyte. This affinity can be modified by changes in temperature, pH, and ionic strength of the solution. An increase in temperature may result in a higher affinity of the macromolecules

for the electrolyte and thus the unfolding of coiled polymer chains (Wiśniewska et al. 2013). For example, studies of the adsorption of a non-ionic polymer on a metal oxide in the temperature range of 15–40 °C showed that adsorption increased with increasing temperature (Wiśniewska et al. 2013). This was related to the fact that, at higher temperatures, non-ionic polymers adopted a more favorable conformation, and there was an increase in the linear dimensions of the polymer chains allowing interactions with the adsorbent (Wiśniewska et al. 2013). The adsorption of non-ionic polymers (e.g. hemicellulose) on cellulose has not yet been fully investigated. In these adsorption systems, sodium acetate or phosphate with a pH value in the range of 5.8–6.9 is usually used as a buffer solution, while the temperature is from 20 to 40 °C to keep the study conditions close to those in the plant (Dammak et al. 2015; Gu and Catchmark 2013; Myśliwiec et al. 2016; Villares et al. 2015; Zykwińska et al. 2005; 2008a, b). The adsorption of hemicelluloses on cellulose is characterized by a low heat value (small enthalpy change), which may be indicative of physical adsorption. This type of adsorption mainly occurs at lower temperatures, while desorption may occur at high temperatures. Lopez et al. studied the adsorption of xyloglucan on cellulose, taking into account the effect of temperature on this process. Using isothermal titration calorimetry (ITC), it was demonstrated that higher temperature (in the range of 25–60 °C) increased adsorption. According to the van't Hoff equation, it was shown to be an endothermic process (Lopez et al. 2010). These assumptions were also confirmed in QCM-D and SPR spectroscopy studies. The increase in temperature contributed to an increase in the accumulation of xyloglucan molecules on the cellulose surface, which displaced water molecules and thus increased the entropy of the system (Bensselfelt et al. 2016; Yao et al. 2021). In adsorption research, adsorption energy is the change in free energy (ΔG). Its value is not only influenced by the commonly quoted change in enthalpy (ΔH) but is also significantly influenced by the change in entropy (ΔS) and temperature (T) (Kishani et al. 2021; Wohler et al. 2022).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

Recent studies address this issue and report that the increase in entropy caused by the displacement of solvent/water molecules by the adsorbate from the

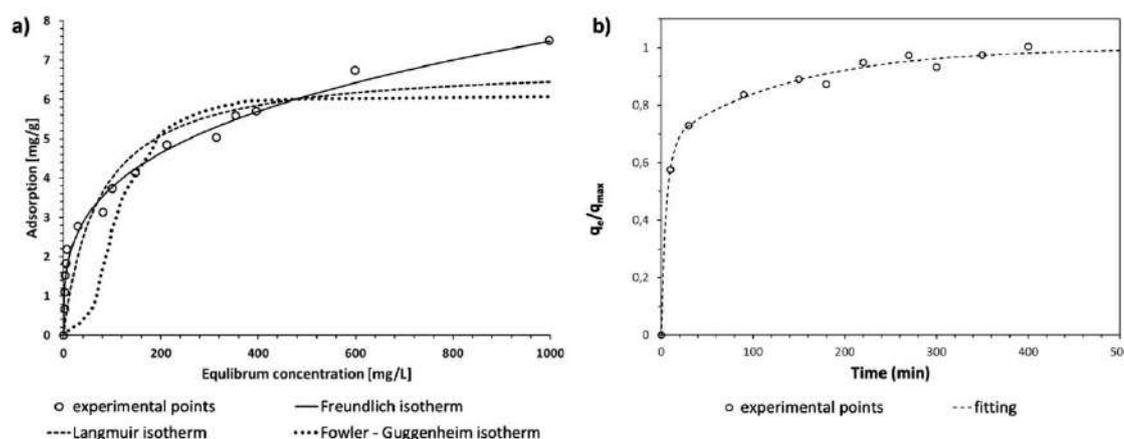


Fig. 3 Plots of theoretical Langmuir, Freundlich, and Fowler–Guggenheim isotherms (a) and the typical progress versus time kinetic plot (b)

cellulose surface is the main driving force behind the adsorption of hemicelluloses on cellulose (Benselfelt et al. 2016; Kishani et al. 2021).

The kinetics and equilibrium of the process are investigated in adsorption experiments (Fig. 3). The kinetics of the process gives information about the dynamics and the time required to achieve equilibrium in the system. The kinetic process is usually modeled by empirical or semi-empirical equations of the first order (FO) and second order (SO) (Myśliwiec et al. 2016). The FO kinetic model assumes that the adsorption rate is directly proportional to the difference in the concentration versus time. In turn, the SO model assumes that the adsorption rate is proportional to the available active sites on the adsorbent and is dependent on the amount of the adsorbate on the surface of the adsorbent. The adsorption kinetics is the measure of the adsorption speed and depends on the number of particles colliding with the adsorbate surface per second. It provides information about the mechanism of the adsorbate surface coating, which is important for biomolecules that have the possibility of rearrangement. In the case of slow adsorption processes, the biomolecules have time to rearrange and assume a flat conformation on the adsorbate surface, while loops and tails are rather formed in the case of fast processes.

After determination of the time after which the equilibrium in the adsorption system is achieved,

quantitative results are used to match an appropriate model of adsorption (Fig. 3a). Literature data show that the Langmuir and Freundlich adsorption isotherms are the best isotherms to describe interactions between non-cellulosic polysaccharides and cellulose. The Langmuir isotherm is the basic adsorption equation regarded as the starting equation for more elaborate studies. It is mainly used to describe chemisorption with the following assumptions: the presence of a certain number of active sites, the formation of an adsorption monolayer, the adsorbate molecules do not move on the adsorbent surface, and the lateral interactions between the adsorbate molecules are neglected. Previous studies of the adsorption of hemicelluloses/pectins on cellulose were only based on the Langmuir isotherm, but with consideration of heterogeneity effects, lateral interactions, and multilayer effects (Gu and Catchmark 2013; Dammak et al. 2015; Hayashi et al. 1994b; Kabel et al. 2007; Villares et al. 2015; Zykwinska et al. 2008b). The general Langmuir isotherm is given by the formula:

$$q_e = \frac{q_m b C_e}{1 + b C_e} \quad (2)$$

where b is the adsorption constant of the process, q_m is the maximum adsorption (adsorption capacity), q_e is the amount of adsorbed non-cellulosic

polysaccharides per mg of cellulose, and C_e stands for the equilibrium concentration.

In contrast to the Langmuir isotherm, the Freundlich isotherm, which describes the multi-site adsorption isotherm for rough and energetically heterogeneous surfaces (Kabel et al. 2007; Zykwincka et al. 2008b), is given by the formula:

$$q_e = bC_e^{\frac{1}{n}} \quad (3)$$

where b and n are the adsorption constants of the process, q_e is the amount of adsorbed non-cellulosic polysaccharides per mg of cellulose, and C_e stands for the equilibrium concentration. Myśliwiec et al. (2016) showed that the adsorption of xyloglucan on Avicel cellulose is described by the Fowler–Guggenheim isotherm:

$$q_e = \frac{q_m b C_e \exp\left(\frac{\alpha q_e}{q_m}\right)}{1 + b C_e \exp\left(\frac{\alpha q_e}{q_m}\right)} \quad (4)$$

where b is the adsorption constant of the process, q_m is the maximum adsorption (adsorption capacity), q_e is the amount of adsorbed non-cellulosic polysaccharides per mg of cellulose, C_e stands for the equilibrium concentration, and α is a constant that describes interactions between molecules in the adsorbed layer. This isotherm is a generalized form of the Langmuir equation isotherm and gives evidence that lateral interactions play an important role in adsorption.

The typical theoretical models of adsorption are presented in Fig. 3a.

Adsorption of hemicelluloses on cellulose

As mentioned above, with their diverse structure, hemicelluloses are an interesting group of plant cell wall polysaccharides. Hemicelluloses have been shown to interact with cellulose within the cell wall to form a network. It is believed that xyloglucan in dicots and arabinoxylan in grasses have the greatest affinity for interactions with cellulose (Albersheim et al. 2010). Interestingly, native hemicelluloses and celluloses from the same plant have a higher affinity for each other and can influence cellulose aggregation during morphogenesis (Chambat et al. 2005). However, most studies on the interaction of hemicellulose

with cellulose were based on Avicel or bacterial cellulose (Kabel et al. 2007; Kiemle et al. 2014; Lima et al. 2004) (SM Table 1).

The interaction of the main representative of hemicelluloses, i.e. xyloglucan, with cellulose microfibrils affects the mechanical properties of the primary cell wall, creating more stretchy structures essential for tissue growth (Whitney et al. 1999). It is known that xyloglucan interacts via hydrogen bonds with the surface of cellulose microfibrils and can crosslink two adjacent cellulose microfibrils to form a xyloglucan-cellulose network. Interactions also take place between the hemicellulose backbone and cellulose, while the side branches may even hinder the molecule from reaching its favorable conformation. Pauly et al. (1999) showed that up to 64% of all xyloglucans were associated with cellulose. In contrast, solid-state nuclear magnetic resonance (ss-NMR) spectroscopy studies showed only a few xyloglucan-cellulose linkages (Dick-Pérez et al. 2011). Park and Cosgrove (2015) also demonstrated a limited amount of xyloglucan in contact with cellulose, introducing the concept of biomechanical hotspots and revising the commonly used tethered network model of the plant cell wall. Small amounts of xyloglucan were shown to be present at the point of contact between two cellulose microfibrils. Importantly, coarse-grained molecular dynamics (CGMD) simulations showed that tensile forces were not transmitted through the non-cellulosic polysaccharides of the matrix, but precisely through the connection points between the cellulose microfibrils (Zhang et al. 2021).

The literature reports that there can be ionic interactions, hydrophobic forces, van der Waals dispersion forces, and hydrogen bonds between hemicelluloses and cellulose (Heinonen et al. 2022; Wohlert et al. 2022; Zykwincka et al. 2008a,b). In the case of adsorption on cellulose, the presence of available functional groups, e.g. hydroxyl groups, on its hydrophilic surface was highlighted by many researchers. It is assumed that intrachain O3–H···O5 bonds are stable and do not take part in the creation of hydrogen bonds; hence, only some hydroxyl groups can serve as donors. However, recent studies have shown that these assumptions are farfetched and hydrogen bonds are not the main factor responsible for the interactions between xyloglucan and cellulose (Wohlert et al. 2022). The significance of solvent (water) molecules has been underlined. Molecular dynamics studies

have shown that, at room temperature, an increase in entropy is the main driver of the adsorption process due to the release of water molecules from the interfacial surface (Kishani et al. 2021). From a thermodynamic point of view (Eq. 1), hydrogen bonds between hemicellulose and cellulose do not play a major role in adsorption. The formation of weak hydrogen bonds results in a small enthalpy change (Kishani et al. 2021), and this cannot be considered the main driving force of adsorption. On the other hand, it is worth emphasizing that hydrogen bonds influence the stabilization of the conformation of the adsorbed polymer chain (Heinonen et al. 2022; Simmons et al. 2016). The molecular dynamic simulation has also revealed that the interaction with cellulose occurs over a short distance, and adsorption on the hydrophobic surface of the microfibril is preferable, indicating the importance of hydrophobic forces (Oehme et al. 2015; Park and Cosgrove 2015).

The Langmuir and Freundlich models have been applied in investigations of xyloglucan adsorption onto cellulose microfibrils. Langmuir suggests the creation of a single layer of hemicellulose on cellulose microfibrils, and the Freundlich model assumes several different types of binding. The best description of the interaction in this case is provided by the Freundlich model suggesting the formation of multilayers. In contrast, the Fowler–Guggenheim isotherm used in previous investigations of xyloglucan–cellulose adsorption confirmed the role of lateral interactions and showed that chain–chain interactions as well as xyloglucan reformation may have limited the adsorption kinetics (Myśliwiec et al. 2016). The Freundlich and Langmuir models are unable to include lateral interactions in the adsorbed layer. Bootten et al. (2004) showed that the xyloglucan backbone is only partially rigid and not only forms a crosslink between two microfibrils but can also crosslink other non-cellulosic polysaccharides. Moreover, the xyloglucan–cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan (Hayashi et al. 1994a; Hayashi and Kaida 2011; Lima et al. 2004). The galactosylation and fucosylation of xyloglucan also influence the interaction with cellulose microfibrils (Lima and Buckeridge 2001). Fucosylated xyloglucan has been reported to interact with cellulose better than xyloglucan without fucose. However, as shown by Chambat et al. (2005), L-fucose substitution of xyloglucan does not influence adsorption or may even

hinder the interaction with cellulose. On the other hand, the galactosylation pattern also influences the interaction with cellulose, i.e. unevenly distributed galactan sidechains exhibit better binding, while the even distribution results in a twisted structure of xyloglucan and the worst binding to cellulose microfibrils. Longer sidechains increase the strength of the interaction but decrease its efficiency, and each xyloglucan molecule can form not more than 4 H–bonds (Hanus and Mazeau 2006). Using the Langmuir model, Gu and Catchmark (2013) showed that the adsorption of xyloglucan onto cellulose was irreversible (Oehme et al. 2015). Most studies of adsorption of xyloglucan on cellulose were carried out with the use of tamarind seed xyloglucan. This compound serves as a reserve polysaccharide, and its structure differs from that of cell wall xyloglucan. Moreover, the botanical source of xyloglucan has an impact on its structure (Park and Cosgrove 2015). For example, apple xyloglucan was composed of unbranched linear glucan motifs, typical XXXG motifs, and fucosylated (XXFG) and galactosylated (XXLG, XLXG, and XLLG) parts (Chen et al. 2022; Zhao et al. 2014). The greatest binding affinity was exhibited by the fucosylated and galactosylated xyloglucan fractions. The influence of the different molecular weights of apple xyloglucan additionally modified by enzyme action on adsorption onto cellulose nanofibers was investigated by Chen et al. (2022). The lower molecular weight of the apple xyloglucan was associated with better adsorption on cellulose nanofibers. Moreover, again it was confirmed that XG adsorbs in an extended conformation (trains) at a low XG to cellulose ratio, while tails and loops are formed at a high XG concentration and a saturated cellulose surface.

The research conducted by Zykwińska et al. (2005) also showed that the adsorption of xyloglucan on native plant cellulose is two times higher than on microcrystalline Avicel cellulose, which may prove that the crystallinity of cellulose can influence the interaction between cellulose and hemicelluloses. The influence of the morphological structure of cellulose on the efficiency of xyloglucan adsorption was investigated (Benselfelt et al. 2016; Gu and Catchmark 2013; Kiemle et al. 2014). For example, the interaction of two forms of cellulose: highly crystalline cellulose nanowhiskers (CNW) and amorphous PASCNW (phosphoric acid swollen cellulose nanowhiskers) with xyloglucan was analyzed (Gu and

Catchmark 2013). Xyloglucan adsorption on CNW was about two times higher than on PASCNW. These results proved that the degree of cellulose crystallinity significantly influences adsorption. The binding constant of xyloglucan with highly crystalline and highly amorphous cellulose was also tested and was higher in the case of crystalline nanowhiskers than amorphous PASCNW. Generally, the surface area, porosity, and degree of order i.e. crystallinity, may affect the interaction of cellulose with hemicelluloses (Gu and Catchmark 2013). Also, an interesting conclusion was made, i.e. the binding interactions of hemicelluloses depend on the biological origin of cellulose. Adsorption is also influenced by the orientation of particles accumulated at the interphase surface. The ionic strength of the buffer in the xyloglucan-cellulose CNW adsorption system does not affect the efficiency of the process. This is probably related to the neutral charge of hemicelluloses (Gu and Catchmark 2013). Recently, xyloglucan has been successfully adsorbed on nanocellulose (Villares et al. 2015). The adsorption of xyloglucan (XG), galactoglucomannan (GGM), and arabinoxylans (AX) in aqueous solutions on the nanofibrillated cellulose (NFC) film covering the quartz sensor of QCM-D was compared. All these hemicelluloses were adsorbed, but the amount of GGM adsorbed and the scattering energy ΔD values were lower than in the case of XG; this indicates a less viscoelastic structure of GGM, which formed a more rigid layer. The arabinoxylans showed the lowest affinity for cellulose and exhibited the highest ΔD values, compared to other hemicelluloses, which indicates the presence of a loose adsorption layer with more water molecules than in the other systems (Eronen et al. 2011b).

The concentration of xyloglucan in the adsorption system influences the adsorption process. As shown by Dammak et al. (2015), the adsorption process at the hemicellulose concentration below 3.5 $\mu\text{g/l}$ led to chain rearrangement on the cellulose surface, whereas saturation of the surface with formation of strings and loops was observed in systems with hemicellulose concentrations above 3.5 $\mu\text{g/L}$. In systems with lower concentrations, xyloglucan and cellulose can form multilayer sandwich-type structures.

Similar to xyloglucans, xylans can interact with cellulose, but their interactions are weaker and take place only on the surface of cellulose microfibrils (Gu and Catchmark 2013; Hayashi 1989). Xylans are

smaller macromolecules and, in contrast to xyloglucan, cannot form trains and loops and the most preferable conformation in terms of the cellulose axis is parallel (Falcoz-Vigne et al. 2017) and antiparallel (Heinonen et al. 2022). Analyses of NMR spectra have shown that xyloglucan molecules adsorbed onto cellulose have a twofold conformation, which is similar to that of cellulose. During adsorption, xyloglucan molecules change their conformation from the threefold structure and match the twofold conformation of crystalline cellulose (Falcoz-Vigne et al. 2017; Heinonen et al. 2022; Jaafar et al. 2019). Furthermore, an increase in the xylan concentration above the amount that saturates the specific surface area of cellulose induces multilayer adsorption. It has been shown that only xylan molecules in the first adsorption layer have a twofold structure (Falcoz-Vigne et al. 2017). During adsorption, xylan forms hydrogen bonds with cellulose but, as in the case of xyloglucan, this is not the driving force behind this process, which takes place on the hydrophobic surface of cellulose. Several studies confirm that, due to their conformational fit, xylans can be a crystalline extension of cellulose. As xylans can contain different substituents, Jaafar et al. (2019) have investigated the effect of xylan acetylation on the adsorption on cellulose. Using QCM-D and molecular dynamics simulations, they showed that the adsorption layer of acetylated xylan was more rigid and more densely packed than that of deacetylated xylan, which is more hydrated and has a looser structure. The acetylation process influenced the xylan conformation, i.e. acetylated xylan had a twofold structure. In turn, deacetylated xylan had a twofold conformation only in the first adsorption layer in close contact with cellulose, while the other xylan molecules had a threefold conformation (Jaafar et al. 2019).

Similar to xyloglucan, arabinoxylans with fewer sidechains have been found to interact with cellulose microfibrils (Heredia et al. 1995; Lampugnani et al. 2018; Ochoa-Villarreal et al. 2012). In contrast to xyloglucans, arabinoxylans may also contain glucosyluronic acid residues giving acidic properties, which in turn enable arabinoxylans to interact with other polysaccharides (Albersheim et al. 2010). In the case of adsorption of arabinoxylan isolated from rye, oat, and wheat onto cellulose microfibrils, the higher molecular weight and the higher substitution degree

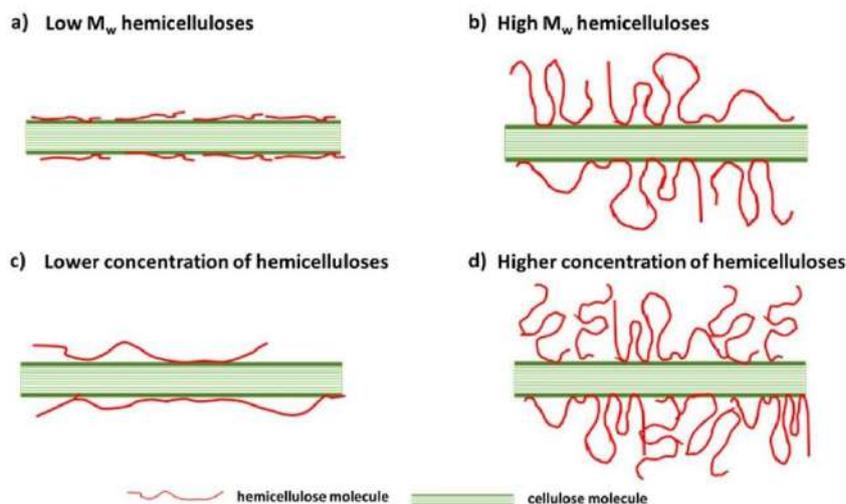
were associated with its lower affinity for cellulose (Eronen et al. 2011b).

Mixed-linkage (1,3)(1,4)- β -D-Glucan (MLG), like xyloglucan, also adsorbs on cellulose. Studies show differences in the interactions of this linear polymer with microcrystalline cellulose (Avicel) and regenerated non-microfibrillar amorphous cellulose (RC). Based on the binding isotherms, it has been found that there is irreversible adsorption of MLG on Avicel, which initially (for approx. 10 h) increases rapidly and then runs slowly, which may be related to the more difficult diffusion of adsorbate particles in microcrystalline cellulose pores. The experiment was carried out at various temperatures: 22 °C, 40 °C, 60 °C, and 80 °C, and its results proved that the adsorption efficiency increased significantly with the temperature increase. The presence of additional insoluble hemicelluloses did not affect the interaction of MLG with microcrystalline cellulose (Kiemle et al. 2014). Studies conducted with the use of quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) monitoring have shown that MLG adsorbs irreversibly on the RC surface forming a hydrogel layer with a thickness depending on the concentration of MLG in the system (Kiemle et al. 2014). Also, this technique was used in analyses of spruce galactoglucomannan (GGM) adsorption onto hardwood cellulose nanofibrils; in this system, hemicellulose adsorbed irreversibly quite well in a lower amount than in the case of xyloglucan (Eronen et al. 2011b).

Glucomannan has a disaccharide repeating unit with different ratios of mannose to glucose depending on the plant species (Melton et al. 2009). It is involved in interactions with both hydrophobic and hydrophilic surfaces of cellulose (Yu et al. 2018). Moreover, a lower degree of mannan O-acetylation was related to higher binding affinity for hemicellulose on cellulose (Melton et al. 2009). It was even concluded that, similar to xyloglucan and xylan, glucomannans can act as crosslinking agents between cellulose microfibrils. Previously, it has also been suggested that mixed-linked glucomannan is tightly bound to cellulose in low-arabinoxylan cell walls and can interact with arabinoxylan (Smith-Moritz et al. 2015).

Generally, the conclusions drawn from the aforementioned studies indicate that the adsorption of hemicelluloses depends on their molecular weight (M_w): the higher the M_w value, the lower the adsorption (Lima et al. 2004). The low- M_w hemicelluloses probably have a flat conformation on the cellulose surface, leading to the blocking of its active sites (Fig. 4a, b). Also, the concentration of hemicelluloses in the solution triggers different adsorption mechanisms—hemicelluloses in low-concentrated solutions have a flat arrangement on the cellulose surface (Fig. 4c), while the train and loop conformation of hemicelluloses on the cellulose surface is observed in high-concentrated solutions (Fig. 4d). The substitution with neutral sugars, such as xylose, fucose, or galactose, cannot be neglected either; however, a recent study has shown greater affinity of unbranched

Fig. 4 Model representing the adsorption of hemicelluloses on cellulose depending on the molecular weight (M_w) of hemicellulose (a), (b) and its concentration in the solution (c), (d) (Lima et al. 2004; Villares et al. 2015)



glycosylated and fucosylated xyloglucan for cellulose, and these xyloglucan motifs represent a minor part of apple XG (Chen et al. 2022). The Table summarizing the amounts of adsorbed hemicelluloses taking into account the adsorption conditions and cellulose sources is presented as Supplementary Material.

Adsorption of pectins on cellulose

The interaction of pectins with cellulose microfibrils in *in vitro* adsorption systems is not obvious. It probably takes place between sidechains consisting of neutral sugars, such as galactose, arabinose, and xylose (Gu and Catchmark 2013). For example, the influence of pectic arabinan and galactan sidechains on the ability of these compounds to adsorb on cellulose has been extensively studied due to their importance for xyloglucan-poor cell walls (Zykwinska et al. 2007). Also, the degree of pectin methylation does not directly affect these interactions (Patel 2009). The effect of the degree of esterification and side branching was investigated during the synthesis of cellulose in a calcium ion-free system (Lin et al. 2016). It has been shown that homogalacturonan adsorbs on cellulose but in a very small amount, significantly lower than that of pectins containing neutral sugar sidechains, mainly galactose and arabinose. On the other hand, Zykwinska et al. (2007) showed that only 8% of arabinan-rich pectins can bind to cellulose. The degree of esterification (DE) of pectin is not a key factor; however, pectins with a lower DE can bind cellulose more efficiently, but these differences are very small. This is probably related to the presence of negatively charged ($-\text{COO}^-$) groups of galacturonic acid in low-methylated pectins. The presence of divalent Ca^{2+} and Mg^{2+} cations in the system is also important, as they can form bonds with the above-mentioned group between two homogalacturonan chains, resulting in the creation of a network with different properties (Gu and Catchmark 2013; Paul et al. 2012; Zykwinska et al. 2007).

Pectins adsorb reversibly on cellulose, and interactions between this adsorbate and the adsorbent are weak and limited only to the cellulose surface (Lin et al. 2016; Zykwinska et al. 2007). Arabinan and galactan sidechains are usually too short to be entrapped in cellulose microfibrils and to tether two adjacent cellulose microfibrils. On the other hand,

experiments with strong alkali extraction showed reasonable amounts of arabinan-rich polysaccharides in the extracts, which may suggest that arabinan-rich pectins can bind to cellulose (Zykwinska et al. 2007). Further information can be provided by monosaccharide analysis of cellulose residues after strong alkali treatment. It is postulated that the presence of unextracted polysaccharides in the final cellulose residue is a result of strong interactions between these polysaccharides and cellulose. The analysis of the monosaccharide composition of the polysaccharides indicates mostly RG I rich in galactan sidechains. As concluded by Broxterman and Schols (2018), RG I consisting of galactose and arabinose sidechains is covalently linked to cellulose in the final residue of the extracted carrot cell wall. Similar studies of cellulose-retained polysaccharides involved wood and flax bast fibers (Gorshkova et al. 2015; Gurjanov et al. 2008). In the gelatinous layer of tension wood, the presence of RG I and β -(1-4)-galactan was detected, which evidenced their entrapment between cellulose microfibrils (Gorshkova et al. 2015). In the case of flax bast fibers, the cellulose-retained polysaccharide was identified as galactan (Gurjanov et al. 2008).

Research also shows the influence of the morphological structure of cellulose on the pectin adsorption efficiency, similar to that described above for xyloglucan. The Langmuir and Freundlich adsorption models were the best to describe the interaction between pectin and cellulose. However, the Freundlich model, revealing the importance of heterogeneity of the cellulose surface and multilayer formation, was chosen as better fitted (Zykwinska et al. 2008b). The adsorption of apple pectins took place on high-crystalline CNW cellulose, whereas the values obtained for high-amorphous PASCNW were below the detection limit. In turn, the degree of xyloglucan adsorption was much greater than that of pectins in the same conditions, probably because pectins interact with cellulose primarily through sidechains. Their main chain consisting of galacturonic acid showed no significant interactions (Gu and Catchmark 2013). The importance of arabinan-rich pectins in the cell wall of drought-resistant plants has been highlighted (Moore et al. 2008). Probably, during water deficit, arabinan-rich pectins prevent the formation of tight pectin junctions, e.g. egg-box or hydrogen bonding, between cellulose and xyloglucan, which enables the cell wall to maintain its flexibility. The Table summarizing

the amounts of adsorbed pectins taking into account adsorption conditions and cellulose sources is presented as Supplementary Material (SM Table 1).

No significant interactions between cellulose and pectin have been demonstrated using *in vitro* binding assays. However, solid-state NMR spectroscopy has shown that there is strong contact between these compounds, which may be related to the crowding of these macromolecules in the cell wall rather than formation of bonds or van der Waals interactions. Therefore, it is most likely that pectins become trapped between the microfibrils of cellulose already during plant cell wall biosynthesis and probably have a role in the formation of the cell wall structure in the case of hemicellulose deficit (Wang et al. 2015; Phyo et al. 2017). As shown by Ng et al. (2014), RGI in the apple cell wall contains both free and cellulose microfibril-bound arabinan and galactan sidechains. It was also assumed that branched arabinan did not bind to cellulose, while the NMR result showed two states of the linear forms of arabinan: less mobile attached to cellulose and with higher mobility attached to RGI (Ng et al. 2014; Phyo et al. 2017). Also, it was shown that the rigid parts of pectic polysaccharides (HG and RGI) were more prone to interact with cellulose (Phyo et al. 2017). Further NMR studies showed that HG was less crosslinked in the proximity to cellulose, while shorter chains of HG interacted with cellulose less efficiently. These results are of great importance for understanding the mechanism of growing cells—the limited pectin-cellulose interaction facilitates cell wall loosening and expansion (Phyo et al. 2017). Finally, the general conclusion from the NMR study, which is in contradiction to *in vitro* studies, is that the pectin backbone rather than neutral arabinan and galactan sidechains is involved in the pectin-cellulose interaction (Phyo et al. 2017).

Adsorption of hemicellulose and pectins on cellulose

The most important factors in the formation of the plant cell wall are differences in interactions between cellulose and pectins in the presence of hemicelluloses in the adsorption system. The interaction of xyloglucan not only with cellulose but also with acidic pectins puts hemicellulose in the central place of control of cell wall extensibility and cell

enlargement and mechanical properties of tissues (Chanliaud et al. 2002). On the other hand, coating cellulose by xyloglucan enforces a minimal distance between microfibrils, thereby preventing their aggregation (Thimm et al. 2002). Zykwinska et al. (2005) showed that there is always competition between non-cellulosic polysaccharides in binding to cellulose. Xyloglucan, for example, binds more strongly to cellulose than pectins or pectic domains because there is better complementarity between the surface of xyloglucan and cellulose and the structure of xyloglucan is favorable in the interaction with cellulose. Nevertheless, pectic polysaccharides can bind to cellulose when there is an insufficient amount of hemicelluloses (Bootten et al. 2004). For example, Zykwinska et al. (2008a) showed adsorption of arabinan-rich pectin at a low concentration of xyloglucan. Also, covalent bonding of xyloglucan with acidic pectins has been shown (Thompson and Fry 2000). Pectins can interact with each other too. Arabinans, galactans, and arabinogalactans have been shown to form covalent bonds with rhamnogalacturonan I (RG I) (Heredia et al. 1995). RG I and RG II can also form bonds, e.g. a glycosidic bond with HG; however, the exact position of this bond is not known (Willats et al. 2001). It has also been reported that an increase in the concentration of pectins in the adsorption system leads to their greater adsorption on cellulose even in the presence of xyloglucan (Zykwinska et al. 2008b). The competitive binding between xyloglucan and pectin was stressed (Zykwinska et al. 2007, 2008b).

Hemicelluloses probably form a layer on the surface of cellulose that has the potential to interact with pectins (Kiemle et al. 2014). The presence of soluble hemicelluloses and neutral pectins influences the interactions between (1,3)(1,4)- β -D-Glucan (MLG) and microcrystalline cellulose (Avicel), which may be either supportive or inhibitory. The order in which polymers are placed in the adsorption system is of great importance. Cellulose that is first bonded by neutral pectins, i.e. arabinan, and galactan, significantly reduces MLG adsorption. On the other hand, the initial binding of MLG with Avicel has a positive effect on pectin adsorption and increases the binding of arabinan, galactan, and cellulose. Xyloglucan adsorbs very well on cellulose and thus inhibits the interaction between MLG and Avicel to the greatest extent. The affinity of xyloglucan for cellulose is so high that the earlier binding of the adsorbent to MLG

only slightly reduces its adsorption. Soluble arabinoxylan also inhibits the interaction between MLG and Avicel more effectively than arabinan and galactan, but to a lesser extent than xyloglucan.

Conclusions and future prospects

Experimental studies of the adsorption of non-cellulosic polysaccharides on microfibrillar cellulose can provide many valuable insights into the interactions between these macromolecular compounds. Adsorption studies test the nature of the interactions between hemicelluloses/pectins and microfibrillar cellulose. Adsorption kinetics gives information about the process of accumulation of the adsorbate on the adsorbent. The adsorption equilibrium shows the quantitative maximum adsorption, thereby providing information about a polymer with the highest affinity for cellulose. These results allow further consideration of the interactions, taking into account specific trends, e.g. a favorable polymer conformation, the presence of specific functional groups, and specific structural units. This information is vital for designing new biomaterials.

The adsorption between cellulose and xyloglucan, i.e. the main representative of hemicelluloses, has been most extensively studied so far. This hemicellulose in particular has been shown to have a strong affinity for cellulose. It adsorbs on its surface and can even act as a promoter for further binding, for example with pectins, in certain conditions. Furthermore, xyloglucan shows the ability not only to interact locally with the surface of cellulose fibrils but also to coat them. In adsorption studies, no significant interactions between pectins and cellulose have been demonstrated. If they do occur, their neutral sugars, e.g. arabinose, galactose, and xylose, are believed to be mainly responsible for this phenomenon. The morphological structure of cellulose microfibrils cannot be neglected in the picture of the interaction between cell wall macromolecules, as it has a significant influence on the adsorption efficiency. The more ordered and highly crystalline structure is associated with higher interaction capacity. Interactions between cellulose and hemicelluloses are thought to influence the aggregation of fibrils and even the formation of crystalline cellulose microfibrils (Zhang et al. 2021).

Model adsorption studies represent *in vitro* experimental investigations. Polymer solutions are diluted and it is not possible to select the exact concentration of polymers that is present in the plant cell wall, which certainly varies. Another drawback is that the exact quantitative ratio of hemicelluloses/pectins to cellulose that can be found in nature is unknown. Similarly, the entire cell wall system cannot be accurately mapped in studies of the interactions between its major components. Presumably, these interactions are influenced by the medium with a specific pH value, the temperature, the climate in the plant habitat, certain enzymatic reactions, the growth stage, and many others. The contribution of hydrogen bonds, hydrophobic interactions, or van der Waals forces is not the only source of stabilization of the contact between hemicelluloses/pectins and cellulose. For example, coarse-grained molecular dynamics (CGMD) and NMR studies have revealed that pectins are in close contact with cellulose, which is determined not only by these interactions but also by the packing/crowding of these polymers between the cellulose microfibrils. Additionally, studies of cellulose residues after strong alkali extraction give evidence that some hemicelluloses and pectins are probably trapped within cellulose microfibrils.

The adsorption studies of the interaction between cellulose and hemicelluloses/pectins are of great interest from a biological point of view, as they help to improve the models of the plant cell wall. Importantly, they also have applications in industry, especially in the field of biosorption, which is in line with green chemistry. Furthermore, there are still questions waiting to be answered, e.g. about the impact of the degrees of methylation and acetylation of non-cellulosic polysaccharides on the adsorption of these components on cellulose.

Acknowledgments This research was funded in whole or in part by National Science Center-Poland projects no. NCN OPUS UMO-2018/29/B/NZ9/00141 and nr NCN PRELUDIUM BIS 2 2020/39/O/NZ9/00241. For the purpose of Open Access, the author has applied a CC-BY public copyright license to any Author Accepted Manuscript (AAM) version arising from this submission.

Authors' contributions PP wrote the original manuscript and corrected the manuscript. MSC obtained financial support, conceived and wrote the original manuscript, revised and corrected the manuscript. AZ reviewed and corrected the manuscript.

Funding This research was funded in whole or in part by National Science Center-Poland projects no. NCN OPUS UMO-2018/29/B/NZ9/00141 and no. NCN PRELUDIUM BIS 2 2020/39/O/NZ9/00241. For the purpose of Open Access, the author has applied a CC-BY public copyright license to any Author Accepted Manuscript (AAM) version arising from this submission.

Declarations

Conflict of 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.

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/>.

References

- Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, Staehelin A (2010) Plant cell walls: from chemistry to biology, 1st edn. Garland Science, New York
- Barbacci A, Lahaye M, Magnenet V (2013) Another brick in the cell wall: biosynthesis dependent growth model. PLoS ONE. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074400>
- Benselfelt T, Cranston ED, Ondaral S, Johansson E, Brumer H, Rutland MW, Wågberg L (2016) Adsorption of xyloglucan onto cellulose surfaces of different morphologies: an entropy-driven process. Biomacromol. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00561>
- Bootten TJ, Harris PJ, Melton LD, Newman RH (2004) Solid-state ^{13}C -NMR spectroscopy shows that the xyloglucans in the primary cell walls of mung bean (*Vigna radiata* L.) occur in different domains: a new model for xyloglucan-cellulose interactions in the cell wall. J Exp Bot. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh065>
- Broxterman SE, Schols HA (2018) Characterisation of pectin-xylan complexes in tomato primary plant cell walls. Carbohydr Polym. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.003>
- Chambat G, Karmous M, Costes M, Picard M, Joseleau JP (2005) Variation of xyloglucan substitution pattern affects the sorption on celluloses with different degrees of crystallinity. Cellulose. <https://doi.org/10.1007/s10570-004-1040-z>
- Chanliaud E, Burrows KM, Jeronimidis G, Gidley MJ (2002) Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. Planta. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0783-8>
- Chen M, Cathala B, Lahaye M (2022) Adsorption of apple xyloglucan on cellulose nanofiber depends on molecular weight, concentration and building blocks. Carbohydr Polym 296:119994
- Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. Nat Rev Mol Cell Biol. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Cosgrove DJ (2014) Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. Curr Opin Plant Biol. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.11.001>
- Costa G, Plazanet I (2016) Plant cell wall, a challenge for its characterisation. Adv Biol Chem. <https://doi.org/10.4236/abc.2016.63008>
- Cybulska J, Konstankiewicz K, Zdunek A, Skrzypiec K (2010a) Nanostructure of natural and model cell wall materials. Int Agrophys 24:107–114
- Cybulska J, Vanstreels E, Ho QT, Courtin CM, Craeyveld V, Nicolaï B, Zdunek A, Konstankiewicz K (2010b) Mechanical characteristics of artificial cell walls. J Food Eng. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.001>
- Dammak A, Quémener B, Bonnin E, Alvarado C, Bouchet B, Villares A, Moreau C, Cathala B (2015) Exploring architecture of xyloglucan cellulose nanocrystal complexes through enzyme susceptibility at different adsorption regimes. Biomacromol. <https://doi.org/10.1021/bm5016317>
- Dervilly-Pinel G, Tran V, Saulnier L (2004) Investigation of the distribution of arabinose residues on the xylan backbone of water-soluble arabinoxylans from wheat flour. Carbohydr Polym. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.09.004>
- Dick-Pérez M, Zhang Y, Hayes J et al (2011) Structure and interactions of plant cell-wall polysaccharides by two- and three-dimensional magic-angle-spinning solid-state NMR. Biochemistry. <https://doi.org/10.1021/bi101795q>
- Ding SY, Himmel ME (2006) The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. J Agric Food Chem. <https://doi.org/10.1021/jf051851z>
- Eronen P, Junka K, Laine J, Österberg M (2011a) Interaction between water-soluble polysaccharides and native nanofibrillar cellulose thin films. BioResources 6:4200
- Eronen P, Österberg M, Heikkinen S, Tenkanen M, Laine J (2011b) Interactions of structurally different hemicelluloses with nanofibrillar cellulose. Carbohydr Polym. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.031>
- Falcoz-Vigne L, Ogawa Y, Molina-Boisseau S et al (2017) Quantification of a tightly adsorbed monolayer of xylan on cellulose surface. Cellulose. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1401-z>
- Festucci-Buselli RA, Otoni WC, Joshi CP (2007) Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. Braz J Plant Physiol 19:1–13
- Gorshkova T, Mokshina N, Chernova T, Ibragimova N, Salnikov V, Mikshina P, Tryfona T, Banasiak A, Immerzeel P, Dupree P, Mellerowicz EJ (2015) Aspen tension wood fibers contain β -(1 \rightarrow 4)-galactans and acidic arabinogalactans retained by cellulose microfibrils in gelatinous

- walls. *Plant Physiol* 169(3):2048–2063. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00690>
- Gorshkova T, Petrova A, Mikshina P (2022) Review: tertiary cell wall of plant fibers as a source of inspiration in material design. *Carbohydr Polym* 295:119849. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119849>
- Grzadzka E, Chibowski S (2009) Influence of a kind of electrolyte and its ionic strength on the adsorption and zeta potential of the system: polyacrylic acid/MnO₂/electrolyte solution. *Physicochem Probl Miner Process* 43:31–42
- Gu J, Catchmark JM (2013) The impact of cellulose structure on binding interactions with hemicellulose and pectin. *Cellulose* 20:1613–1627. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-9965-8>
- Gu J, Catchmark JM (2014) Roles of xyloglucan and pectin on the mechanical properties of bacterial cellulose composite films. *Cellulose*. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0115-0>
- Gümüşkaya E, Usta M, Kirci H (2003) The effects of various pulping conditions on crystalline structure of cellulose in cotton linters. *Polym Degrad Stab*. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(03\)00157-5](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(03)00157-5)
- Guo J, Zhang X, Tian J et al (2021) Evaluating the refractive index, thickness and porosity of ultrathin cellulose nanocrystal films with different polymorphs by SPR technique. *Int J Biol Macromol*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbio mac.2021.10.158>
- Gurjanov OP, Ibragimova NN, Gnezdilov OI, Gorshkova TA (2008) Polysaccharides, tightly bound to cellulose in cell wall of flax bast fibre: isolation and identification. *Carbohydr Polym* 72(4):719–729. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.10.017>
- Hanus J, Mazeau K (2006) The xyloglucan-cellulose assembly at the atomic scale. *Biopolymers*. <https://doi.org/10.1002/bip.20460>
- Hayashi T (1989) Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.001035>
- Hayashi T, Kaida R (2011) Functions of xyloglucan in plant cells. *Mol Plant*. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp063>
- Hayashi T, Ogawa K, Mitsuishi Y (1994a) Characterization of the adsorption of xyloglucan to cellulose. *Plant Cell Physiol*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078714>
- Hayashi T, Takeda T, Ogawa K, Mitsuishi Y (1994b) Effects of the degree of polymerization on the binding of xyloglucans to cellulose. *Plant Cell Physiol*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078674>
- Heinonen E, Henriksson G, Lindström ME et al (2022) Xylan adsorption on cellulose: preferred alignment and local surface immobilizing effect. *Carbohydr Polym*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119221>
- Held MA, Jiang N, Basu D, Showalter AM, Faik A (2015) Plant cell wall polysaccharides: structure and biosynthesis. *Polysaccharides*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0_73
- Heredia A, Jiménez A, Guillén R (1995) Composition of plant cell walls. *Z Lebensm Unters Forsch*. <https://doi.org/10.1007/BF01192903>
- Jaafar Z, Mazeau K, Boissière A, le Gall S, Villares A, Vigouroux J, Beury N, Moreau C, Lahaye M, Cathala B (2019) Meaning of xylan acetylation on xylan-cellulose interactions: a quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) and molecular dynamic study. *Carbohydr Polym*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115315>
- Jarvis MC (2018) Structure of native cellulose microfibrils, the starting point for nanocellulose manufacture. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci* 376:20170045
- Jarvis MC (2023) Hydrogen bonding and other non-covalent interactions at the surfaces of cellulose microfibrils. *Cellulose*. <https://doi.org/10.1007/s10570-022-04954-3>
- Kabel MA, van den Borne H, Vincken JP, Voragen AGJ, Schols HA (2007) Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. *Carbohydr Polym*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.09.006>
- Kączkowski MA (2003) Structure, function and metabolism of plant cell wall. *Acta Physiol Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11738-003-0010-7>
- Kaczmarek A, Pieczywek PM, Cybulska J, Zdunek A (2022) Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: a review. *Carbohydr Polym*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118909>
- Kiemle SN, Zhang X, Esker AR et al (2014) Role of (1,3)-(1,4)- β -glucan in cell walls: interaction with cellulose. *Biomacromol*. <https://doi.org/10.1021/bm5001247>
- Kishani S, Benselfelt T, Wågberg L, Wohler J (2021) Entropy drives the adsorption of xyloglucan to cellulose surfaces—a molecular dynamics study. *J Colloid Interface Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.12.113>
- Kozlova LV, Nazipova AR, Gorshkov OV et al (2020) Elongating maize root: zone-specific combinations of polysaccharides from type I and type II primary cell walls. *Sci Rep* 10:10956. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67782-0>
- Lampugnani ER, Khan GA, Somssich M, Persson S (2018) Building a plant cell wall at a glance. *J Cell Sci*. <https://doi.org/10.1242/jcs.207373>
- Li Q, Wang S, Jin X et al (2020) The application of polysaccharides and their derivatives in pigment, barrier, and functional paper coatings. *Polymers*. <https://doi.org/10.3390/POLYM12081837>
- Lima DU, Buckeridge MS (2001) Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. *Carbohydr Polym*. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00297-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00297-6)
- Lima DU, Loh W, Buckeridge MS (2004) Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan. *Plant Physiol Biochem*. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.03.003>
- Lin D, Lopez-Sanchez P, Gidley MJ (2016) Interactions of pectins with cellulose during its synthesis in the absence of calcium. *Food Hydrocoll*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.004>
- Lin D, Lopez-Sanchez P, Selway N, Gidley MJ (2018) Viscoelastic properties of pectin/cellulose composites studied by QCM-D and oscillatory shear rheology. *Food Hydrocoll*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.019>
- Lopez M, Bizot H, Chambat G et al (2010) Enthalpic studies of xyloglucan-cellulose interactions. *Biomacromol*. <https://doi.org/10.1021/bm1002762>
- Melton LD, Smith BG, Ibrahim R, Schröder R (2009) Mannans in primary and secondary plant cell walls. *N Z J Sci* 39:153–160

- Merino D, Casalongué C, Alvarez VA (2019) Polysaccharides as eco-nanomaterials for agricultural applications. *Food Hydrocoll.* <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.004>
- Moon RJ, Martini A, Nairn J et al (2011) Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem Soc Rev.* <https://doi.org/10.1039/c0cs00108b>
- Moore JP, Farrant JM, Driouich A (2008) A role for pectin-associated Arabians in maintaining the flexibility of the plant cell wall during water deficit stress. *Plant Signal Behav.* <https://doi.org/10.4161/psb.3.2.4959>
- Myśliwiec D, Chylińska M, Szymańska-Chargot M, Chibowski S, Zdunek A (2016) Revision of adsorption models of xyloglucan on microcrystalline cellulose. *Cellulose.* <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0995-x>
- Ng JKT, Zujovic ZD, Smith BG et al (2014) Solid-state ^{13}C NMR study of the mobility of polysaccharides in the cell walls of two apple cultivars of different firmness. *Carbohydr Res.* <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.12.019>
- Niimura H, Yokoyama T, Kimura S et al (2010) AFM observation of ultrathin microfibrils in fruit tissues. *Cellulose.* <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9361-6>
- Nishiyama Y (2009) Structure and properties of the cellulose microfibril. *J Wood Sci* 55:241
- Northcote DH (1972) Chemistry of the plant cell wall. *Annu Rev Plant Physiol.* <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.23.060172.000553>
- Ochoa-Villarreal M, Aispuro-Hernández E, Vargas-Arispuro I, Ngel M (2012) Plant cell wall polymers: function, structure and biological activity of their derivatives. *Polymerization.* <https://doi.org/10.5772/46094>
- Oehme DP, Doblin MS, Wagner J, Bacic A, Downton MT, Gidley MJ (2015) Gaining insight into cell wall cellulose microfibril organisation by simulating microfibril adsorption. *Cellulose.* <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0778-9>
- Paananen A, Österberg M, Rutland M, Tammelin T, Saarinen T, Tappura K, Stenius P (2004) Interaction between cellulose and xylan: an atomic force microscope and quartz crystal microbalance study. In: ACS Symposium Series. <https://doi.org/10.1021/bk-2004-0864.ch018>
- Park YB, Cosgrove DJ (2015) Xyloglucan and its interactions with other components of the growing cell wall. *Plant Cell Physiol.* <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu204>
- Patel PH (2009) Characterization of a crosslink between xyloglucan and rhamnogalacturonan from cotton cell walls. Oklahoma State University
- Paul UC, Manian AP, Šíroká B, Duelli H, Bechtold T (2012) Sorption of anionic polysaccharides by cellulose. *Carbohydr Polym.* <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.049>
- Pauly M, Albersheim P, Darvill A, York WS (1999) Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *Plant J.* <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.1999.00630.x>
- Phyo P, Wang T, Xiao C et al (2017) Effects of pectin molecular weight changes on the structure, dynamics, and polysaccharide interactions of primary cell walls of *Arabidopsis thaliana*: insights from solid-state NMR. *Biomacromol.* <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00888>
- Rui Y, Dinneny JR (2020) A wall with integrity: surveillance and maintenance of the plant cell wall under stress. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.16166>
- Salmén L (2022) On the organization of hemicelluloses in the wood cell wall. *Cellulose* 29:1349–1355
- Saxena IM, Brown RM (2005) Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. *Ann Bot* 96:9–21
- Simmons TJ, Mortimer JC, Bernardinelli OD et al (2016) Folding of xylan onto cellulose fibrils in plant cell walls revealed by solid-state NMR. *Nat Commun.* <https://doi.org/10.1038/ncomms13902>
- Smith-Moritz AM, Hao Z, Fernández-Niño SG, Fangel JU, Verhertbruggen Y, Holman HY, Willats WGT, Ronald PC, Hv S, Heazlewood JL, Vega-Sánchez ME (2015) Structural characterization of a mixed-linkage glucan deficient mutant reveals alteration in cellulose microfibril orientation in rice coleoptile mesophyll cell walls. *Front Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00628>
- Souza AP, Leite DCC, Pattathil S, Hahn MG, Buckeridge MS (2013) Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. *Bioenergy Res.* <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9268-1>
- Tenhaken R (2015) Cell wall remodeling under abiotic stress. *Front Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00771>
- Terashima M, Fukushima M, Tanaka S (2004) Influence of pH on the surface activity of humic acid: micelle-like aggregate formation and interfacial adsorption. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.08.028>
- Terrett OM, Dupree P (2019) Covalent interactions between lignin and hemicelluloses in plant secondary cell walls. *Curr Opin Biotechnol* 56:97–104
- Thimm JC, Burritt DJ, Sims IM, Newman RH, Ducker WA, Melton LD (2002) Celery (*Apium graveolens*) parenchyma cell walls: cell walls with minimal xyloglucan. *Physiol Plant.* <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1160205.x>
- Thomas LH, Trevor Forsyth V, Šturcová A et al (2013) Structure of cellulose microfibrils in primary cell walls from collenchyma. *Plant Physiol.* <https://doi.org/10.1104/pp.112.2.06359>
- Thompson JE, Stephen CF (2000) Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta.* <https://doi.org/10.1007/s004250000287>
- Villares A, Moreau C, Dammak A, Capron I, Cathala B (2015) Kinetic aspects of the adsorption of xyloglucan onto cellulose nanocrystals. *Soft Matter.* <https://doi.org/10.1039/c5sm01413a>
- Wang T, Park YB, Cosgrove DJ, Hong M (2015) Cellulose-pectin spatial contacts are inherent to never-dried *Arabidopsis* primary cell walls: evidence from solid-state nuclear magnetic resonance. *Plant Physiol.* <https://doi.org/10.1104/pp.15.00665>
- Whitney SEC, Gothard MGE, Mitchell JT, Gidley MJ (1999) Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. *Plant Physiol.* <https://doi.org/10.1104/pp.121.2.657>
- Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol.* <https://doi.org/10.1023/A:1010662911148>

- Wiśniewska M, Grzadka E, Mendrek B (2013) Influence of the solid type on the adsorption mechanism of nonionic polymers in the metal oxide/water solution system-temperature effect. *Powder Technol*. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.06.024>
- Wohlert M, Benselfelt T, Wägberg L, Furó I, Berglund LA, Wohlert J (2022) Cellulose and the role of hydrogen bonds: not in charge of everything. *Cellulose*. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04325-4>
- Yao M, Liang C, Yao S et al (2021) Kinetics and thermodynamics of hemicellulose adsorption onto nanofibril cellulose surfaces by QCM-D. *ACS Omega*. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04391>
- Yu L, Lyczakowski JJ, Pereira CS, Kotake T, Yu X, Li A, Mogelsvang S, Skaf MS, Dupree P (2018) The patterned structure of galactoglucomannan suggests it may bind to cellulose in seed mucilage. *Plant Physiol*. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00709>
- Zhang Y, Yu J, Wang X, Durachko DM, Zhang S, Cosgrove DJ (2021) Molecular insights into the complex mechanics of plant epidermal cell walls. *Science* 72(6543):706–711. <https://doi.org/10.1126/science.abf2824>
- Zhao G (2011) Sorption of heavy metal ions from aqueous solutions: a review. *The Open Colloid Sci J*. <https://doi.org/10.2174/1876530001104010019>
- Zhao Z, Crespi VH, Kubicki JD et al (2014) Molecular dynamics simulation study of xyloglucan adsorption on cellulose surfaces: effects of surface hydrophobicity and side-chain variation. *Cellulose*. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0041-1>
- Zykwinska A, Ralet MCJ, Garnier CD, Thibault JFJ (2005) Evidence for in vitro binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiol*. <https://doi.org/10.1104/pp.105.065912>
- Zykwinska A, Thibault JF, Ralet MC (2007) Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged. *J Exp Bot*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm037>
- Zykwinska A, Thibault JF, Ralet MC (2008a) Modelling of xyloglucan, pectins and pectic side chains binding onto cellulose microfibrils. *Carbohydr Polym*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.01.011>
- Zykwinska A, Thibault JF, Ralet MC (2008b) Competitive binding of pectin and xyloglucan with primary cell wall cellulose. *Carbohydr Polym*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.05.004>

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

7.1. Materiały uzupełniające publikacji P.1

SUPPLEMENTARY MATERIAL

SM Table. 1. Table gathering information about the maximum adsorption values of hemicelluloses and pectins, taking into account process conditions and cellulose source.

Polysaccharide	Type of cellulose	Conditions	Maximum adsorption capacity \approx ($\text{mg}_{\text{adsorbate}}/\text{g}_{\text{cellulose}}$)	References
Xyloglucan from tamarind, non-fucosylated	BMCC	40°C	250	Lopez et al. 2010
	CNC from cotton	20°C, 18 h	333	Dammak et al. 2014
	Avicel	20 mM sodium acetate buffer (pH 5.8), 40°C, 6 h	13	Zykwinska et al. 2005
	primary cell wall (PCW) cellulose	20 mM sodium acetate buffer (pH 5.8), 40°C, 6 h	33	Zykwinska et al. 2005
	B-CNW	25 °C, overnight	202	Gu and Catchmark 2013
	C-CNW	25 °C, overnight	98	Gu and Catchmark 2013
	B-PASCNW	25 °C, overnight	39	Gu and Catchmark 2013
	C-PASCNW	25 °C, overnight	29	Gu and Catchmark 2013
Xyloglucan from pea, fucosylated	primary cell wall (PCW) cellulose	20 mM sodium acetate buffer (pH 5.8), 40°C, 6 h	112	Zykwinska et al. 2008
Xyloglucan from apple	CNF	40 °C, 6 h 25 mM sodium acetate buffer (pH 6.0)	76	Chen et al. 2022

Xylan from beechwood	B-CNW	25 °C, overnight	187	Gu and Catchmark 2013
	C-CNW	25 °C, overnight	-	Gu and Catchmark 2013
	B-PASCNW	25 °C, overnight	27	Gu and Catchmark 2013
	C-PASCNW	25 °C, overnight	-	Gu and Catchmark 2013
MLG	Avicel	20 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 40 °C, 20 h	28	Kiemle et al. 2014
Arabinan-rich pectin from sugar beet	Avicel	20 mM sodium acetate buffer (pH 5.8), 40°C, 6 h	4	Zykwinska et al. 2005
	primary cell wall (PCW) cellulose	20 mM sodium acetate buffer (pH 5.8), 40°C, 6 h	8	Zykwinska et al. 2005
Galactan-rich pectin from potato	Avicel	20 mM sodium acetate buffer (pH 5.8), 40°C, 6 h	3	Zykwinska et al. 2005
	primary cell wall (PCW) cellulose	20 mM sodium acetate buffer (pH 5.8), 40°C, 6 h	9	Zykwinska et al. 2008
Pectin from citrus	Avicel	20 mM sodium acetate buffer (pH 5.8), 40°C, 6 h	-	Zykwinska et al. 2005
Pectin from apple	B-CNW	25 °C, overnight	59	Gu and Catchmark 2013
	C-CNW	25 °C, overnight	51	Gu and Catchmark 2013

	B-PASCNW	25 °C, overnight	19	Gu and Catchmark 2013
	C-PASCNW	25 °C, overnight	-	Gu and Catchmark 2013
Arabinogalactan from larch wood	B-CNW	25 °C, overnight	-	Gu and Catchmark 2013
	C-CNW	25 °C, overnight	-	Gu and Catchmark 2013
	B-PASCNW	25 °C, overnight	-	Gu and Catchmark 2013
	C-PASCNW	25 °C, overnight	-	Gu and Catchmark 2013

BMCC - bacterial microcrystalline cellulose; CNC - Cellulose nanocrystals; CNF - cellulose nanofibers; Avicel - microcrystalline cellulose; B-CNW - crystalline cellulose nanowhiskers (CNWs) obtained from bacterial cellulose; C-CNW - crystalline cellulose nanowhiskers (CNWs) obtained from cotton cellulose; B-PASCNW - highly amorphous cellulose obtained from B-CNW; C-PASCNW - highly amorphous cellulose obtained from C-CNW

8. Tekst publikacji P.2

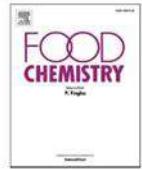
Food Chemistry 470 (2025) 142639



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

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



Monosaccharide composition and degree of acetylation of non-cellulosic cell wall polysaccharides and their relationship to apple firmness

Patrycja Pękala, Monika Szymańska-Chargot^{*}, Justyna Cybulska, Artur Zdunek

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Acetylated polysaccharides
Hemicellulose
Pectin
Firmness
Plant cell wall composition
Apple

ABSTRACT

The firmness of the two apple varieties: Idared and Pinova was similar during ripening, while it decreased significantly during 3-month storage only for Idared. Pectin-rich fractions were isolated from apple flesh tissue: water-soluble pectin (WSP), imidazole-soluble pectin (ISP), and hemicellulose-rich fractions: natively acetylated hemicelluloses (LiCl-DMSO), deacetylated hemicelluloses (KOH). It was shown that the degree of acetylation (DAc) of the hemicelluloses fraction (LiCl-DMSO) increased during apple ripening and storage, with higher values for Idared. Furthermore, the DAc of the hemicellulose fraction (LiCl-DMSO) was shown to be negatively correlated with apple firmness, and thus, among other factors, the effect of the degree of acetylation of hemicelluloses on fruit softening during storage. In the WSP and ISP, galacturonic acid content increased during ripening and storage of apples, which also showed a correlation with firmness. A higher content of linear pectin was recorded for Idared, while the contribution of rhamnogalacturonans was higher for Pinova.

1. Introduction

Apples are of great interest to consumers who rely on their high quality. They are primarily guided by the external appearance of the apples (size, shape, colour, and absence of blemishes). On the other hand, there are the internal quality factors (firmness, texture, amount of juice, soluble solids content) that influence their repeat choice (Jaeger et al., 2018; Wang et al., 2022; Zhang et al., 2021). As these are fruits intended for storage, it is crucial to maintain their high level of quality for as long as possible. It is known that the composition of the plant cell wall significantly affects fruit texture (Cybulska et al., 2013; Zdunek et al., 2014). Therefore, our research addresses the composition of plant cell wall polysaccharides, with particular emphasis on the degree of acetylation and their changes during apple ripening and postharvest storage.

During fruit ripening, complex biochemical processes occur, making the fruit more attractive for consumption and thus spreading the seeds. Starch is converted into glucose and fructose, making the fruit sweeter (Aprea et al., 2017; Shiga et al., 2011), and there are also changes in the colour and aroma of the fruit. Fruit ripening is closely linked to texture changes, there is a softening process that results from the modification, rearrangement, and degradation of plant cell wall polysaccharides,

driven by both enzymatic and non-enzymatic reactions (Duan et al., 2008; Prasanna et al., 2007; Ren et al., 2020).

The primary plant cell wall is mainly composed of polysaccharides such as cellulose, hemicelluloses, and pectin (Fry, 2010; McCann & Knox, 2010; Sørensen & Willats, 2011). Both pectins and hemicelluloses are characterized by their complex structure. Hemicelluloses are a group of polysaccharides that, like cellulose, have a β -1,4-linked backbone. In general, xyloglucans, xylans, β -D-glucans, and mannans are the main representatives of hemicelluloses (Scheller & Ulvskov, 2010). Pectin is composed of galacturonic acid linked by an α -1,4-glycosidic bond (homogalacturonan), and can be highly branched (rhamnogalacturonan types I and II), where the side chains are mainly neutral sugars such as arabinan, galactans, and arabinogalactans (Kaczmarek et al., 2022; Zdunek et al., 2021). They may have many side branches and substituents, such as a methyl or acetyl group, which are attached to the hydroxyl group to form esters.

Acetylation of plant cell wall polysaccharides takes place in the Golgi apparatus (Pauly & Ramírez, 2018; Reyes & Orellana, 2008), and the degree of acetylation of polysaccharides depends primarily on the species and organ of the plant (Gille & Pauly, 2012). Moreover, it can change during the subsequent developmental stages of the plant. Acetyl groups can be attached to the main chain and side chain of

^{*} Corresponding author at: Institute of Agrophysics PAS, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27, Poland.

E-mail addresses: p.pekala@ipan.lublin.pl (P. Pękala), m.szymanska@ipan.lublin.pl (M. Szymańska-Chargot), j.cybulska@ipan.lublin.pl (J. Cybulska), a.zdunek@ipan.lublin.pl (A. Zdunek).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.142639>

Received 9 October 2024; Received in revised form 12 December 2024; Accepted 22 December 2024

Available online 24 December 2024

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

hemicelluloses. In dicots xyloglucans, they occur at O-6 of the glucose residues in the main chain and O-6 or O-3, O-4 of the galactose residues in the side chain (Gille & Pauly, 2012). However, in aqueous solutions, acetyl groups can change their position of substitution of the free hydroxyl group within the same glycosyl and galactosyl residue (Gille & Pauly, 2012). In pectin, acetyl groups are attached mainly to the main chain at the O-2, O-3 position of galacturonic acid in homogalacturonan, rhamnogalacturonan type I and also at the O-3 rhamnose in rhamnogalacturonan type I (Gille & Pauly, 2012; Shahin et al., 2023). In contrast, native cellulose is free from decoration with acetyl groups (Gille & Pauly, 2012).

The degree of acetylation of polysaccharides influences their physicochemical properties. It has been shown that pectins with a high degree of acetylation showed decreased gelling capacity (Shahin et al., 2023). Furthermore, the acetyl substituents of non-cellulosic polysaccharides may provide a steric hindrance to interaction with cellulose. It is known that a linear glucan backbone, free of branching, is the form most preferred for adsorption onto cellulose. On the other hand, acetyl substituents prevent hemicellulose from self-associating (Shahin et al., 2023), which can be a competitive phenomenon for interaction with cellulose. Moreover, Jaafar et al. (2019) studies showed the effect of the acetyl substituents of the xylan on the organization in the adsorption layer on cellulose, which was dense, stiff, and less hydrated compared to the deacetylated xylan-cellulose system.

Importantly, the composition of polysaccharides and the interactions between them define the mechanical properties of the plant cell wall at the macroscale (Szymańska-Chargot et al., 2024). During fruit ripening and postharvest storage, certain changes in the structure of polysaccharide components occur (Dheilly et al., 2016; Huang et al., 2023; Lahaye et al., 2013; Posé et al., 2019), which may affect their interactions and thus the integrity of the cell wall (de Ornelas-Paz et al., 2018; Zykwińska et al., 2005). As a result, there is a reduction in the firmness of the fruit, which is correlated with cell wall degradation (Brahem et al., 2017). Generally, pectins undergo solubilization and depolymerisation during fruit softening, which contributes to wall loosening (Cybułska et al., 2015, 2022; Kaczmarska et al., 2022). An increase in water-soluble pectins and the cleavage of side branches of pectins such as arabinose and galactose has been reported in apples (Lo Scalzo et al., 2005). On the other hand, the investigation of silencing genes which were responsible for the production of pectin-degrading enzymes brought only minimal improvement in slowing the rate of fruit softening (Bonnin & Lahaye, 2013; D. Wang et al., 2018). Therefore, it was concluded that the fruit softening induced by losing cell wall integrity should be rather treated as multiple and simultaneous changes (D. Wang et al., 2018). Also, the loosening of the pectin-cellulose and hemicellulose-cellulose networks cannot be neglected as their integrity is vital for the integrity of the cell wall as a whole. Importantly, substitution of the main backbone of non-cellulose polysaccharides with methyl and acetyl esters affects their interaction with cellulose microfibrils (Jaafar et al., 2019).

Much research describing the changes in monosaccharide composition of cell wall material during apple fruit ripening and storage (Dheilly et al., 2016; Lahaye et al., 2013; Ng et al., 2015; Percy et al., 1997) has already been done. The most recent was conducted on four apple cultivars in different development stages (Su et al., 2022). However, our study innovatively takes into account the analysis of monosaccharide composition and, in addition, the degree of acetylation of four polysaccharide fractions (water, imidazole, lithium chloride in DMSO and 4 M solution of soluble potassium hydroxide polysaccharides) isolated from two apple varieties at 4 pre-harvest and 3 post-harvest stages. Moreover, our study shows a correlation of the monosaccharide composition of pectin-rich fractions with apple firmness, but importantly and not previously addressed, of hemicellulose-rich fractions and the degree of acetylation. Furthermore, two apple varieties, Idared and Pinova, were chosen to compare the results and show differences between varieties.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

'Idared' (ID) and 'Pinova' (PIN) apples were harvested from two orchards located near Lublin in 2021. Apples without blemishes were randomly harvested from 10 chosen trees at weekly intervals from 21 September (T1, T2, T3) until the harvest date (T4) chosen by the orchardists. Apples from the last harvest (T4) were then stored in cold storage at 2 °C and normal atmosphere for 1 month (T5), 2 months (T6), and 3 months (T7). Twenty apples of similar size and maturity of the Idared and Pinova varieties were collected at each stage. The fruit was peeled and hollowed out and then homogenized into a pulp. The obtained pulp was used for further tests and the preparation of cell wall material.

2.2. Starch iodine test

Starch Iodine tests were carried out to demonstrate the presence of starch and thus the maturity state of Idared and Pinova apples from all ripening (T1-T4) and storage terms (T5-T7). In each case, five apples were split in half along the equator and then immersed in an iodine solution (40 g KI + 10 g I₂ in 1 L distilled water) for 1 min, allowed to dry at room temperature, photographed, and then interpreted (Doerflinger et al., 2015; Peirs et al., 2002; Szymańska-Chargot et al., 2015).

2.3. Soluble solids content (SSC)

Total soluble solids content (SSC) was determined using a digital Brix-based refractometer (PAL-BX/R1, Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan). The apple pulp was filtered on an 11 µm nylon filter and then a drop of the filtrate was placed on the prism of the refractometer (Szymańska-Chargot et al., 2012). The measurement was repeated five times for each sample.

2.4. Firmness (F)

Apple firmness measurements were carried out using a Lloyd LRX universal testing machine (Lloyd Instruments Ltd., Hampshire, UK) with a 500 N load cell. A standard puncture test with a cylindrical probe (11.1 mm diameter) at a speed of 20 mm/min and a maximum penetration depth of 8 mm was used (Skic et al., 2016; Zdunek et al., 2010, 2016). The firmness of the apple flesh was tested, so the skin was cut off before the test. Firmness (F) was defined as the maximum value of force needed to puncture the apple flesh and expressed in Newtons (N). Measurements were taken for eight apples from each term (T1-T7) of both apple varieties.

2.5. Preparation of cell wall material

Cell wall material (CWM) was extracted from the flesh of 10 apples from all ripening and storage terms investigated (T1-T7) and from each cultivar of apples. Extraction was performed according to the well-known protocol for the extraction of insoluble solids in hot alcohol (Chylińska et al., 2017; Renard, 2005; Szymańska-Chargot & Zdunek, 2013; Zielinska et al., 2022). The 150 g apple pulp was placed in an excess of 70 % ethanol solution at a ratio of 1:10 (w/v), boiled for about 20 min, and filtered through an 11 µm nylon filter. The procedure was repeated several times, then with 96 % ethanol until the filtrate was negative for sugars by the sulphuric acid-UV method (Albalasmeh et al., 2013; Szymańska-Chargot et al., 2024). The obtained precipitate was then washed with acetone, left to air dry, and ground in a ball mill (Retsch MM400) at 20 Hz for 20 min.

2.6. Sequential extraction of cell wall polysaccharides

Sequential extraction was performed for isolated CWM of both apple cultivars from all terms (T1-T7). Fractions of water-soluble pectins WSP, imidazole-soluble pectins ISP, and hemicelluloses extracted with KOH were obtained using the methodology previously described by Szymańska-Chargot et al. (2024). Whereas the fraction of natively acetylated polysaccharides, mainly hemicelluloses, was extracted with LiCl-DMSO solution according to the methodology proposed by Ray et al. (2014) with some modifications. The sequential extraction steps are shown in SM Fig. 1. The WSP and ISP fractions were referred to as mainly pectin-rich fractions, while LiCl-DMSO and KOH were referred to as mainly hemicellulose-rich fractions.

2.6.1. WSP fraction

To 300 mg CWM, 30 mL distilled water was added and stirred on a rotator overnight at 23 ± 1 °C room temperature. Centrifuged and filtered on a nylon filter, the resulting WSP filtrate was frozen and then lyophilized.

2.6.2. ISP fraction

To the precipitate, 30 mL of Imidazole-HCl (0.5 mol·L⁻¹ imidazole neutralized to pH 7 by HCl) was added and stirred on a rotator overnight at 2 °C. Centrifuged and filtered on a nylon filter, ISP1 filtrate was obtained. Then 30 mL of 0.5 mol·L⁻¹ imidazole-HCl was added again to the precipitate and stirred on a rotator for 2 h at 23 ± 1 °C room temperature. It was centrifuged and filtered on a nylon filter, and ISP2 filtrate was obtained. Fractions ISP1 and ISP2 were combined as ISP.

2.6.3. LiCl-DMSO fraction

To the precipitate was added 60 mL of LiCl-DMSO solution (0.2 mol·L⁻¹ LiCl in DMSO, eg: 84 g of LiCl in 1 L of DMSO). It was stirred in a water bath with heating at 50 °C for 48 h. After a fixed time, the suspension was cooled and centrifuged (20 min, 20 °C, 9000 ×g), filtered on a nylon filter, and the filtrate of mainly acetylated hemicelluloses in LiCl-DMSO was obtained.

2.6.4. KOH fraction

To the precipitate, 15 mL of KOH solution with NaBH₄ (4 mol·L⁻¹ KOH + 0.01 mol·L⁻¹ NaBH₄) and stirred on a rotator for 2 h at 2 °C. Centrifuged and filtered on a nylon filter, the resulting filtrate with 4 M KOH was neutralized to neutral pH.

The resulting ISP, LiCl-DMSO, and KOH filtrates were dialyzed using membranes (MWCO 1000, Roth) against distilled water controlling its conductivity, and then frozen and lyophilized. All lyophilizates were stored in a desiccator prior to further study.

2.6.5. Monosaccharide compositions

Monosaccharide composition was investigated according to the method developed by Zhang et al. (2018) with some modifications (Cybulska et al., 2022). Pectin samples were disintegrated using 2 M methanolic HCl at 80 °C for 72 h, and then hydrolysis with 2 mL of 3 mol·L⁻¹ trifluoroacetic acid (TFA) solution at 100 °C for 7 h. Then 1 mL of water, 50 µL of 0.3 mol·L⁻¹ NaOH, and 50 µL of a 0.5 mol·L⁻¹ solution of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) in methanol were added to each sample. After incubating at 70 °C for 60 min, samples were neutralized with 50 µL of 0.3 mol·L⁻¹ HCl, extracted with chloroform, and filtered through a 22-µm membrane directly to the HPLC vials. Monosaccharide and uronic acid standards (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 analyzed using a HPLC system consisting of a 1130 HPLC quaternary pump, a S 5300 sample injector, a S 4120 column oven, and a S 3350 PDA Detector (Sykam GmbH, Gewerberg, Germany) 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 consisted of A: 0.1 mol·L⁻¹ 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 at 30 °C, and the detection wavelength was 246 nm. The analysis was performed in triplicate.

Additionally, on the basis of monosaccharide composition the following sugar ratios were calculated:

$$\frac{\text{GalA}}{\text{Fuc} + \text{Rha} + \text{Ara} + \text{Gal} + \text{Xyl}} \quad (1)$$

$$\frac{2^{\circ}\text{Rha}}{\text{GalA} - \text{Rha}} \quad (2)$$

$$\frac{\text{Ara} + \text{Gal}}{\text{Rha}} \quad (3)$$

$$\frac{\text{Man}}{\text{Xyl}} \quad (4)$$

Those ratios can be related to the features of polysaccharides such as linearity of pectin (ratio (1), Eq. 1), contribution of rhamnogalacturonan I to homogalacturonan (ratio (2), Eq. 2), average side chain length of rhamnogalacturonan type I (ratio (3), Eq. 3) and contribution of mannans in hemicellulose population (ratio (4), Eq. 4) according to Houben et al. (2011) and Broxterman et al. (2017).

In addition for the pectin-rich fractions, the molar percentage of HG (HG%, Eq. 5) and RG type I (RG%, Eq. 6) was also calculated according to the previous study of M'sakni et al. (2006) and Kaczmarek et al. (2024).

$$(\text{HG}\%) = \text{GalA}(\text{mol}\%) - \text{Rha}(\text{mol}\%) \quad (5)$$

$$(\text{RG}\%) = 2^{\circ}\text{Rha}(\text{mol}\%) + \text{Gal}(\text{mol}\%) + \text{Ara}(\text{mol}\%) \quad (6)$$

2.7. Degree of acetylation and methylation

The degree of acetylation and methylation was determined for the polysaccharides of the WSP, ISP, LiCl-DMSO, and KOH fractions of the cell wall of Idared and Pinova apples during ripening and storage (T1-T7). Samples were saponified with sodium hydroxide to release acetic acid/methanol, which was then determined by HPLC chromatography. Chromatographic analysis was carried out according to the method described by Levigne et al. (2002) with some modifications. 5 mg of the lyophilized sample suspended in 0.5 mL of 0.2 mol·L⁻¹ NaOH and incubated for 2 h at 4 °C. Then 0.5 mL of 0.2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ was added to neutralize the sample, followed by centrifugation for 10 min and filtration (0.22 µm). A 20 µL sample was injected into the HPLC. The parameters of the chromatographic analysis were: mobile phase – 4 mmol·L⁻¹ H₂SO₄, flow rate 0.8 mL/min, C18 column (4.6x250mm, 5 µm), and RI detector. Acetic acid and methanol were used as an external standard and a calibration curve was performed under the same analysis conditions as for the samples. Three replicates were performed for each sample.

The degree of acetylation/methylation refers to the percentage ratio of the mass of acetic acid/methanol to the mass of polysaccharides of a given fraction (calculated from the analysis of monosaccharide composition, HPLC; monosaccharides yield of Man, Rha, GlcA, GalA, Glc, Ga, Xyl, Ara, Fuc * sample mass).

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses for the data: firmness, SSC, dry weight, monosaccharide composition, DAC and heatmaps of correlations were performed using the Statistica 13 software (StatSoft, Inc., Tulsa, USA). For each statistical analysis, the limit of inference error was $\alpha = 0.05$.

The dry weight and firmness results were consistent with a normal

distribution, checked by the Shapiro-Wilk test. The variance was homogeneous only for dry weight results, and for firmness, the variance was non-homogeneous, as checked by the Cochran test. Therefore, a one-way ANOVA analysis was performed for the dry weight results (term was a factor), followed by an HSD Tukey test. A two-way ANOVA (variety and term factor) with Welch's correction followed by a RIR Tukey's post hoc test was used for firmness results.

The results of SSC, monosaccharide composition, and DAc were inconsistent with a normal distribution, as checked by the Shapiro-Wilk test. Thus, a Kruskal Wallis ANOVA analysis was performed, followed by a multiple comparison of mean ranks post hoc test.

Heatmaps were created based on correlation coefficients from the mean values for each collection term. Spearman's correlation was chosen, after verifying disagreement with the normal distribution with the Shapiro-Wilk test and high skewness.

Principal component analysis (PCA) was applied to the monosaccharide composition using Unscrambler 10.1 (Camo Software AS., Norway). The PCA was used to reduce the data and obtain a smaller set of principal components (PC) that explain the greatest variation in a given data set. This avail to monitor the dynamic of changes in cell wall composition in the course of the apple sampling term. Apart of firmness, the GalA, sugar ratios, the molar percentage of HG (HG%, Eq. 5) and RG type I (RG%, Eq. 6), degree of acetylation and methylation in fractions WSP and ISP, and Man, Gal, Xyl, Fuc, mannose to xylose ratio, degree of acetylation and methylation in LiCl-DMSO and KOH were chosen and treated as variables. Standard deviation as a weight was used in the data weighting process. The NIPALS algorithm was used and the maximum number of components was seven.

3. Results

3.1. Overall determination of fruit state

The results of the physicochemical properties selected for evaluation and monitoring of apple maturity state are shown in Fig. 1., SM Fig. 2., and SM Table 1.

The iodine test confirmed a decrease in starch content with apple ripening (SM Fig. 2.) (Peirs et al., 2002; Shiga et al., 2011). Usually, the harvest date is not the same as the full maturity of the apples, but only the minimum maturity that allows the apples to be stored with the highest quality for as long as possible (Doerflinger et al., 2015) and is dependent on the apple variety. Here, in the case of both cultivars, Pinova and Idared the typical harvest period is from the beginning to the middle of October. The Idared apples at T4 had a higher starch content than Pinova, while the influence of cold storage on starch content (terms T5-T7) was similar for both apple varieties.

Another important and commonly used indicator of maturity is firmness (Ng et al., 2014; Rutkowski et al., 2006; Szymanska-Chargot et al., 2012), and the firmness of apples at harvest significantly determines their quality and post-harvest storability (de Ornelas-Paz et al., 2018). The firmness results for Idared and Pinova apples are shown in Fig. 1. Apple firmness was maintained at a similar level during ripening on the tree and at harvest day (T1-T4) and firmness values were similar between varieties (Idared 72–68 N; Pinova 72–67 N, respectively). In contrast, statistically significant differences between cultivars occurred during post-harvest cold storage (after two and three months; T6-T7). A significant loss of firmness occurred in Idared apples, where firmness was 43 N after three months of post-harvest storage, which was in line with an earlier study by Szymanska-Chargot et al. (2012) for 'Ligol' and 'Shampion' apples. Interestingly for the Pinova apple variety, no

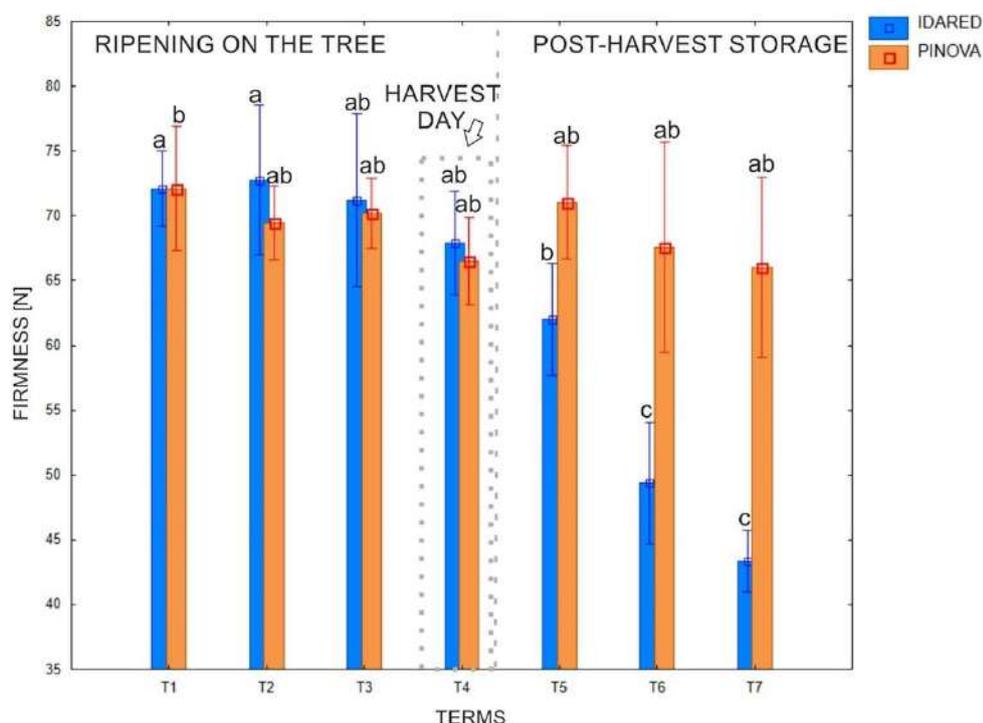


Fig. 1. Firmness graph of idared and pinova apples during ripening on the tree and post-harvest storage. A two-way Welch's ANOVA analysis was carried out, testing changes in firmness against term and apple variety. Letters in superscript indicate statistically significant differences; values with the same letters are not significantly different in RIR Tukey's post hoc test ($p < 0.05$). Points and whiskers express the mean \pm 0.95 confidence interval.

significant decrease in firmness was observed during post-harvest storage. Namely, the firmness of Pinova apples after three months of cold storage was 66 N, close to the harvest date firmness of 67 N. To be more precise, in the case of Pinova, the firmness value at T5 (71.04 ± 3.37 N) was slightly higher than at T4 (66.50 ± 2.60 N), while no statistically significant differences were shown. Therefore, both cultivars faced different behavior during cold room storage: Idared became softer, while the Pinova apples retained their firmness.

As is well known, with the ripening of fruit subsequently to the fruit firmness loss, starch is converted into the monosaccharides (Aprea et al., 2017; Shiga et al., 2011). Therefore, the total soluble solids content (mainly glucose, sucrose, and fructose) increases as the fruit ripens. Accordingly, in our study (SM Table 1), SSC increased during ripening and cold storage (T1-T7) for both apple varieties, but higher SSC values were reported for Pinova (Idared: 10.66–11.68°Brix; Pinova: 12.92–15.54°Brix). No statistically significant differences in apple dry weight were observed after three months of cold storage compared to the harvest date (T4) for both apple varieties. Whereby higher dry weight values were recorded for Pinova apples (T4: 18.24 %) than for Idared (T4: 15.75 %).

Generally, both cultivars, Pinova and Idared are recognized as late apples reaching harvest maturity in October and are suitable for eating in January. The harvest maturity parameters typical for Idared are: firmness – 67–87 N, SSC (°Brix) – 10.5–11.5, and starch index – 6–8, while those parameters for Pinova apples are: 62–72 N, 11.5–13.00 (°Brix), and 6–7, respectively. Thus, the T4 of Idared indeed was the optimum harvest date (E-Sadownictwo, 2024). In the case of Pinova firmness and SSC at T4 were typical for the optimum harvest date, but the starch index was probably too high (starch already degraded, SM Fig. 2). However, in the case of Pinova apples firmness was stable during storage in contrast to the Idared apples, as stated above.

3.2. Monosaccharide composition

The composition of the cell wall has an important influence on the texture properties of apple fruit (Cybulska et al., 2013; Zdunek et al., 2014). Fruit softening is closely linked to the solubilization and degradation of major cell wall components, such as pectin, hemicelluloses, and cellulose, related to changes in enzymatic activity (Leszczuk et al., 2019). Pectins are modified by pectinases such as pectin lyase (PL) polygalacturonase (PG), pectin methylesterase (PME) and pectin acetyltransferase (PAE), hemicelluloses by xylanase, β -glucosidase (β -Glu), and cellulose by cellulase (Cx), among others (Ren et al., 2020; Wang et al., 2024).

The monosaccharide composition was determined for the pectin-rich fractions: WSP, ISP and hemicellulose-rich fractions: LiCl-DMSO, KOH of two apple cultivars at ripening on the tree (T1-T4) and postharvest storage (T5-T7). An overview of the monosaccharide composition of the aforementioned fractions at T1-T7 terms is shown in SM Fig. 3, and the detailed course of changes in the content of individual monosaccharides is shown in Fig. 2 and Fig. 3. Differences in monosaccharide composition between cultivars are shown in SM Fig. 4. Additionally, the specific sugar ratio was calculated (SM Table 2).

The structure of the main components of the plant cell wall has been described previously by Pękala et al. (2023) and Szymańska-Chargot et al. (2024). Pectins are mainly composed of galacturonic acid, galactose, arabinose, and rhamnose (Kaczmarek et al., 2022, 2023; Zdunek et al., 2021), while hemicelluloses are composed of xylose, glucose, mannose, and also galactose (Gao et al., 2023). It is worth noting that the extracted plant cell wall polysaccharide fractions were not strictly pure and completely separated into specific polysaccharide groups. Namely, the obtained WSP and ISP fractions contained mainly pectins, and the LiCl-DMSO and KOH fractions contained mainly hemicelluloses, but may also contain some interposition of other plant polysaccharide groups. For example, the exaggerated presence of glucose may have originated from starch (Chen & Lahaye, 2021), which remained after the

isolation stage of the cell wall material. Above that, the glucose in the pectin fraction could have come from a negligible amount of hemicelluloses and cellulose. Furthermore, arabinose and galactose in the pectin and hemicellulose fractions could also have originated from arabinogalactan-proteins, which are present in the plant cell wall (Kutyryjeva-Nowak et al., 2023; Leszczuk et al., 2018).

Predictably, the WSP (SM Fig. 3 a,b) and ISP (SM Fig. 3 c,d) fractions consisted mainly of galacturonic acid, arabinose, galactose, rhamnose, and xylose. Glucose was also observed in these fractions, especially with high content in T1-T4. Theoretically, Glc is not present in the composition of pectin, while its presence especially in the T1-T4 probably came from starch, as it was not enzymatically removed from CWM. This is consistent with the result of the iodine test (SM Fig. 2), which showed the presence of starch at T1-T4.

The GalA content of the WSP fraction (Fig. 2.4 a) increased at ripening and storage terms, for Idared from 23 mol% (T1) to 45 mol% (T6), and for Pinova from 25 mol% (T1) to 38 mol% (T7). Also, Billy et al. (2008) showed an increase in galacturonic acid content during postharvest storage for Fuji apples. The increase in GalA during ripening and cold storage may have been related to the solubilization of tightly bound pectins in the plant cell wall and an increase in weakly bound, water-soluble pectins (Cybulska et al., 2015; Szymańska-Chargot et al., 2016; Zdunek et al., 2016). Also, an increase in the WSP fraction during postharvest fruit storage was shown in apples in the study by Lo Scalzo et al. (2005), in bananas by Duan et al. (2008), in blueberries by (Chen et al., 2015), among others. Subsequently, the levels of arabinose and galactose, the main neutral monosaccharides that occur in branch chains of pectin, were analyzed. Ara content increased during ripening and storage (Fig. 3.2a), and statistically significant differences were observed for T1 (9 mol%) and T7 (33 mol%) in the case of Idared, T1 (18 mol%) and T5 (32 %mol) for Pinova. Gal increased at T1-T4 (5–11 mol %) for Idared, while decreased for Pinova, and statistically significant differences were observed only between T2 and T7 (15–11 mol%) (Fig. 2.6a). Pinova had a higher Gal content, and the differences between varieties were statistically significant (SM Fig. 4 f). Significantly, Ng et al. (2015) reported that a high content of galactose and thus galactans was associated with reduced porosity of the plant cell wall, which might act as a hindrance to enzymes affecting cell wall loosening. Also, de Ornelas-Paz et al. (2018), showed a high correlation between galactose content and softening in Golden Delicious apples. Rha content increased with apple development, for Idared statistically significant differences were between T1, T2 (2 mol%), and T5 (6 mol%), and for Pinova T5 (3 mol%) and T7 (6 mol%) (Fig. 2.2a). Whereby, statistically significant differences were shown in the mean Rha content of WSP between cultivars (SM Fig. 4b). Interestingly, the ratio (1) (Eq. 1, SM Table 2) presenting the linearity of pectins was higher for the Idared than Pinova. The decrease in arabinose and galactose content could also reflect degradation of arabinogalactan polysaccharides and cleavage of branched pectin side chains during cold storage (Posé et al., 2019; Yashoda et al., 2005).

For ISP fractions, an increase in GalA was also observed (Fig. 2.4b), for Idared T1-T5 (34–57 mol%), and Pinova T1-T7 (30–37 mol%). There were statistically significant differences in GalA content between cultivars, where the GalA content in the ISP fraction was higher for Idared apples (SM Fig. 4 d). The Gal content of the ISP fraction decreased at storage terms, for Idared T1-T6, T7 (10–5 mol%), and for Pinova from T2 to T7 (15–12 mol%), indicating degradation of the side chains of the pectic polysaccharides. As in the WSP fraction, the ISP fraction also had a higher galactose content for Pinova (SM Fig. 4f). Furthermore, for the ISP fraction, there was a similar trend of changes in arabinose levels as for the WSP fraction. Also as above, the ratio (1) (Eq. 1) indicating the linearity of pectin was higher in Idared than in Pinova, while this was more noticeable in the ISP fraction than in the WSP fraction, especially at postharvest storage terms.

The presence of galacturonic acid, rhamnose, arabinose, and galactose indicated the presence of RG-I (Ng et al., 2015) in both the WSP and



Fig. 2. The changes in monosaccharide content (1: Man; 2: Rha; 3: GlcA; 4: GalA; 5: Glc; 6: Gal), during ripening on the tree (T1-T4) and post-harvest storage (T5-T7) of idared and pinova apples in polysaccharide fractions isolated from the plant cell wall of apples (a: WSP; b: ISP; c: LiCl-DMSO; d: KOH). Mannose (Man), rhamnose (Rha), glucuronic acid (GlcA), galacturonic acid (GalA), glucose (Glc), galactose (Gal), WSP – water-soluble pectins, ISP – imidazole-soluble pectins, LiCl-DMSO – LiCl-DMSO-soluble natively acetylated hemicelluloses, KOH – hemicelluloses soluble in high alkaline 4 M KOH solution. Kruskal Wallis ANOVA analysis was performed separately for each variety, fraction, and monosaccharide followed by multiple comparisons of mean ranks, with $p < 0,05$. A designation with the same letter indicates the absence of a statistically significant difference. Columns express the mean value of %mol and whiskers $\pm 0,95$ confidence interval.

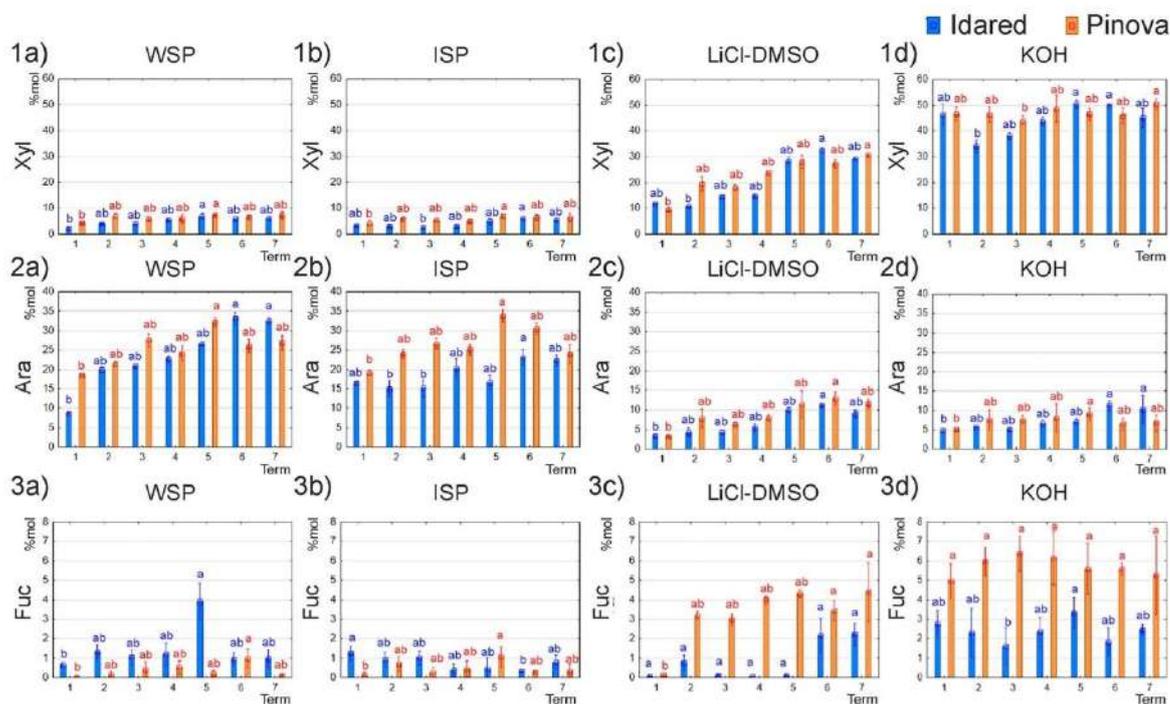


Fig. 3. The changes in monosaccharide content (1: Xyl; 2: Ara; 3: Fuc), during ripening on the tree (T1-T4) and post-harvest storage (T5-T7) of Idared and pinova apples in polysaccharide fractions isolated from the plant cell wall of apples (a: WSP; b: ISP; c: LiCl-DMSO; d: KOH). Xylose (Xyl), arabinose (Ara), fucose (Fuc), WSP – water-soluble pectins, ISP – imidazole-soluble pectins, LiCl-DMSO – LiCl-DMSO-soluble natively acetylated hemicelluloses, KOH – hemicelluloses soluble in high alkaline 4 M KOH solution. Kruskal Wallis ANOVA analysis was performed separately for each variety, fraction, and monosaccharide followed by multiple comparisons of mean ranks, with $p < 0,05$. A designation with the same letter indicates the absence of a statistically significant difference. Columns express the mean value of %mol and whiskers ± 0.95 confidence interval.

ISP fractions. The contribution of rhamnogalacturonans in the fraction of pectic polysaccharides was higher in the ISP fraction than in the WSP fraction, especially for the Pinova variety (ratio (2), Eq. 2, SM Table 2). Also, the higher content of arabinose and galactose relative to rhamnose (ratio(3), Eq. 3, SM Table 2) in the ISP fraction for Pinova, indicates the presence of RG-I with higher average side chain length compared with the ISP for Idared. Additionally, the presence of small amounts of xylose and the predominant galacturonic acid in these fractions may suggest the presence of xylogalacturonan (Zdunek et al., 2021).

Monosaccharide composition results for the LiCl-DMSO (SM Fig. 3e, f) and KOH (SM Fig. 3g,h) fractions confirmed the presence of hemicelluloses. The presence in the LiCl-DMSO fraction of xylose, glucose, galactose, and fucose could indicate the presence of fucogalactoxyloglucan; galactose, glucose, mannose, in turn, the presence of galactoglucomannan; xylose, arabinose, and glucuronic acid the presence of glucuronoarabinoxylan. Also, Ray et al. (2014) showed that LiCl-DMSO mainly extracted galactoglucomannan, fucogalactoxyloglucan, and glucuronoarabinoxylan from apples. KOH fraction contained mainly xylose, glucose, galactose, arabinose, and fucose. This composition may indicate the presence of mainly xyloglucans and arabinoxylans. A small amount of galacturonic acid was also recorded in the LiCl-DMSO and KOH fractions, indicating pectin residues. Starch-derived glucose was also overestimated in these fractions, especially at the T1-T4 dates, with a predominance in the LiCl-DMSO fraction while LiCl-DMSO dissolved the starch (Blohm & Heinze, 2019; Broxterman et al., 2018; Chen et al., 2022). Therefore, the analysis of glucose changes was omitted here.

For the LiCl-DMSO fraction, Xyl increased during ripening and storage (Fig. 3.1c), for Idared T2-T6 (11–32 mol%), and Pinova T1-T7 (9–31 %mol). Thus, the increase in xylose content may be identified

as an increase in xyloglucan content in this fraction with apple development (Szymanska-Chargot et al., 2015). Moreover, this was also confirmed by changes in the levels of monosaccharides, which are side chains of xyloglucans for which galactosylation and fucosylation can occur. Previously, Percy et al. (1997) also interpreted that the increase in xylose, fucose, and glucose, indicates the increase in the amount of xyloglucan during the early growth phase, during rapid cell expansion. Accordingly, the levels of Gal and Fuc, which are also found in fucogalactosylglucan, were analyzed. Gal increased for Idared from T1, T2 to T5 (6–11 mol%), and for Pinova from T1 to T6, T7 (6–16 mol%) (Fig. 2.6c). The Fuc levels only increased up to 4 mol% for Pinova T7 (Fig. 3.3c). In the case of the other main glucuronarabinoxylan component, namely arabinose, an increase in its level was also observed (Idared 3–9 mol%; Pinova 3–12 mol%) (Fig. 3.2c). The amounts of GlcA were minor and there was no change for Idared, while for Pinova, the GlcA content at T1 (1 mol%) was statistically different from T4 (3 %mol) (Fig. 2.3c). Man content increased at T2-T7 for Idared (8–23 mol%) and at T1-T6 for Pinova (7–17 mol%) (Fig. 2.1c), and the aforementioned increase in Gal content may indicate an increase in galactoglucomannan content during apple ripening and storage.

In the KOH fraction Xyl content was higher than in the LiCl-DMSO fraction (SM Fig. 3), indicating that more efficient extraction of xyloglucans occurs with KOH. Xyl content was statistically different between T2 (34 %mol) and T5, T6 (50 %mol) for Idared, and Pinova between T3 (44 mol%) and T7 (50 mol%) (Fig. 3.1d). However, the increase in Xyl in the KOH fraction is not clear, the graph is more indicative of the fluctuations of Xyl in the studied terms, in contrast to LiCl-DMSO. The Fuc content was higher in the KOH fraction (Fig. 3.3d) than in the LiCl-DMSO fraction (Fig. 3.3c). This implies that in KOH of apples, the

fucosylated xyloglucan content was very stable. In addition, the amount of Fuc in the KOH and LiCl-DMSO (SM Fig. 4i) fraction was statistically different between cultivars; a higher Fuc content was observed for Pinova apples. Similarly, for Man, no significant changes were observed at T1-T7 (Fig. 2.1d). Also, Gal content did not show a clear increase as for the LiCl-DMSO fraction, Gal was statistically different only for Idared at T1 and T4, and no change was observed for Pinova. Interestingly, the mannose/xylose ratio (ratio (4), Eq. 4, SM Table 2) was lower in the KOH fraction than in the LiCl-DMSO fraction, reflecting the lower contribution of glucomannans in the KOH fraction than in the LiCl-DMSO fraction.

3.3. Degree of acetylation

The DAC degree of acetylation of the pectin-rich polysaccharides of the WSP, ISP and hemicellulose-rich KOH fractions extracted from the CWM of Idared and Pinova apples is shown in SM Fig. 5, while for the LiCl-DMSO fraction is shown in Fig. 4.

The DAC of pectin-rich fractions (SM Fig. 5 a,b) did not show a specific trend of change during ripening (T1-T4) and postharvest storage (T5-T7) for Idared and Pinova cultivars. In the WSP fraction of Idared, the DAC increased from T1 (1.13 %) to T5 (3.06 %). In the case of Pinova, the highest DAC values were observed at T2 (2.30 %) and T5 (2.34 %), followed by a statistically significant decrease to about 1 % at T7. In the ISP fraction, the highest DAC occurred at T3 (2.91 %) for Idared, and no statistically significant changes were observed for Pinova. Generally, in the case of pectic polysaccharides, the DAC can occur for all members of pectic polysaccharides in the side chains sugars and can vary from around 3 % for *Centella asiatica* to even 58 % for okra (Li, Wang, et al., 2023). Pectin undergoes more methylation than acetylation. In the case of methylation, Lo Scalzo et al. (2005) showed an increase in the degree of pectin methylation during apple storage.

In general, hemicelluloses are isolated from the plant cell wall using an alkaline (Cheng et al., 2009). However, this extractant can alter the native structure of hemicelluloses by degradation of acetyl groups in

hemicelluloses. Therefore, Ray et al. (2014) proposed lithium chloride in dimethyl sulfoxide 8,4 % LiCl-DMSO as an extractant for natively acetylated hemicelluloses. Furthermore, in contrast to KOH, LiCl-DMSO extracts hemicelluloses weakly bound in the cell wall (Gautreau et al., 2022; Ray et al., 2014), probably with shorter polymer chains. Significantly, a clear trend of DAC changes with apple development was obtained for the hemicellulose-rich fractions extracted with LiCl-DMSO (Fig. 4). Namely, an increase in DAC of the hemicellulosic polysaccharides was shown during ripening and postharvest storage of apples and for Idared, DAC values were higher than for Pinova. For Idared, statistically significant differences were shown between T2 (3.24 %) and T7 (6.32 %), and for Pinova between T1 (1.60 %) and T7 (4.33 %). As expected, DAC results for the KOH fraction (SM Fig. 5c) were at trace levels, confirming that extraction with a highly alkaline extractant degrades the acetyl groups of the hemicelluloses. Generally, the DAC obtained for Idared polysaccharide fractions was higher than that of analogous Pinova fractions. In the case of hemicelluloses, the acetylation can occur both in the backbone and the side chains (Gille & Pauly, 2012). The backbone acetylation can influence hemicellulose conformation and hydrophobicity (Gille & Pauly, 2012). Moreover, the DAC of hemicelluloses can vary during the growth of the plant species, and generally, the more mature the plant organ the higher the DAC is. For example, in the case of glucomannan, the DAC is from 1 % to 25 %, while in the case of xylan, it is from 12 to 50 % (Li, Wang, et al., 2023).

3.4. PCA analysis of monosaccharide

PCA is an unsupervised method that can reveal the hidden structure within data sets leading to a visual representation of the relationships between samples and variables, their similarities and differences. Therefore, the two PCA analysis were conducted to find relations between the monosaccharide composition, firmness, apple cultivar, and sampling term. The PCA models were built on mean values. The scores plot allows different groups of samples to be recognized. Whereas, the correlation loadings show which data have the greatest influence on

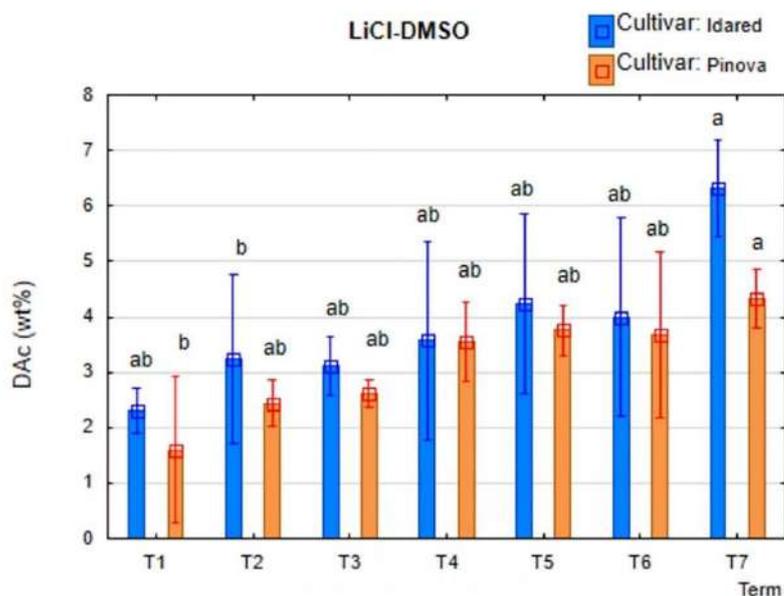


Fig. 4. The degree of acetylation (DAC) of LiCl-DMSO polysaccharide fraction (LiCl-DMSO soluble natively acetylated hemicelluloses) isolated from the cell wall of Idared and Pinova apples during fruit ripening and storage. DAC (WT%, weight%) = (mass of acetic acid/mass of polysaccharides in fraction) × 100 %. Kruskal Wallis ANOVA analysis was performed separately for each variety, followed by multiple comparisons of mean ranks. Results that did not have a significant difference were marked with the same letter, and differences with $p < 0,05$ were statistically different.

score grouping and also show a correlation between the variables. Generally, if a sample's score and the variable's loading on a particular PC have the same sign, the sample has higher than average value for that variable and vice-versa. The larger the scores and loadings, the stronger that relation. Moreover, the variables close to each other in the loadings plot will have a high positive correlation if the two components explain a large portion of the samples' variance. The same is true for variables in the same quadrant lying close to a straight line through the origin. At the same time, variables in diagonally opposed quadrants tend to be negatively correlated.

The first analysis was based on firmness, monosaccharide content (Figs. 2,3), acetylation degree (Fig. 4), and methylation degree (SM Table 3). The PC1 and PC2 together explain 80 % of the variability (Fig. 5a). Fig. 5 b presents the correlation loadings of each variable projected on PC1(58 %)xPC2(22 %). The PCA scores plots showed grouping according to sampling term and cultivar (Fig. 5 a). The Pinova scores were placed on the positive side of PC2 (except for PIN T1 lying close to the PC1 axis), while the Idared samples were on the negative side. Moreover, the sampling term was scattered along the PC1 axis – the T1-T4 on the positive side and T5-T7 on the negative. The ID T5-T7 formed separate group laying the furthest on the PC1. Generally, the Pinova samples formed a more dense group.

The correlation loadings plot showing the variables influencing the scores scattering is presented in Fig.5b. The F variable had the greatest impact on scores scattered along PC1 axis. The other correlation loadings having positive influence on both PC1 and PC2 are Gal_WSP, Gal_WSP, and Fuc_KOH. The variables which has a negative influence on scattering along PC1 axis, but a positive influence on scattering along PC2 axis were Ara content in all polysaccharide fractions, Xyl content in WSP, ISP, and LiCl-DMSO fractions, and also Gal, Man, and Fuc content in LiCl fraction and DAc of polysaccharides in KOH fractions. The DAc in LiCl-DMSO, GalA content, and DM of WSP polysaccharides had the most negative influence on scores scatter along PC1 axis (and PC2 \approx 0). The negative influence on scores scatter along both PC1 and PC2 had Rha content and DM of LiCl-DMSO and GalA content in the ISP fraction.

The second PCA analysis of firmness, sugar ratios (1–4) (Eq. 1–4), HG % (Eq. 5), RG% (Eq. 6), acetylation degree, and methylation degree was also performed (Fig. 6). The scores plot PC1(47 %)xPC2(33 %) showed grouping effect according to sampling term and cultivar (Fig. 6 a). The Pinova scores were placed on the positive side of PC1 and PC2 (except for PIN T1 and T2 lying close to the PC1 axis, but with PC2 < 0). The Idared samples were on the negative side of PC1, and scattered along PC2 axis - ID T1-T4 on the negative, and T5-T7 on the positive side of PC2.

The correlation loading plot (Fig.6b) showed that the most positive influence on scattering samples points along PC1 axis had F (with having negative influence on samples scattered along PC2) and molar percentage of rhamnogalacturonan (RG%, Eq. 6) in WSP and ISP, DAc of KOH fraction, and contribution of rhamnogalacturonan in pectins population in ISP (ratio(2), Eq. 2) (with having a positive influence on samples scattered along PC2). The negative influence on samples' scattering along PC1 axis had ratio (1) (Eq. 1) describing linearity of pectins in ISP fraction, the molar percentage of homogalacturonan (HG%, Eq. 5) in WSP and ISP fractions, and methylation and acetylation degree of polysaccharides in WSP and LiCl fractions. All those had a positive influence on scattering samples along PC2 axis. The variable which had negative influence on scattering samples along both PC1 and PC2 had the ratio (1) (Eq. 1) describing the linearity of pectins in WSP fraction. The variables such as the contribution of mannans in hemicellulose population, acetylation degree of WSP and ISP fractions, methylation degree of ISP and KOH fraction, or average side chain length of rhamnogalacturonan type I (ratio (3), Eq. 3) in WSP and ISP had lack of influence on samples scattering.

The correlation between F and other variables can also be noticed (Fig. 5a and 6a). Only the negative correlation for F variable with molar percentage of GalA and HG% (Eq. 5) in WSP and ISP, DAc of LiCl-DMSO,

DM of WSP and LiCl-DMSO, and molar percentage of Rha in LiCl-DMSO was observed.

3.5. The relationship between the cell wall composition and apple firmness

The correlation of selected factors of pectin-rich fractions (WSP, ISP) and hemicellulose-rich fractions (LiCl-DMSO, KOH) with apple firmness changes was studied. The results of the Spearman correlation coefficients were presented graphically using a heatmap matrix (Fig. 7). According to the legend shown, red indicates a high positive correlation, yellow - a weak/neutral correlation, and green - a high negative correlation. For all polysaccharide fractions, the following factors were selected in the correlation analysis with firmness: degree of acetylation DAC, degree of methylation DM, and monosaccharide content: mannose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, galactose, xylose, arabinose, fucose. In addition, for pectin-rich fractions (WSP, ISP), the effect of pectin linearity (ratio (1), Eq. 1), RG contribution (ratio (2), Eq. 2), average side chain length of rhamnogalacturonan type I (ratio (3), Eq. 3), the molar percentage of HG (HG%, Eq. 5) and RG-I (RG%, Eq. 6), and for hemicellulose-rich fractions (LiCl-DMSO, KOH) the contribution of mannan to hemicellulosic polysaccharides (ratio (4), Eq. 4) was also studied.

The statistically significant correlations of selected factors with firmness were mainly shown for Idared apples, while Pinova apples did not significantly lose firmness during ripening and post-harvest storage. Heatmaps for the pectin-rich WSP and ISP fractions are shown in (Fig. 7a) and (Fig. 7b), respectively. GalA content in both the WSP and ISP fractions was shown to correlate strongly negatively with firmness of the Idared apples (WSP, $r = -0,93$; ISP, $r = -0,82$). This confirmed earlier reports, including de Ormelas-Paz et al. (2018) for Golden Delicious apples showing an increase in GalA content with fruit development and ripening and a strong negative correlation with softening ($r = -0,95$). In addition, Billy et al. (2008) showed that GalA content of the water-soluble pectin fractions was the most important biochemical marker associated with texture change in Fuji apples. The contribution of RG to HG in the WSP fraction reported by the ratio (2) (Eq. 2) showed a statistically significant negative correlation with firmness in Idared and Pinova apples. However, correlation analysis showed no statistically significant relationship between the average side chain length of rhamnogalacturonan type I (ratio (3), Eq. 3) and the linearity of pectin (ratio (1), Eq. 1) with the firmness of apples. The literature reports that reduced RGI branching may affect cell wall loosening (Lahaye et al., 2020; Zdunek et al., 2014), as a result of decreased interaction of RGI side chains (arabinan and galactan) with cellulose (Zykwinska et al., 2005), and hemicellulose, which affects cell adhesion and porosity (Liu et al., 2023). However, according to our statistical tests, no statistically significant correlation of branching RGI with apple firmness was shown, similar to Buegy et al. (2021). On the other hand, arabinose and rhamnose correlated negatively with firmness in the Idared WSP (Ara, $r = -0,93$; Rha, $r = -0,82$), and Idared ISP (Ara, $r = -0,89$; Rha, $r = -0,86$) fractions. Only the galactose content of the ISP fraction of Idared apples showed a statistically positive correlation with firmness ($r = 0,82$). Studies Lahaye et al. (2013) also showed a positive correlation of galactose with firmness in tomatoes. Pinova, on the other hand, had a higher galactose content, which may be related to the higher content of galactan polysaccharides, whose higher content in the cell wall is associated with lower cell porosity, which in turn may hinder the access of enzymes affecting wall degradation (Ng et al., 2015). The molar percentage of HG (HG%, Eq. 5) correlated negatively with firmness in both WSP ($r = -0,93$) and ISP ($r = -0,79$) fractions of Idared. In comparison, the molar percentage of RGI (RG%, Eq. 5) correlated negatively with firmness ($r = -0,93$) only in the WSP fraction. This is a consequence of the higher content of linear pectin (ratio (1), Eq. 1) in the ISP fraction than in the WSP fraction, especially for Idared at storage terms (SM Table 2). Statistical tests for the pectin-rich fractions also considered their degree of acetylation and methylation. Only the degree

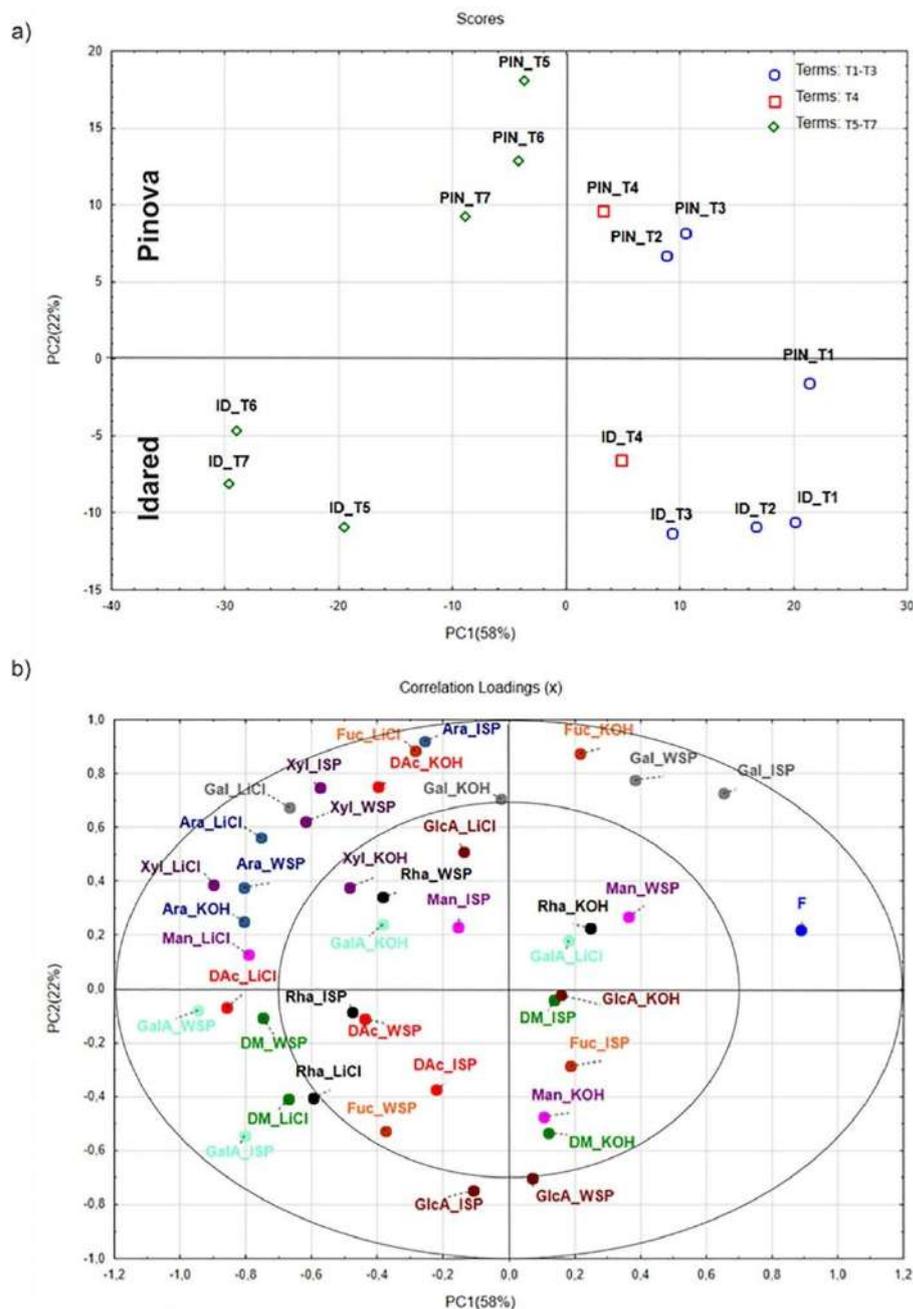


Fig. 5. The PCA scores grouped according to cultivar (ID or PIN) and sampling term/date (T1-T7) (a) and correlation loadings of variables projected on PC1 and PC2 axis (b). The outer ellipse in the correlation loadings plot is the unit-circle and indicates 100%100 % explained variance. The inner ellipse indicates 50%50 % of the explained variance. Abbreviations: mannose (Man), rhamnose (Rha), galactose (Gal), xylose (Xyl), arabinose (Ara), and fucose (Fuc) and uronic acids: glucuronic acid (GlcA) and galacturonic acid (GalA), degree of methylation (DM), and degree of acetylation (DAc) in WSP – water soluble pectins; ISP – imidazole soluble pectins; LiCl -LiCl-DMSO-soluble natively acetylated hemicelluloses; KOH – hemicelluloses soluble in high alkaline 4 M KOH solution; F – firmness.

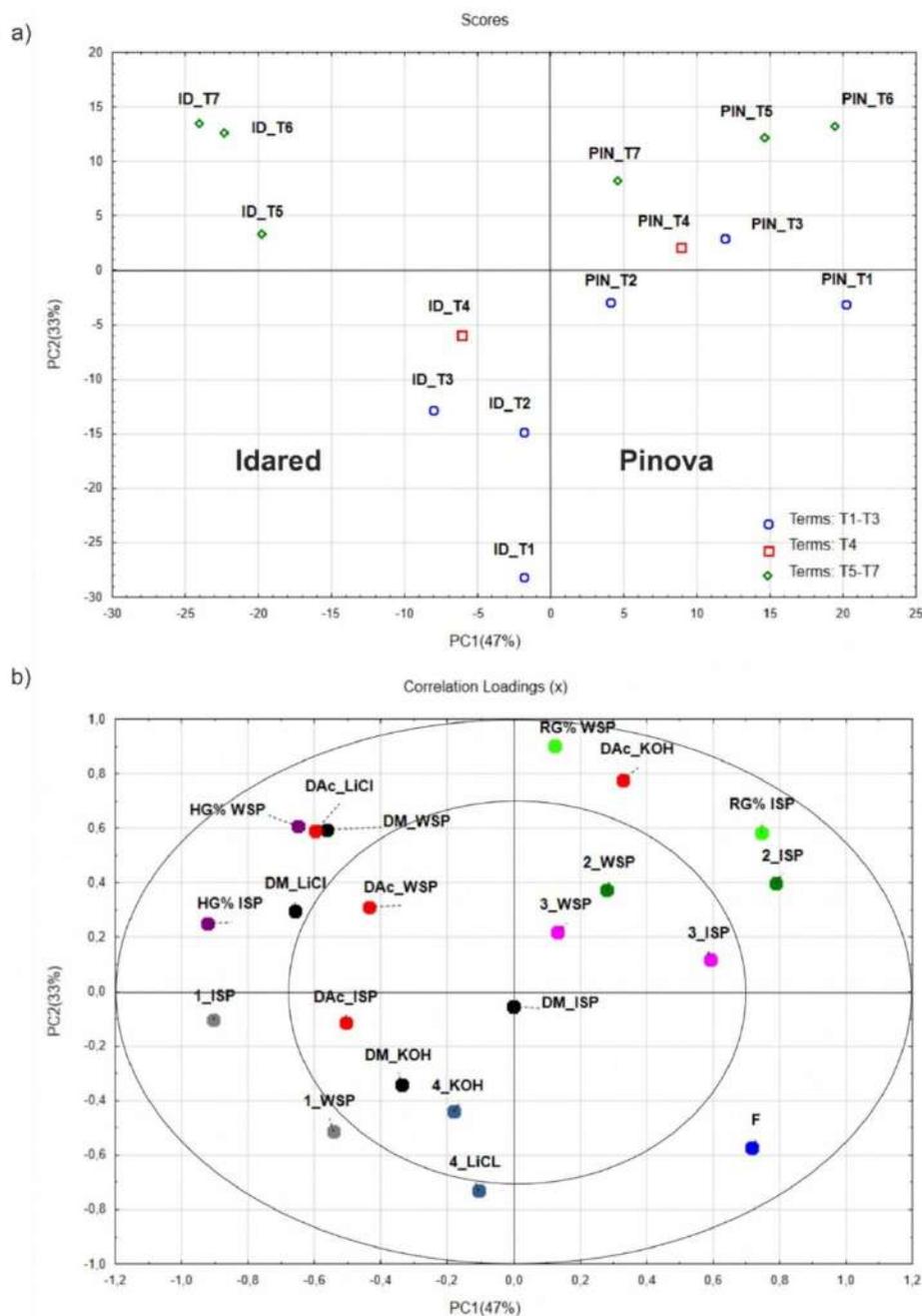


Fig. 6. The PCA scores grouped according to cultivar (ID or PIN) and sampling term (T1-T7) (a) and correlation loadings of variables (sugar ratios 1–4, HG%, RG%, DAC, DM, and firmness) projected on PC1 and PC2 axis (b). The outer ellipse in the correlation loadings plot is the unit-circle and indicates 100 % explained variance. The inner ellipse indicates 50 % of the explained variance. Abbreviation: sugar ratio from Eq.1. – (1); Eq.2. – (2); Eq.3. – (3); Eq.4. – (4); the molar percentage of HG (HG%); the molar percentage of RG type I (RG%); degree of methylation (DM); degree of acetylation (DAC) in _{WSP} – water soluble pectins; _{ISP} – imidazole soluble pectins; _{LiCl} -LiCl-DMSO-soluble natively acetylated hemicelluloses, _{KOH} – hemicelluloses soluble in high alkaline 4 M KOH solution, respectively; F – firmness.

of methylation showed a statistically significant negative correlation with firmness in the WSP fraction for Idared. Importantly, pectin showed a higher degree of methylation than acetylation (SM Table 3). The degree of methylation and the degree of acetylation of pectins affect the

physical and chemical properties of pectin and the complexity of the structural pectin network. Deesterification of pectins increases their ability to interact with calcium, forming calcium bridges between the carboxyl groups of pectin, thus forming ordered pectin networks called

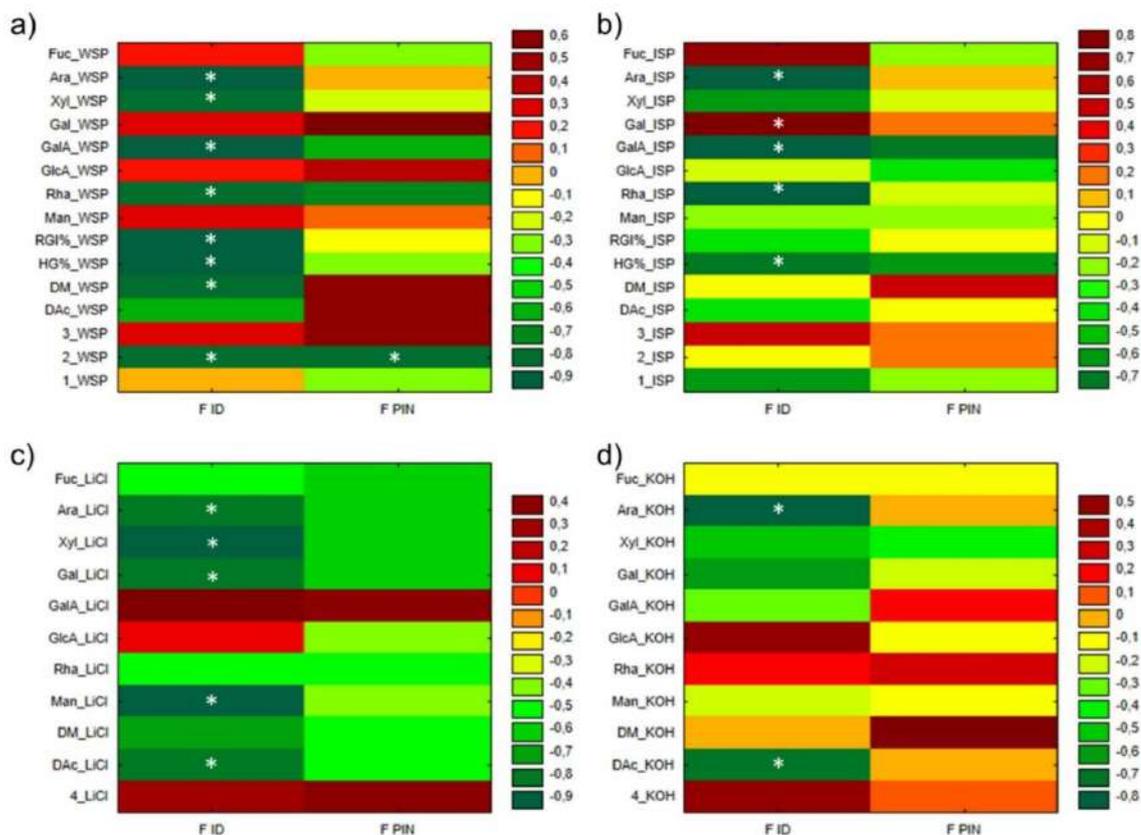


Fig. 7. The heat maps correspond to the correlation of selected factors with firmness (F) of idared (ID) and pinova (PIN) apples for the pectin-rich polysaccharide fractions: (a) WSP – water-soluble pectins, (b) ISP – imidazole-soluble pectins and hemicellulose-rich fractions; (c) LiCl-DMSO – LiCl-DMSO-soluble natively acetylated hemicelluloses, (d) KOH – hemicelluloses soluble in high alkaline 4 M KOH solution. The colours correspond to Spearman's coefficients as indicated in the legends, * $P < 0.05$. The correlation coefficient and p -value were obtained using Spearman correlation analysis, where the correlation of the mean firmness of the apples at the respective term was tested. Abbreviations: mannose (Man), rhamnose (Rha), galactose (Gal), xylose (Xyl), arabinose (Ara), and fucose (Fuc) and uronic acids: glucuronic acid (GlcA) and galacturonic acid (GalA); sugar ratio from Eq.1. – (1); Eq.2. – (2); Eq.3. – (3); Eq.4. – (4); the molar percentage of HG (HG%); the molar percentage of RG type I (RG%); degree of methylation (DM), and degree of acetylation (DAc) in each polysaccharide fraction.

egg-box structures (Cao et al., 2020; Goulao, 2010). Furthermore, Huang et al. (2023) showed that the pectin networks of the egg-box structure were correlated with an increase in firmness.

Many studies report that pectin significantly affects the fruit texture, and thus its degradation is a key factor in tissue softening (Prasanna et al., 2007; Wang et al., 2018). Whereas the content of hemicelluloses and cellulose is also important (Li, Wang, et al., 2023) but still not sufficiently studied. Therefore, our study also investigated the correlation of selected traits and composition of hemicelluloses with apple firmness. Heatmaps for the hemicellulose-rich LiCl-DMSO and KOH fractions are shown in (Fig. 7c) and (Fig. 7d), respectively. The LiCl-DMSO fraction is rich in natively acetylated hemicelluloses such as fucogalactoxyloglucan, galactoglucomannan, glucuronoarabinoxylan while the KOH fraction is mainly xyloglucans. Results for the LiCl-DMSO fraction showed a negative correlation of firmness with mannose, galactose, xylose, arabinose for Idared (Man, $r = -0.93$; Gal, $r = -0.89$; Xyl, $r = -0.96$; Ara, $r = -0.86$). The fucose content of the hemicelluloses of the LiCl-DMSO fraction differed significantly between cultivars (SM, Fig. 4.), while no correlation of fucose with firmness was shown.

Also, Cheng et al. (2009) showed an increase in mannose at different

ripening stages of banana fruit but in the 4 M KOH fraction, whereas in the fraction of hemicelluloses extracted with 1 M KOH they recorded only subtle fluctuations in changes in xylose and mannose content. Furthermore, for the LiCl-DMSO fraction, a strong negative correlation of the degree of acetylation with firmness was shown for Idared apples ($r = -0.86$). Our previous studies of the adsorption of selected hemicelluloses and pectins on microfibrillar cellulose showed high adsorption of glucomannan, β -D-glucan, xyloglucan, and xylan, highlighting the particularly high affinity of linear glucomannan for cellulose (Szymańska-Chargot et al., 2024). Hence, the decoration with acetyl groups, and the side-branching of the hemicelluloses may constitute a steric hindrance to interactions with other polysaccharides of the plant cell wall and thus, together with other factors, influence its loosening and consequent loss of firmness. In contrast, in the case of pectin, Liu et al. (2023) reported that higher levels of branched RG-I influenced increased cell adhesion and reduced cell wall porosity, thereby maintaining tomato firmness. Therefore, the neutral monosaccharides in the side branches of pectin are mainly involved in the interactions with cellulose (Zykwinska et al., 2005).

The heat map of the KOH fraction (Fig. 7 d) showed a statistically

significant negative correlation of firmness with the content of Ara and DAc for Idared. On the other hand, as mentioned above, this is a fraction of hemicelluloses significantly deacetylated by the strongly alkaline extractant 4 M KOH, so the effect of acetylation should not be considered in this group.

4. Conclusions

In summary, the firmness values of both apple varieties, Idared and Pinova, were similar at the ripening terms on the tree (T1-T4), while decreased significantly during three-month postharvest cold storage (T5-T7) for the Idared variety. In contrast for the Pinova apples firmness remained at a similar level through all terms. Generally, fruit softening is attributed to changes in the cell wall, so our study analyzed changes in the composition of monosaccharides and the content of an important element of polysaccharide structure like acetyl groups, expressed by the degree of acetylation. Above that, a statistical correlation analysis of these factors with the firmness of apples was performed to highlight which could affect the loss of firmness of Idared during postharvest storage.

The monosaccharide characterization of each cell wall fraction: WSP, ISP, LiCl-DMSO, and KOH was conducted showing the tendencies in monosaccharide composition during ripening and postharvest storage. The increase in GalA and Ara content of Idared WSP fraction was observed, while in the case of Pinova WSP fraction, the changes of GalA and Ara faced less dynamism. Whereas Gal content of WSP Idared was smaller than in the case of Pinova WSP and decreased during postharvest storage. In the other pectic fraction, ISP the GalA content was higher for Idared than for Pinova, and reversely Ara and Gal content was lower for Idared than for Pinova in this fraction. Therefore, for Idared the WSP and ISP fractions showed higher linearity of pectin than for Pinova. A higher contribution of rhamnogalacturonans was shown in the WSP fraction and especially in the ISP for the Pinova variety. In the case of hemicellulosic fractions LiCl-DMSO and KOH the greatest differences were in Man and Xyl content. The content of Man and Xyl, so mannans and xyloglucans increased for LiCl-DMSO, especially for the Idared cultivar. Moreover, the contribution of mannans to the hemicellulose fraction was higher for LiCl-DMSO than for KOH for both cultivars. The Xyl content was particularly high for the KOH fraction and showed no significant change during ripening and storage for both varieties.

Importantly, an increase in the degree of acetylation of natively acetylated hemicelluloses of the LiCl-DMSO fraction was observed during ripening on the tree and postharvest cold storage, with higher values for Idared apples. In contrast, no specific trend of changes in the degree of acetylation of the pectin-rich fraction of WSP and ISP was observed. In summary, together with the composition of monosaccharides, the content of acetylated hemicelluloses increased during ripening on the tree and post-harvest storage of apples.

It is also worth emphasizing that statistically significant strong negative correlations with firmness were observed for the degree of acetylation (DAc) and the contents of mannose, galactose, xylose, arabinose, and fucose in the polysaccharides of the hemicellulose-rich fraction LiCl-DMSO only for the Idared cultivar. Hence, it can be assumed that the increase in the degree of acetylation and the content of acetylated hemicelluloses, among other factors, also affected the softening of Idared apples during storage. Pectin-rich fractions also showed some correlations with the loss of firmness of Idared apples. Most significantly, the WSP fraction showed a negative correlation of GalA content, the contribution of rhamnogalacturonans (ratio(2)), degree of methylation (DM), while the ISP fraction showed a positive correlation of Gal with firmness of Idared apples. Knowledge of the plant cell wall structure, and more specifically the changes that occur in the structure of its components, can be used to improve the quality control parameters of storage fruit as well as in food processing.

CRediT authorship contribution statement

Patrycja Pękala: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Monika Szymańska-Chargot:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Justyna Cybulska:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Artur Zdunek:** Writing – review & editing.

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.

Acknowledgment

This research was funded in whole or in part by National Science Center-Poland projects nr NCN PRELUDIUM BIS UMO-2020/39/B/NZ9/00241 (PI M. Szymańska-Chargot).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.142639>.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A., & Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, *97*(2). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>
- Aprèa, E., Charles, M., Endrizzi, I., Laura Corollaro, M., Betta, E., Biasioli, F., & Gasperi, F. (2017). Sweet taste in apple: The role of sorbitol, individual sugars, organic acids and volatile compounds. *Scientific Reports*, *7*. <https://doi.org/10.1038/srep49950>
- Billy, L., Mehinić, E., Royer, G., Renard, C. M. G. C., Arvisenet, G., Prost, C., & Jourjon, F. (2008). Relationship between texture and pectin composition of two apple cultivars during storage. *Postharvest Biology and Technology*, *47*(3). <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.07.011>
- Blohm, S., & Heinze, T. (2019). Synthesis and properties of thermoplastic starch laurates. *Carbohydrate Research*, *486*. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107833>
- Bonnin, E., & Lahaye, M. (2013). Contribution of cell wall modifying enzymes to the texture of fleshy fruits. The example of apple. *Journal of the Serbian Chemical Society*, *78*(3). <https://doi.org/10.2298/JSC121123004B>
- Brahem, M., Renard, C. M. G. C., Gouble, B., Bureau, S., & le Bourvellec, C. (2017). Characterization of tissue specific differences in cell wall polysaccharides of ripe and overripe pear fruit. *Carbohydrate Polymers*, *156*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.019>
- Broxterman, S. E., Picouet, P., & Schols, H. A. (2017). Acetylated pectins in raw and heat processed carrots. *Carbohydrate Polymers*, *177*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.118>
- Broxterman, S. E., van Erven, G., & Schols, H. A. (2018). The solubility of primary plant cell wall polysaccharides in LiCl-DMSO. *Carbohydrate Polymers*, *200*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.083>
- Buergy, A., Rolland-Sabaté, A., Leça, A., & Renard, C. M. G. C. (2021). Apple puree's texture is independent from fruit firmness. *LWT*, *145*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111324>
- Cao, L., Lu, W., Mata, A., Nishinari, K., & Fang, Y. (2020). Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. *In Carbohydrate Polymers* (Vol. 242). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116389>
- Chen, H., Cao, S., Fang, X., Mu, H., Yang, H., Wang, X., Xu, Q., & Gao, H. (2015). Changes in fruit firmness, cell wall composition and cell wall degrading enzymes in postharvest blueberries during storage. *Scientia Horticulturae*, *188*. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.018>
- Chen, M., & Lahaye, M. (2021). Natural deep eutectic solvents pretreatment as an aid for pectin extraction from apple pomace. *Food Hydrocolloids*, *115*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106601>

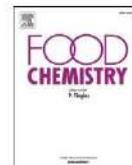
- Chen, M., Mac Béar, J., Ropartz, D., & Lahaye, M. (2022). Biorefinery of apple pomace: New insights into xyloglucan building blocks. *Carbohydrate Polymers*, 290. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119526>
- Cheng, G., Duan, X., Jiang, Y., Sun, J., Yang, S., Yang, B., He, S., Liang, H., & Luo, Y. (2009). Modification of hemicellulose polysaccharides during ripening of postharvest banana fruit. *Food Chemistry*, 115(1). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.065>
- Chylińska, M., Szymańska-Chargot, M., Deryło, K., Tchorzewska, D., & Zdunek, A. (2017). Changing of biochemical parameters and cell wall polysaccharides distribution during physiological development of tomato fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 119. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.09.010>
- 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., & Koziol, A. (2015). The self-assembled network and physiological degradation of pectins in carrot cell walls. *Food Hydrocolloids*, 43. <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). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.103>
- Dheilly, E., le Gall, S., Guillou, M. C., Renou, J. P., Boumin, E., Orsel, M., & Lahaye, M. (2016). Cell wall dynamics during apple development and storage involves hemicellulose modifications and related expressed genes. *BMC Plant Biology*, 16(11). <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0887-0>
- Doerflinger, F. C., Miller, W. B., Nock, J. F., & Watkins, C. B. (2015). Relationships between starch pattern indices and starch concentrations in four apple cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 110. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.012>
- Duan, X., Cheng, G., Yang, E., Yi, C., Ruenroengklin, N., Lu, W., Luo, Y., & Jiang, Y. (2008). Modification of pectin polysaccharides during ripening of postharvest banana fruit. *Food Chemistry*, 111(1). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.049>
- E-Sadownictwo. (2024, September 9). <https://www.e-sadownictwo.pl/artykuly/porady/komunikaty-sadownictwa/14532-prawidlowe-wyznaczenie-terminu-zbioru-jablek>
- Fry, S. C. (2010). Cell wall polysaccharide composition and covalent crosslinking. In *Annual Plant Reviews, Plant Polysaccharides: Biosynthesis and Bioengineering* (Vol. 41). <https://doi.org/10.1002/9781444391015.ch1>
- Gao, Y., Guo, M., Wang, D., Zhao, D., & Wang, M. (2023). Advances in extraction, purification, structural characteristics and biological activities of hemicelluloses: A review. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 225). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.099>
- Gautreau, M., Durand, S., Paturel, A., le Gall, S., Foucat, L., Falourd, X., ... Beaugrand, J. (2022). Impact of cell wall non-cellulosic and cellulose polymers on the mechanical properties of flax fibre bundles. *Carbohydrate Polymers*, 291. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119599>
- Gille, S., & Pauly, M. (2012). O-acetylation of plant cell wall polysaccharides. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 3). <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00012>, Issue JAN.
- Goulaio, L. F. (2010). Pectin de-esterification and fruit softening: Revisiting a classical hypothesis. *Stewart Postharvest Review*, 6(1). <https://doi.org/10.2212/spr.2010.1.7>
- 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). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.04.014>
- Huang, W., Shi, Y., Yan, H., Wang, H., Wu, D., Grierson, D., & Chen, K. (2023). The calcium mediated homogalacturonan pectin complexation in cell walls contributes the firmness increase in loquat fruit during postharvest storage. *Journal of Advanced Research*, 49. <https://doi.org/10.1016/j.jarc.2022.09.009>
- Janfar, Z., Mazou, K., Boissière, A., le Gall, S., Villares, A., Vigonroux, J., Beury, N., Moreau, C., Lahaye, M., & Cathala, B. (2019). Meaning of xylan acetylation on xylan-cellulose interactions: A quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) and molecular dynamic study. *Carbohydrate Polymers*, 226. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115315>
- Jaeger, S. R., Antúnez, L., Ares, G., Swaeney-Stueve, M., Jin, D., & Harker, F. R. (2018). Quality perceptions regarding external appearance of apples: Insights from experts and consumers in four countries. *Postharvest Biology and Technology*, 146. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.08.014>
- Kaczmarek, A., Pieczywek, P. M., Cybulska, J., Cieśla, J., & Zdunek, A. (2024). Structural and rheological properties of diluted alkali soluble pectin from apple and carrot. *Food Chemistry*, 446. <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. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 278). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118909>
- Kaczmarek, A., Pieczywek, P. M., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2023). A mini-review on the plant sources and methods for extraction of rhamnogalacturonan I. In *Food Chemistry* (Vol. 403). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134378>
- Kutyrieva-Nowak, N., Leszczuk, A., Zając, A., Kalaitzis, P., & Zdunek, A. (2023). Arabinogalactan protein is a molecular and cytological marker of particular stages of the tomato fruit ripening process. *Scientia Horticulturae*, 310. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111718>
- Lahaye, M., Devaux, M. F., Poole, M., Seymour, G. B., & Causse, M. (2013). Pericarp tissue microstructure and cell wall polysaccharide chemistry are differently affected in lines of tomato with contrasted firmness. *Postharvest Biology and Technology*, 76. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.09.009>
- Lahaye, M., Falourd, X., Laillet, B., & Le Gall, S. (2020). Cellulose, pectin and water in cell walls determine apple flesh viscoelastic mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 232. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115768>
- Leszczuk, A., Chylińska, M., & Zdunek, A. (2019). Enzymes and vitamin C as factors influencing the presence of arabinogalactan proteins (AGPs) in *Solanum lycopersicum* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.035>
- Leszczuk, A., Chylińska, M., Zięba, E., Skrzypek, T., Szczuka, E., & Zdunek, A. (2018). Structural network of arabinogalactan proteins (AGPs) and pectins in apple fruit during ripening and senescence processes. *Plant Science*, 275. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.07.019>
- 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). [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00015-2)
- Li, H., Wang, Y., Zhao, P., Guo, L., Huang, L., Li, X., & Gao, W. (2023). Naturally and chemically acetylated polysaccharides: Structural characteristics, synthesis, activities, and applications in the delivery system: A review. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 313). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120746>
- Liu, D., Zhou, W., Zhong, Y., Xie, X., Liu, H., Huang, H., Wang, Q., & Xiao, G. (2023). Involvement of branched RG-I pectin with hemicellulose in cell-cell adhesion of tomato during fruit softening. *Food Chemistry*, 413. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135574>
- Lo Scalzo, R., Forni, E., Lupi, D., Gindetti, G., & Testoni, A. (2005). Changes of pectic composition of 'Annurca' apple fruit after storage. *Food Chemistry*, 93(3). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.033>
- McCann, M. C., & Knox, J. P. (2010). Plant cell wall biology: Polysaccharides in architectural and developmental contexts. In *Annual Plant Reviews, Plant Polysaccharides: Biosynthesis and Bioengineering* (Vol. 41). <https://doi.org/10.1002/9781444391015.ch14>
- 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). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.09.014>
- Ng, J. K. T., Schröder, R., Brummell, D. A., Sutherland, P. W., Hallett, L. C., Smith, B. G., ... Johnston, J. W. (2015). Lower cell wall pectin solubilisation and galactose loss during early fruit development in apple (*Malus x domestica*) cultivar 'Scifresh' are associated with slower softening rate. *Journal of Plant Physiology*, 176. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.12.012>
- Ng, J. K. T., Zujovic, Z. D., Smith, B. G., Johnston, J. W., Schröder, R., & Melton, L. D. (2014). Solid-state ¹³C NMR study of the mobility of polysaccharides in the cell walls of two apple cultivars of different firmness. *Carbohydrate Research*, 386(1). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.12.019>
- de Ornelas-Paz, J. J., Quintana-Gallegos, B. M., Escalante-Minakata, P., Reyes-Hernández, J., Pérez-Martínez, J. D., Ríos-Velasco, C., & Ruiz-Cruz, S. (2018). Relationship between the firmness of golden delicious apples and the physicochemical characteristics of the fruits and their pectin during development and ripening. *Journal of Food Science and Technology*, 55(1). <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2758-6>
- Pauly, M., & Ramírez, V. (2018). New insights into wall polysaccharide o-acetylation. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01210>
- Peirs, A., Scheerlinck, N., Perez, A. B., Jancsó, P., & Nicolai, B. M. (2002). Uncertainty analysis and modelling of the starch index during apple fruit maturation. *Postharvest Biology and Technology*, 26(2). [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00038-8)
- Pekala, P., Szymańska-Chargot, M., & Zdunek, A. (2023). Interactions between non-cellulosic plant cell wall polysaccharides and cellulose emerging from adsorption studies. *Cellulose*, 30(15). <https://doi.org/10.1007/s10570-023-05442-y>
- Percy, A. E., Melton, L. D., & Jameson, P. E. (1997). Xyloglucan and hemicelluloses in the cell wall during apple fruit development and ripening. *Plant Science*, 125(1). [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)04618-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)04618-9)
- Posé, S., Paniagua, C., Matas, A. J., Gunning, A. P., Morris, V. J., Quesada, M. A., & Mercado, J. A. (2019). A nanostructural view of the cell wall disassembly process during fruit ripening and postharvest storage by atomic force microscopy. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 87). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.011>
- Prasanna, V., Prabha, T. N., & Tharanathan, R. N. (2007). Fruit ripening phenomena—an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1). <https://doi.org/10.1080/10408390600976841>
- Ray, S., Vigonroux, J., Quémenner, B., Bonnin, E., & Lahaye, M. (2014). Novel and diverse fine structures in LiCl-DMSO extracted apple hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 108(1). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.017>
- Ren, Y., Sun, Y., Peng, P., Wang, X. X., & Zhu, Z. Y. (2020). Degradation of cell wall polysaccharides and change of related enzyme activities with fruit softening in *Annona squamosa* during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 166. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111203>
- Renard, C. M. G. C. (2005). Variability in cell wall preparations: Quantification and comparison of common methods. *Carbohydrate Polymers*, 60(4). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.03.002>
- Reyes, F., & Orellana, A. (2008). Golgi transporters: Opening the gate to cell wall polysaccharide biosynthesis. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 11(3)). <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2008.03.008>, issue.
- Rutkowski, K. P., Michalczyk, B., & Konopacki, P. (2008). Nondestructive determination of 'golden delicious' apple quality and harvest maturity. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 16.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>

- Shahin, L., Zhang, L., Mohnen, D., & Urbanowicz, B. R. (2023). Insights into pectin O-acetylation in the plant cell wall: Structure, synthesis, and modification. *In The Cell Surface* (Vol. 9). <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2023.100099>
- Shiga, T. M., Soares, C. A., Nascimento, J. R., Purgatto, E., Lajolo, F. M., & Cordenunsi, B. R. (2011). Ripening-associated changes in the amounts of starch and non-starch polysaccharides and their contributions to fruit softening in three banana cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(8). <https://doi.org/10.1002/jsfa.4342>
- Skic, A., Szymańska-Chargot, M., Kruk, B., Chylińska, M., Pieczywek, P. M., Kurenda, A., ... Rutkowski, K. P. (2016). Determination of the optimum harvest window for apples using the non-destructive biospeckle method. *Sensors (Switzerland)*, 16(5). <https://doi.org/10.3390/s16050661>
- Sørensen, I., & Willats, W. G. T. (2011). Screening and characterization of plant cell walls using carbohydrate microarrays. *In Methods in Molecular Biology* (Vol. 715). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-008-9_8
- Su, Q., Li, X., Wang, L., Wang, B., Feng, Y., Yang, H., & Zhao, Z. (2022). Variation in cell wall metabolism and flesh firmness of four apple cultivars during fruit development. *Foods*, 11(21). <https://doi.org/10.3390/foods11213518>
- Szymańska-Chargot, M., Adamiak, A., & Zdunek, A. (2012). Pre-harvest monitoring of apple fruits development with the use of biospeckle method. *Scientia Horticulturae*, 145. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.07.024>
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Kruk, B., & Zdunek, A. (2015). Combining FT-IR spectroscopy and multivariate analysis for qualitative and quantitative analysis of the cell wall composition changes during apples development. *Carbohydrate Polymers*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.039>
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Pieczywek, P. M., Rösch, P., Schmitt, M., Popp, J., & Zdunek, A. (2016). Raman imaging of changes in the polysaccharides distribution in the cell wall during apple fruit development and senescence. *Planta*, 243(4). <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2456-4>
- Szymańska-Chargot, M., Pękala, P., Myśliwiec, D., Cieśla, J., Pieczywek, P. M., Siemińska-Kuczer, A., & Zdunek, A. (2024). A study of the properties of hemicelluloses adsorbed onto microfibrillar cellulose isolated from apple parenchyma. *Food Chemistry*, 430. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137116>
- Szymańska-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). <https://doi.org/10.1007/s11483-012-9279-7>
- Wang, D., Yeats, T. H., Ulitskii, S., Rose, J. K. C., & Seymour, G. B. (2018). Fruit softening: Revisiting the role of pectin. *In Trends in Plant Science* (Vol. 23)(4). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.01.006>. issue.
- Wang, F., Zhao, C., Yang, H., Jiang, H., Li, L., & Yang, G. (2022). Non-destructive and in-site estimation of apple quality and maturity by hyperspectral imaging. *Computers and Electronics in Agriculture*, 195. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2022.106843>
- Wang, Y., Niu, Y., Ye, L., Shi, Y., & Luo, A. (2024). Transcriptomic analysis reveals ozone treatment delays kiwifruit postharvest softening by modulating cell wall metabolism. *Journal of Food Science*, 89(4). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16979>
- Yashoda, H. M., Prabha, T. N., & Tharamathan, R. N. (2005). Mango ripening - chemical and structural characterization of pectic and hemicellulosic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 340(7). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.03.004>
- Zdunek, A., Konopacka, D., & Jesionkowska, K. (2010). Crispness and crunchiness judgment of apples based on contact acoustic emission. *Journal of Texture Studies*, 41(1). <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2009.00214.x>
- Zdunek, A., Koziol, A., Cybulska, J., Lekka, M., & Pieczywek, P. M. (2016). The stiffening of the cell walls observed during physiological softening of pears. *Planta*, 243(2). <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2423-0>
- 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). <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). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12689>
- Zhang, B., Zhang, M., Shen, M., Li, H., Zhang, Z., Zhang, H., Zhou, Z., Ren, X., Ding, Y., Xing, L., & Zhao, J. (2021). Quality monitoring method for apples of different maturity under long-term cold storage. *Infrared Physics and Technology*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2020.103580>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.071>
- Zielinska, S., Cybulska, J., Pieczywek, P., Zdunek, A., Kurzyńska-Szklarek, M., Staniszevska, I., ... Zielinska, M. (2022). Structural morphology and rheological properties of pectin fractions extracted from okra pods subjected to cold plasma treatment. *Food and Bioprocess Technology*, 15(5). <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02798-0>
- 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. *In Plant Physiology*, 139(1). <https://doi.org/10.1104/pp.105.065912>. issue.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

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

Corrigendum

Corrigendum to “Monosaccharide composition and degree of acetylation of non-cellulosic cell wall polysaccharides and their relationship to apple firmness” [Food Chem. 470 (2025) 142639]

Patrycja Pękala, Monika Szymańska-Chargot^{*}, Justyna Cybulska, Artur Zdunek

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

The published article contained an error regarding the number of the project that provided financial support for the research. Acknowledgements should be directed to project no. NCN PRELUDIUM BIS UMO-2020/39/O/NZ9/00241 (PI M. Szymańska-Chargot) of the National

Science Centre in Poland, and not, as stated, to project no. NCN PRELUDIUM BIS UMO-2020/39/B/NZ9/00241.

The authors would like to apologise for any inconvenience caused.

DOI of original article: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.142639>.

^{*} Corresponding author at: Institute of Agrophysics PAS, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27, Poland.

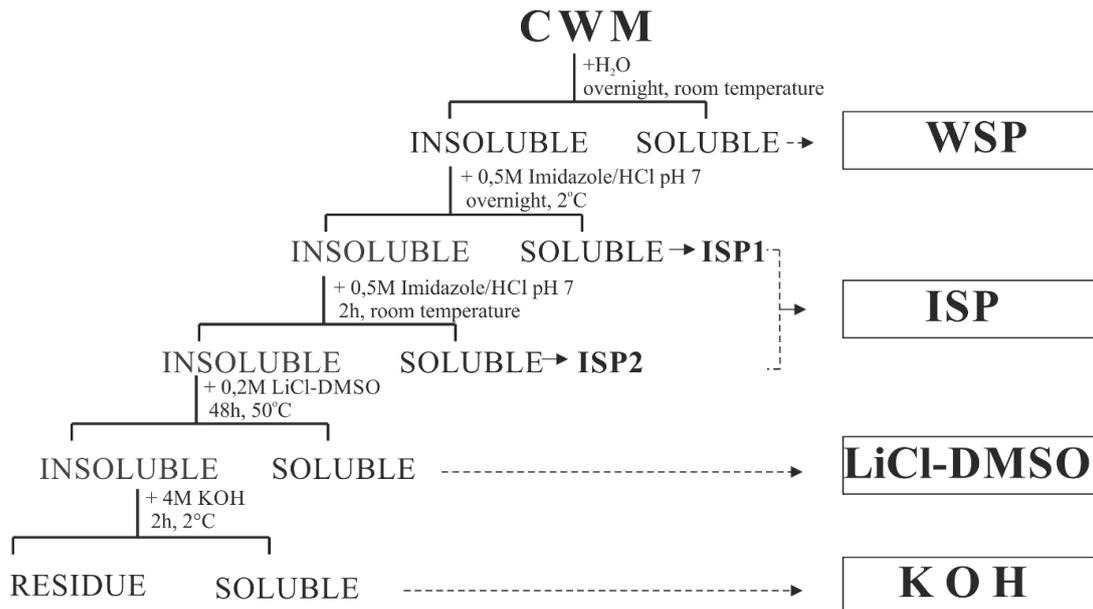
E-mail addresses: p.pekala@ipan.lublin.pl (P. Pękala), m.szymanska@ipan.lublin.pl (M. Szymańska-Chargot), j.cybulska@ipan.lublin.pl (J. Cybulska), a.zdunek@ipan.lublin.pl (A. Zdunek).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.146377>

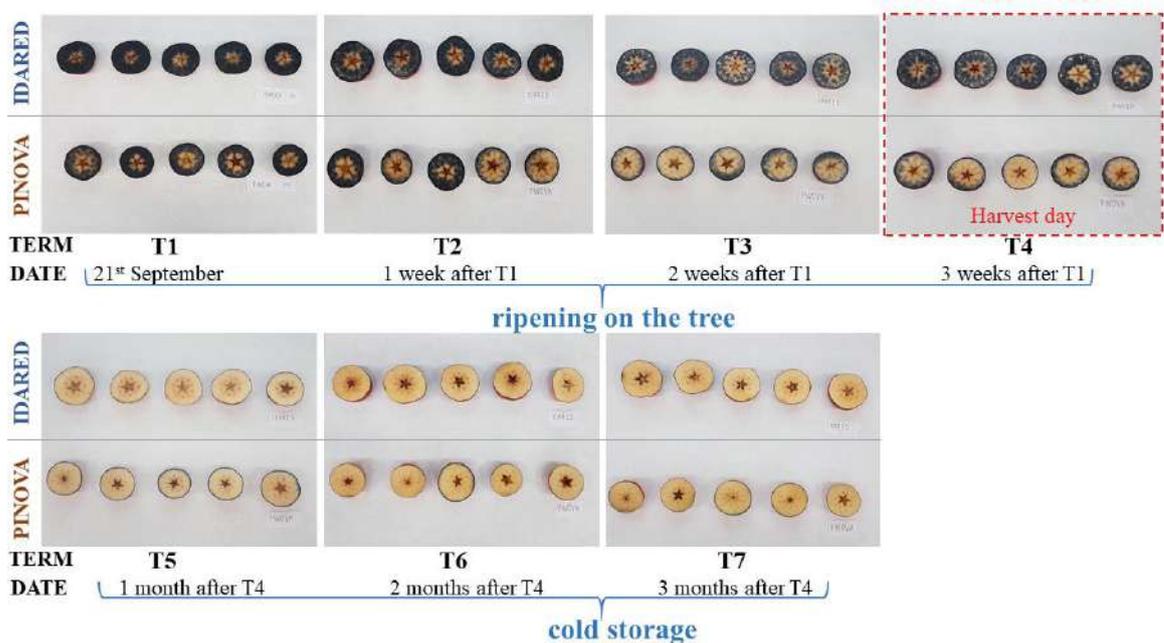
0308-8146/© 2025 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Please cite this article as: Patrycja Pękala et al., *Food Chemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.146377>

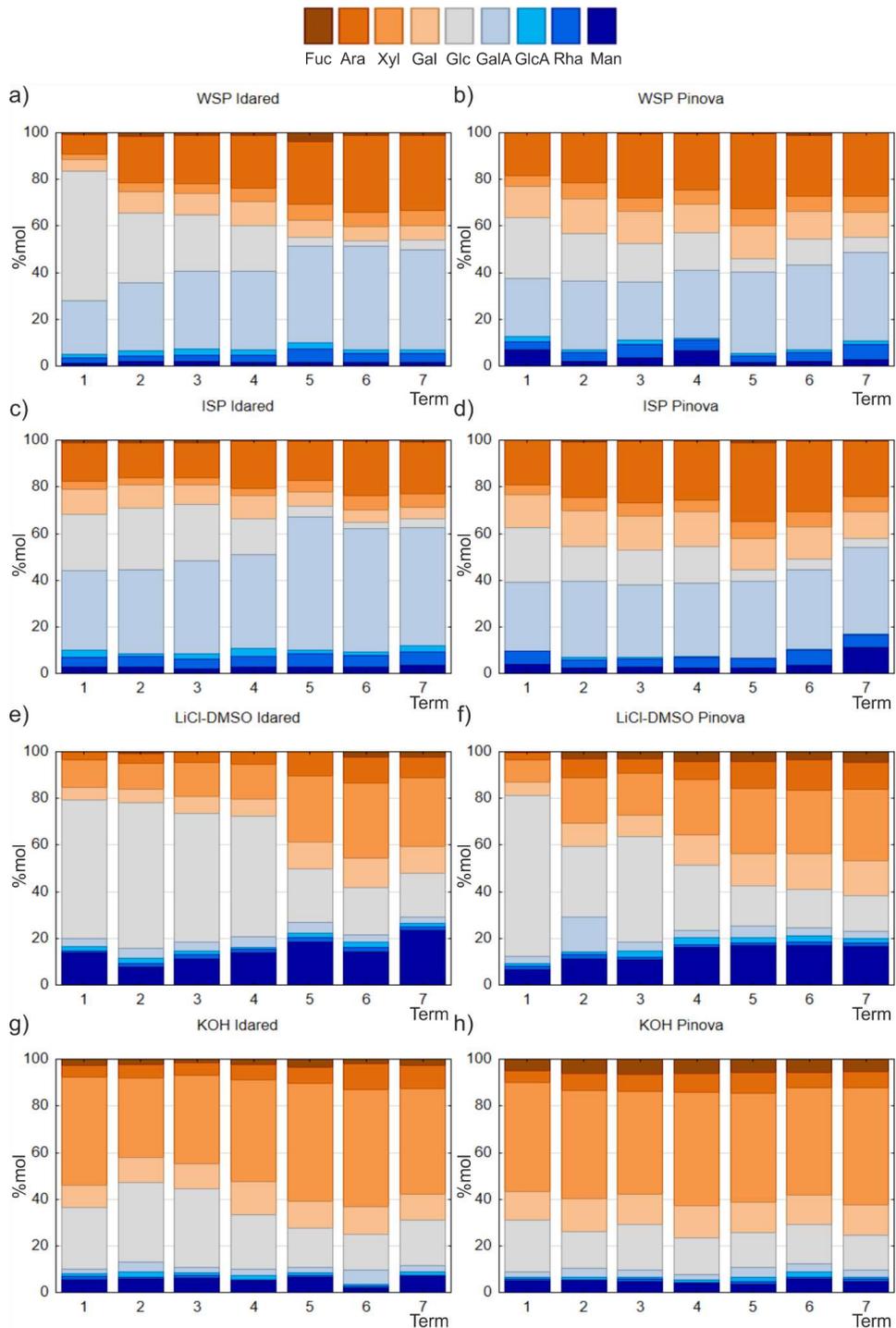
8.1. Materiały uzupełniające publikacji P.2



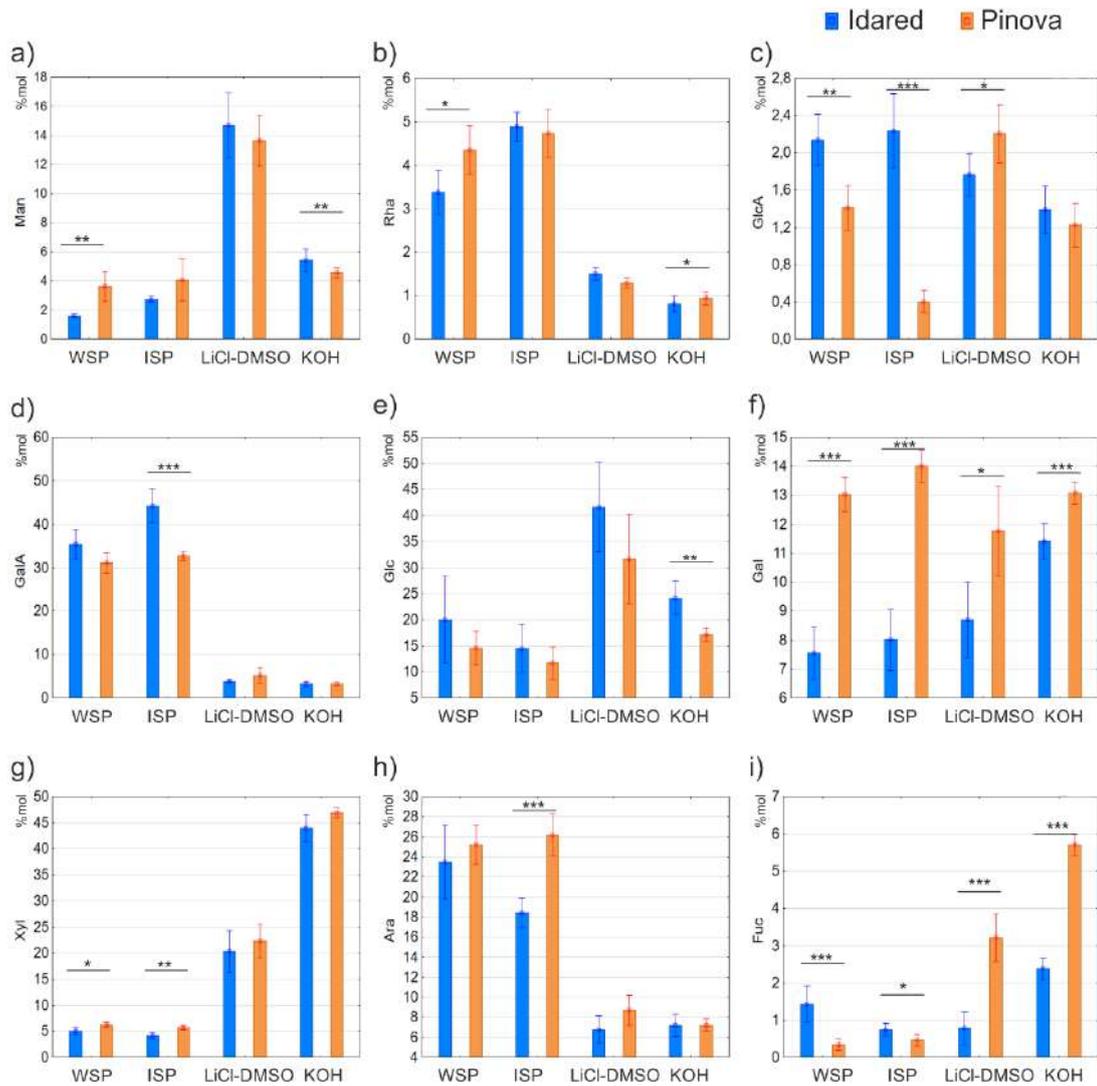
SM Fig. 1. Sequential extraction of polysaccharides from cell wall material (CWM). Polysaccharide fractions pectin-rich: WSP - water-soluble pectins, ISP - imidazole-soluble pectins; hemicellulose-rich: LiCl-DMSO – natively acetylated hemicelluloses soluble in LiCl-DMSO, KOH - hemicelluloses soluble in 4M KOH.



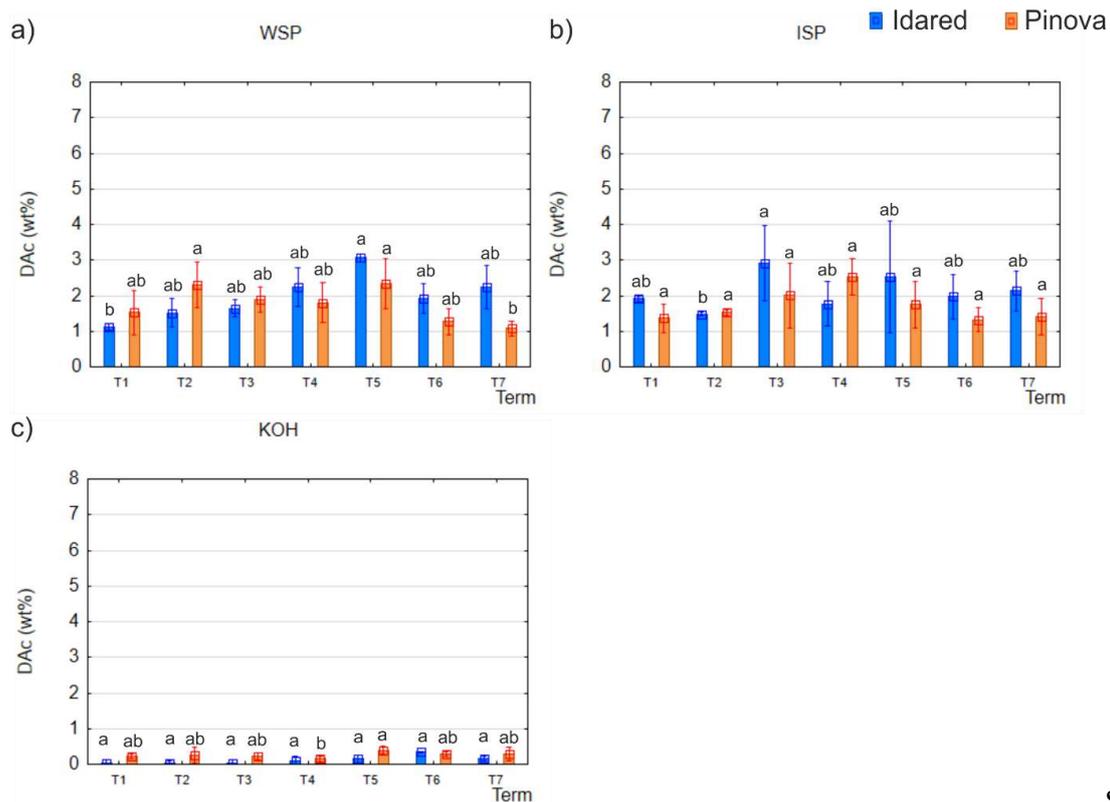
SM Fig. 2. Iodine test for starch content of apples at different terms of ripening and storage.



SM Fig 3. The overview of the monosaccharide composition of polysaccharide fractions isolated from CWM of Idared and Pinova apples during ripening on the tree (T1-T4) and post-harvest storage (T5-T7). Mannose (Man), rhamnose (Rha), glucuronic acid (GlcA), galacturonic acid (GalA), glucose (Glc), galactose (Gal), WSP – water-soluble pectins, ISP – imidazole-soluble pectins, LiCl-DMSO – LiCl-DMSO-soluble natively acetylated hemicelluloses, KOH – hemicelluloses soluble in high alkaline 4M KOH solution.



SM Fig 4 Overall comparison of the total content of given monosaccharides at all T1-T7 terms between cultivars in polysaccharide fractions isolated from the plant cell wall of Idared and Pinova apples, pectin-rich: WSP - water-soluble pectins, ISP - imidazole-soluble pectins; hemicellulose-rich: LiCl-DMSO – natively acetylated hemicelluloses soluble in LiCl-DMSO, KOH - hemicelluloses soluble in 4M KOH. a) Mannose (Man); b) rhamnose (Rha); c) glucuronic acid (GlcA); d) galacturonic acid (GalA); e) glucose (Glc); f) galactose (Gal); g) xylose (Xyl); h) arabinose (Ara); i) fucose (Fuc). Kruskal Wallis ANOVA analysis was performed separately for each fraction and monosaccharide followed by multiple comparison of mean ranks. The results with significant statistical differences are denoted: * with $p < 0,05$; ** with $p < 0,001$; *** with $p < 0,0001$. Columns express the mean value of %mol and whiskers ± 0.95 confidence interval.



SM

Fig 5. The degree of acetylation (DAC) of polysaccharide fractions isolated from the cell wall of Idared and Pinova apples during fruit ripening and storage term (a) WSP – water-soluble pectins, (b) ISP – imidazole-soluble pectins, (c) KOH – hemicelluloses soluble in high alkaline 4M KOH solution. $DAC (WT\%, \text{ weight\%}) = (\text{mass of acetic acid} / \text{mass of polysaccharides in fraction}) * 100\%$. Kruskal Wallis ANOVA analysis was performed separately for each variety and fraction, followed by multiple comparisons of mean ranks. Results that did not have a significant difference were marked with the same letter, and differences with $p < 0,05$ were statistically different.

SM Table 1. Total soluble solid content (SSC) and dry weight of apples during ripening and postharvest storage. The values are shown as mean values±standard deviation (SD). Results that did not have a significant difference were marked with the same letter, and differences with $p < 0,05$ were statistically different. For SSC results, Kruskal Wallis ANOVA analysis was performed followed by multiple comparison of mean ranks. For dry weight results, a one-way ANOVA analysis followed by an HSD Tukey test was performed.

Terms		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
IDARED	SSC [°Brix]	10.66 ±0.05 ^c	11.16 ±0.09 ^{ab} c	10.96 ±0.05 ^{bc}	11.42 ±0.04 ab	11.22 ±0.04 ^{abc}	11.04 ±0.05 ^{bc}	11.68 ±0.08 ^a
	Dry weight [%]	13.98 ±0.42 ^{ab}	15.02 ±2.11 ^{ab}	14.16 ±1.53 ^{ab}	15.75 ±1.06 a	12.47 ±0.68 ^b	16.12 ±0.16 ^a	14.22 ±1.03 ^{ab}
PINOVA	SSC [°Brix]	12.92± 0.04 ^c	13.66 ±0.15 ^{bc}	13.86 ±0.22 ^{abc}	13.76 ±0.26 abc	14.38 ±0.04 ^{ab}	14.70 ±0.14 ^{ab}	15.54 ±0.18 ^a
	Dry weight [%]	18.86 ±0.22 ^a	17.83 ±1.66 ^a	16.94 ±0.96 ^a	18.24 ±1.79 a	16.87 ±0.56 ^a	17.83 ±0,92 ^a	18.24 ±0.26 ^a

SM Table 2. Sugar ratios for each polysaccharide fraction isolated from apple cell wall material. The ratios are calculated as given in the table based on the monosaccharide composition presented in Fig. 2 and 3 and according to the methodology of Houben et al., (2011) and M'sakni et al. (2006).

$$(1) = \frac{\text{GalA}}{\text{Fuc}+\text{Rha}+\text{Ara}+\text{Gal}+\text{Xyl}}; (2) = \frac{2*\text{Rha}}{\text{GalA}-\text{Rha}}; (3) = \frac{\text{Ara}+\text{Gal}}{\text{Rha}}; (4) = \frac{\text{Man}}{\text{Xyl}}; (\text{HG}\%) = \text{GalA}(\text{mol}\%) - \text{Rha}(\text{mol}\%);$$

$$(\text{RGI}\%) = 2 * \text{Rha}(\text{mol}\%) + \text{Gal}(\text{mol}\%) + \text{Ara}(\text{mol}\%)$$

Name/ Term	WSP					ISP					LiCl- DMS O	KO H
	(1)	(2)	(3)	HG%	RGI%	(1)	(2)	(3)	HG%	RGI%		
ID_T1	1.24	0.22	5.87	20.75	17.93	0.94	0.27	6.77	29.86	35.40	1.17	0.12
ID_T2	0.79	0.18	12.04	26.58	33.81	1.07	0.30	5.37	31.28	34.20	0.72	0.17
ID_T3	0.88	0.18	10.91	30.55	35.45	1.25	0.23	5.90	35.74	32.10	0.77	0.16
ID_T4	0.79	0.19	11.21	30.85	39.13	1.04	0.27	6.38	35.36	39.88	0.94	0.12
ID_T5	0.82	0.31	6.07	35.57	44.89	1.69	0.22	4.06	51.61	34.06	0.64	0.13
ID_T6	0.89	0.19	10.17	40.69	47.13	1.30	0.22	5.53	47.42	38.87	0.44	0.04
ID_T7	0.86	0.19	10.41	39.03	46.17	1.28	0.26	4.70	44.64	39.07	0.80	0.15
PIN_T1	0.63	0.31	9.63	21.67	38.47	0.68	0.48	5.88	23.83	44.65	0.71	0.11
PIN_T2	0.63	0.30	9.43	25.62	43.66	0.67	0.24	11.41	29.27	46.26	0.58	0.11
PIN_T3	0.47	0.60	7.10	19.25	52.61	0.61	0.27	11.24	27.35	48.74	0.61	0.10
PIN_T4	0.61	0.39	7.77	24.44	45.81	0.64	0.31	9.57	27.49	48.65	0.68	0.08
PIN_T5	0.61	0.17	16.90	32.15	52.03	0.55	0.29	11.58	28.59	55.79	0.60	0.07
PIN_T6	0.74	0.23	10.16	32.62	45.77	0.59	0.49	6.69	27.37	57.60	0.63	0.12
PIN_T7	0.74	0.39	6.01	31.78	50.21	0.79	0.32	6.95	31.95	45.79	0.54	0.09

SM Table 3. The degree of methylation (DM) of polysaccharide fractions isolated from the cell wall of Idared and Pinova apples during fruit ripening and storage. The DM values are shown as mean values (WT%, weight%)=(mass of methanol /mass of polysaccharides in fraction)*100%; SD – standard deviation; nd - not detected.

FRACTION	TERMS	IDARED		PINOVA	
		DM (WT%)	SD	DM (WT%)	SD
WSP	T1	4.50	0.23	6.33	0.66
	T2	5.49	0.37	7.63	0.65
	T3	4.91	0.21	6.51	0.33
	T4	6.44	0.56	5.69	0.72
	T5	8.61	1.00	6.92	0.56
	T6	7.87	0.50	5.54	0.32
	T7	10.84	0.78	5.97	0.32
ISP	T1	nd	nd	3.34	0.14
	T2	2.04	nd	4.75	0.64
	T3	2.77	0.31	2.26	0.16
	T4	2.55	0.16	2.71	0.12
	T5	5.14	0.86	2.05	0.23
	T6	3.69	nd	nd	nd
	T7	nd	nd	nd	nd
LiCl-DMSO	T1	2.48	0.18	2.48	0.18
	T2	2.66	0.32	2.66	0.32
	T3	2.94	0.18	2.94	0.18
	T4	2.75	0.66	2.75	0.66
	T5	5.36	0.40	5.35	0.40
	T6	2.83	0.42	2.83	0.41
	T7	4.42	0.60	4.41	0.60
KOH	T1	2.11	0.12	2.17	nd
	T2	2.37	nd	nd	nd
	T3	2.60	0.52	1.99	0.24
	T4	2.86	0.19	nd	nd
	T5	nd	nd	nd	nd
	T6	nd	nd	nd	nd
	T7	2.51	0.11	nd	nd

9. Tekst publikacji P.3

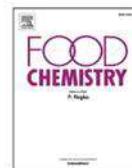
Food Chemistry 493 (2025) 146129



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

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



Acetylated hemicelluloses and esterified pectin alterations in apple cell walls during the development of two apple cultivars: Insights from FT-IR, Raman spectroscopy, and imaging

P. Pękala, M. Szymańska-Chargot^{*}, A. Zdunek

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Acetylated polysaccharides
Hemicellulose
Pectin
Polysaccharides distribution
Plant cell wall composition
Apple

ABSTRACT

FT-IR and Raman spectroscopy combined with Raman imaging provided insight into the characteristics of structural changes in polysaccharides and their distribution in the cell walls of two different apple varieties during their development. The fractions of pectin and hemicellulose polysaccharides extracted directly from the cell wall of apples were analyzed. FT-IR results for acetylated hemicelluloses (LiCl-DMSO) were grouped by term using PCA, and were influenced by bands associated with the acetyl group and mannan. Acetylated glucomannan content increased in cell walls during ripening and post-harvest storage. Raman imaging with True Component Analysis distinguished the distribution of acetylated and deacetylated hemicelluloses in the plant cell wall. In general, hemicelluloses did not form specific clusters in the cell wall, but a more pronounced uniform distribution along whole cell walls was observed for acetylated hemicelluloses. Moreover, acetylated hemicelluloses predominated at the post-harvest storage, especially in Idared apples.

1. Introduction

The composition and structural organisation of the primary plant cell wall play a crucial role in determining the texture and firmness of fruit (Zdunek et al., 2014). The textural properties, in turn, are key factors influencing overall fruit quality (Jaeger et al., 2018; Zhang et al., 2021), and consequently, affect consumer acceptance. As apples are storage fruits, preserving their high quality as long as possible during post-harvest storage is required. Spectroscopic methods such as infrared and Raman spectroscopy provide insight into the chemical composition and structure of cell wall polysaccharides (Szymańska-Chargot et al., 2024; Szymanska-Chargot & Zdunek, 2013). In addition, Raman imaging makes it possible to visualize the distribution of these major cell wall components (Chylińska et al., 2014; Gierlinger et al., 2008; Schulz et al., 2014). Therefore, spectroscopic studies combined with Raman mapping are a promising tool to observe changes in the structure, composition, and localisation of polysaccharides in the cell wall during fruit development, and thus also during post-harvest storage.

The primary plant cell wall is composed chiefly of cellulose, hemicelluloses, and pectins (Fry, 2010; McCann & Knox, 2010). Cellulose consists of a linear chain of β -1,4-linked D-glucose monomers (Heredia et al., 1995). Pectins and hemicelluloses have a complex structure. In

dicotyledonous plants, the most abundant hemicellulose is the xyloglucan (Pauly & Keegstra, 2016; Scheller & Ulvskov, 2010), which is made up of a chain of β -D-glucose monomers linked by a β -1,4-glycosidic bond, with branches at O-6 by α -D-xylosyl residues that are mostly decorated with β -D-galactosyl, β -D-galactosyl connected with α -L-fucosyl or/and α -L-arabinosyl residues (Cavalier & Keegstra, 2006; Fry, 1989; Hayashi, 1989). The native xyloglucan may contain mono- or di-O-acetylated groups, mostly at the O-6 position of the galactose in the side chains (Gille & Pauly, 2012) and also at the O-3, O-4 position of the glucose in the backbone (Ray et al., 2014). The acetyl group can migrate to free hydroxyl groups within the monosaccharide residue in aqueous solutions (Gille & Pauly, 2012). Glucomannans are composed of β -1,4-linked D-mannose and D-glucose monomers, which can be decorated by galactosyl residue at the O-6 position to form galactoglucomannans (Melton et al., 2009; Scheller & Ulvskov, 2010), and are also O-acetylated in the plant cell wall (Pauly & Ramirez, 2018), with substitutions mainly at the O-2, O-3 positions of mannose (Li et al., 2023). Pectins are a group of polysaccharides mainly composed of α -1,4-linked D-galacturonic acid chain (Albersheim et al., 1960; De Vries et al., 1983; Koller & Neukom, 1964; Knee, 1973). The basic galacturonic chain is present in homogalacturonans, with rhamnogalacturonans of types I and II additionally containing rhamnose and several side chains (arabinan,

^{*} Corresponding author.

E-mail addresses: p.pekala@ipan.lublin.pl (P. Pękala), m.szymanska@ipan.lublin.pl (M. Szymańska-Chargot), azdunek@ipan.lublin.pl (A. Zdunek).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.146129>

Received 15 April 2025; Received in revised form 14 August 2025; Accepted 25 August 2025

Available online 27 August 2025

0308-8146/© 2025 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

galactan, arabinogalactan, xylose and others) (Darvill et al., 1978; McNeil et al., 1980; Weinstein & Albersheim, 1979). Galacturonic acid can form methyl esters at the O-6 position and acetyl esters at the O-2 and/or O-3 positions. In addition, in pectin, an acetyl group can occur at the O-3 position of rhamnose (Gille & Pauly, 2012).

During fruit development, some changes occur in its composition and polysaccharide structure. The reduction in fruit firmness during development results from extensive cell wall remodeling, driven by a combination of enzymatic and non-enzymatic processes (Brownleader et al., 1999; Fry, 1995; Gross & Sams, 1984). The literature most extensively describes the dynamics of changes in pectin polysaccharides (Billy et al., 2008; De Vries et al., 1984; Fischer et al., 1994; Paniagua et al., 2014), while there is still a gap in reports regarding hemicelluloses. A crucial structural aspect of pectins is their degree of esterification (Axelos & Branger, 1993), which encompasses both acetylation and methylation, while for hemicelluloses, the degree of acetylation is particularly significant (Gille & Pauly, 2012; Martins et al., 2024). In apples, differences in the degree of pectin methylation have been linked to susceptibility to mealiness (Harker & Hallett, 1992; Lahaye et al., 2021; Li et al., 2020). Acetylation and methylation affect the physicochemical properties of polysaccharides, solubility, and resistance to enzymatic degradation. According to Steele et al. (1997), decoration with methyl groups of galacturonic acid in pectin can physically hinder the access of pectinolytic enzymes that modify the plant cell wall. Whereas, Bi et al. (2016) reported that acetylation of glucomannan reduced its susceptibility to microbial degradation.

Several analytical and microscopic techniques are used to study the structure and polysaccharide composition of plant cell walls. FT-IR and Raman spectroscopy, among others, are used to study the structure of polysaccharides: characteristic bonds, and functional groups, but they can also be used for the identification of monosaccharides in polysaccharides (Chylińska et al., 2016; Coimbra et al., 1998, 1999; Ferreira et al., 2001; Synytsya et al., 2003; Szymanska-Chargot & Zdunek, 2013). These are complementary techniques that, when used together, can give a more complete picture of the structural features of polysaccharides (Szymanska-Chargot et al., 2024). On the infrared spectrum, the active bands are those from vibrations of groups of molecules for which the dipole moment has changed (Kacuráková & Wilson, 2001; Yuen et al., 2009), and on the Raman spectrum, the polarizability has changed (Mohamed et al., 2017). Thus, when analysing the structure of polysaccharides, bands from vibrations of functional groups such as carbonyl, hydroxyl, and carboxyl groups have higher intensity on the IR spectrum, while bands from vibrations of methyl group, chain backbone, pyranoid ring, or glycosidic bond have higher intensity on the Raman spectrum (Synytsya et al., 2003). Hence, IR and Raman spectroscopy can be used to study acetylated hemicelluloses and acetylated/methylated pectins (Chylińska et al., 2016; Kacuráková et al., 2000; Santos et al., 2020; Synytsya et al., 2003). In addition, the degree of esterification of pectin (Monsoor et al., 2001) and acetylation of hemicelluloses can be evaluated by infrared spectra. Namely, the degree of esterification of pectin can be determined by the ratio of the intensities at 1740 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$) and 1600 cm^{-1} ($\nu\text{COO-}$) bands (Chylińska et al., 2016; Kyomugasho et al., 2015).

Due to the dynamic changes that occur in the plant cell wall of fruits and vegetables during ripening and post-harvest storage, Raman imaging may allow their visualisation. Confocal Raman microscopy is a non-destructive method that can reveal detailed images of the plant cell wall with micrometer resolution. This is a method that combines microscopy with Raman spectroscopy. The measurement method involves scanning the sample with simultaneous collection of Raman spectra. The great advantage of this method is that at the same time, it is possible to obtain information on the structure/identification of the sample's polysaccharides and their spatial distribution (Chylińska et al., 2014). Raman imaging is a competitive method to antibody labeling in investigating the distribution of plant cell wall components (Gierlinger & Schwanninger, 2006), as it does not require any chemical treatment of

the sample, such as the use of costly selective antibodies.

In our previous work by Pękala et al. (2025), which was mainly based on quantitative studies, it was shown that the monosaccharide composition of the cell wall fractions was associated with different firmness loss between Idared and Pinova apple cultivars. Namely, the firmness of both apple varieties at pre-harvest and optimum harvest dates was close to 70 N, while after three months of post-harvest cold storage, Pinova was still firm, maintaining a firmness of 66 N in contrast to the soft Idared with a firmness of 43 N. A negative correlation of the degree of acetylation of hemicelluloses with apple firmness was reported. Additionally, it was shown that the content of linear pectins was predominant in Idared apples, whereas the contribution of rhamnogalacturonans was higher in Pinova. Our study confirmed earlier reports by Ray et al. (2014) that LiCl-DMSO can extract acetylated fucogalactoxyglucan, galactoglucomannans and glucuronoarabinoxylan.

In this work, we aim to emphasise the value of qualitative studies, combining FT-IR, Raman spectroscopy, and Raman imaging to investigate structural modifications in polysaccharides and their distribution within the apple cell wall at pre-harvest, harvest, and post-harvest storage maturity terms. Through these advanced spectroscopic techniques, the research aims to elucidate changes in pectin esterification (methylation/acetylation) and hemicellulose acetylation, providing an understanding of their impact on fruit quality and postharvest storage potential. Therefore, two apple varieties were selected that had similar firmness at pre-harvest and harvest dates, but differed significantly during post-harvest storage, namely Idared (soft), and Pinova (firm). In this article, we present high-resolution Raman imaging on a cross-section of apple tissue to provide insight into the composition and location of cellulose, hemicellulose, and pectin. Due to similarities in the structure of cellulose and hemicellulose in particular, there may be overlapping bands that are difficult to interpret and lead to ambiguous conclusions. Therefore, a novel approach of this research is to use unique spectra obtained from polysaccharide fractions isolated from apple cell wall material in multivariate image analysis, which can more specifically localize pectin (WSP, ISP), hemicelluloses (LiCl-DMSO, KOH), and cellulose. Furthermore, another novel step is an attempt to distinguish natively acetylated and deacetylated hemicelluloses in the cell wall by means FT-IR and Raman spectroscopy.

2. Materials and methods

2.1. Samples and sample preparation

2.1.1. Apples

Two different apple cultivars, Idared and Pinova, were selected (*Malus domestica* cv. Idared, Pinova). Apples from different terms of harvest and storage were studied: T1-T3 pre-harvest, T4 optimal harvest, T5-T7 post-harvest. Apples were harvested at weekly intervals from September 21, 2021 (T1, T2, T3) until the predicted optimal harvest date of T4, from which the apples were stored in cold storage at $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ and a normal atmosphere for one, two, and three months (T5, T6, T7). Basic parameters used to assess the maturity of these apples, such as starch index, total soluble solids, and firmness, were presented in Pękala et al. (2025). Idared and Pinova varieties differed in firmness during T5-T7, with Idared (soft) losing firmness and Pinova (firm) remaining relatively firm during post-harvest storage.

Samples were prepared for Raman imaging according to the simplified scheme provided in the supplementary materials, Fig. S1. At each term, two apples were cut into slices $180\text{ }\mu\text{m}$ thick in the equatorial direction of the apple, using a vibratome (LEICA VT 1000S). The slices were placed on a microscope slide covered with aluminum foil and allowed to air dry ($21 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 h).

2.1.2. Polysaccharide fractions isolated from the plant cell wall of apples

Cell wall material (CWM) was isolated using the hot alcohol insoluble solids method (Renard, 2005), with some modifications as

described in our previous work (Pękala et al., 2025; Szymanska-Chargot & Zdunek, 2013). Briefly, 10 apples from each test sample were peeled and hollowed out, then the juice was separated using a kitchen juicer, and the apple pomace was homogenised. The prepared material was then placed in 70 % ethanol at a ratio of 1:10 (w/v) at about 72–75 °C for 20 min. Then, it was filtered through an 11 µm nylon filter (Millipore), and the procedure was repeated several times and finally with 96 % ethanol until the negative presence of sugars by the sulfuric acid-UV method (Albalasmeh et al., 2013). Finally, the precipitate was washed with acetone, dried at 40 °C for 24 h, and then ground in a ball mill (Retsch MM400) at 20 Hz for 20 min.

Subsequently, the polysaccharide fractions water-soluble pectin (WSP), imidazole-soluble pectin (ISP), natively acetylated LiCl-DMSO-soluble hemicelluloses (LiCl-DMSO) and 4 mol·L⁻¹ KOH-soluble hemicelluloses (KOH) were sequentially extracted from individual CWMs strictly following the procedure described in Pękala et al. (2025). At each extraction step, samples were centrifuged (6000 rpm, RCF 4427 ×g at 21 °C, 15 min; MPW-260R, Poland) and filtered through an 11 µm nylon net filter (Millipore). The 300 mg of CWM was placed in 30 mL of distilled water, stirred in twisted tubes using a laboratory rotor for 24 h at 21 ± 1 °C, then centrifuged and filtered. The filtrate was collected as the water-soluble pectin fraction (WSP). To the precipitate, 30 ml of 0.5 mol·L⁻¹ imidazole (pH 7) was added, stirred on the laboratory rotator for 24 h at 2 °C, centrifuged and filtered. The filtrate of ISP-1 was collected. The extraction was repeated, and 30 ml of 0.5 mol·L⁻¹ imidazole (pH 7) was added to the precipitate and stirred for 2 h at 21 ± 1 °C, centrifuged, filtered, and the filtrate of ISP-2 was collected. The imidazole-soluble pectin filtrates (ISP-1, ISP-2) from the two stages were collected together (ISP). To the precipitate was added 60 mL of 0.2 mol·L⁻¹ LiCl-DMSO (e.g. 84 g LiCl in 1 L DMSO), stirred in a water bath at 50 °C for 48 h, then cooled, centrifuged, and filtered. The filtrate was collected as the natively acetylated LiCl-DMSO-soluble hemicelluloses (LiCl-DMSO). The remained residue was extracted with 15 mL of 4 mol·L⁻¹ KOH solution with 10 mM NaBH₄, stirred on the laboratory rotator for 2 h at 21 ± 1 °C, centrifuged, and filtered. The filtrate was neutralised and collected as KOH-soluble hemicelluloses (KOH). The collected ISP, LiCl-DMSO and KOH filtrates were dialysed using membranes (MWCO 1000, Roth) with distilled water, monitoring its conductivity. All WSP, ISP, LiCl-DMSO, and KOH filtrates were frozen, then lyophilised and stored in a desiccator before further analysis.

2.1.3. Standard samples

Raman spectra were performed for commercially available reference standards: high methylated pectin (pectin, esterified from citrus fruit, DE ≥ 85 %, Sigma Aldrich), low methylated pectin (pectin, esterified potassium salt, from citrus fruit, DE 20–34 %, Sigma Aldrich). Cellulose as reference material was freeze-dried microfibrillar cellulose from apple, well-characterised and already described in Szymańska-Chargot et al. (2024).

2.2. FT-IR Spectroscopy

The Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) was used to analyze the structure of the cell wall polysaccharides of Idared and Pinova apples at ripening and storage terms (T1-T7). Pectins were studied from the lyophilized fractions WSP, ISP, and hemicelluloses from LiCl-DMSO, and KOH. FT-IR spectra were collected using a Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Scientific, Madison, WI, USA) equipped with a Smart iTR ATR sampling accessory. Spectra covered the range 4000–650 cm⁻¹. For each sample, 200 scans were collected at a resolution of 4 cm⁻¹. Three spectra were taken for each sample, from which an average was calculated and a baseline correction was performed using OMNIC software (Thermo Scientific). The spectra were normalized to the area under the spectrum and presented graphically using Origin software (Origin Lab v8.5 Pro, Northampton, USA).

2.3. Raman spectroscopy

The alpha300RA imaging system (WITec GmbH, Germany) was used for Raman spectra and Raman images acquisition. The green light laser ($\lambda = 532$ nm) with an operating power setting of 10–20 mW and an integration time of 3 s for imaging and single spectra acquisition was used. A Zeiss EC Epiplan-Neofluar Dic 100×/0.9 air objective (Carl Zeiss, Germany) was used for focusing laser light on the sample. The optical multifiber (50 µm diameter) was used to link to a UHTS 300 spectrometer (WITec, Germany) equipped with a 600 g/mm grating. The recorded signal was captured using a CCD camera (DU401A BV, Andor, Belfast, Northern Ireland). The spectra were recorded in the range of 0–4000 cm⁻¹. The maps were recorded with a spatial resolution of 0.5 µm in the x and y directions.

The single Raman spectra were the result of the average of 5 individual spectra. The graphical presentation of Raman spectra was prepared using OriginPro software (Origin Lab v8.5 Pro, Northampton, USA). Baseline correction, normalization (area to 1), and Savitzky-Golay filtering were performed (ProjectSix WITec, Germany).

Six maps were collected near the corner area of the cell wall for further analysis. A representative map was chosen for each cultivar in the following terms: T1, T4, and T7. For the analysis of individual maps, Raman signal intensity filters for characteristic bands of each polysaccharide were applied (Project Six, WITec, Germany). Identification and distribution of pectin, hemicelluloses, and cellulose in the plant cell wall of Idared and Pinova apples at selected developmental terms was carried out using True Component Analysis in the ProjectSix WITec. Hyperspectral data sets were fitted by linear combinations of component spectra. The analysis was performed using average spectra of fractions or polysaccharides without any correction, with the entire range of wavenumbers.

2.4. Statistical analysis

The PCA analysis of the FT-IR and Raman spectra was performed to highlight the characteristic bands responsible for the sample variability. In the case of FT-IR spectra for the PCA analysis, the range of (1800–650 cm⁻¹) was chosen, as polysaccharide-specific bands occur in this spectral range, while for Raman spectra the range of 3750–2750 and 1800–650 cm⁻¹ was used. FT-IR and Raman mean spectra from three replicates with baseline correction for two apple varieties, seven terms and for all polysaccharide fractions were used, where each wavelength was treated as a variable. Here, the maximum number of principal components (PCs) taken for analysis was seven for Raman spectra and five for FT-IR spectra, while the influence of further components on scores was negligible. The algorithm used was NIPALS. The PCA was performed using the Unscrambler 10.1 (Camo Software AS., Norway) program.

3. Results & discussion

3.1. FT-IR spectra

The FT-IR spectra of the pectin-rich fractions of WSP, and ISP are shown in Fig. 1a,b,c,d, and the hemicellulose-rich fractions of LiCl-DMSO and KOH are shown in Fig. 1e,f,g,h. To detect structural changes in plant cell wall polysaccharides during fruit development, particular attention was paid to the analysis of bands: 1730–1740 cm⁻¹ (ν C=O), 1370 cm⁻¹ (δ C–H in CH₃) and 1242–1230 cm⁻¹ (ν COC) (Adebawo et al., 2019; Berglund et al., 2020; Xu et al., 2010), confirming the presence of an acetyl substituent in hemicelluloses and pectin.

The spectra of the WSP and ISP fractions showed mainly pectin-specific bands (Fig. 1a,b,c,d), i.e. about 832 cm⁻¹ originating from the vibrations of the α -glycosidic bond (Kacuráková et al., 2000). The 1601 cm⁻¹ band came from the stretching vibration of the carboxylate ion

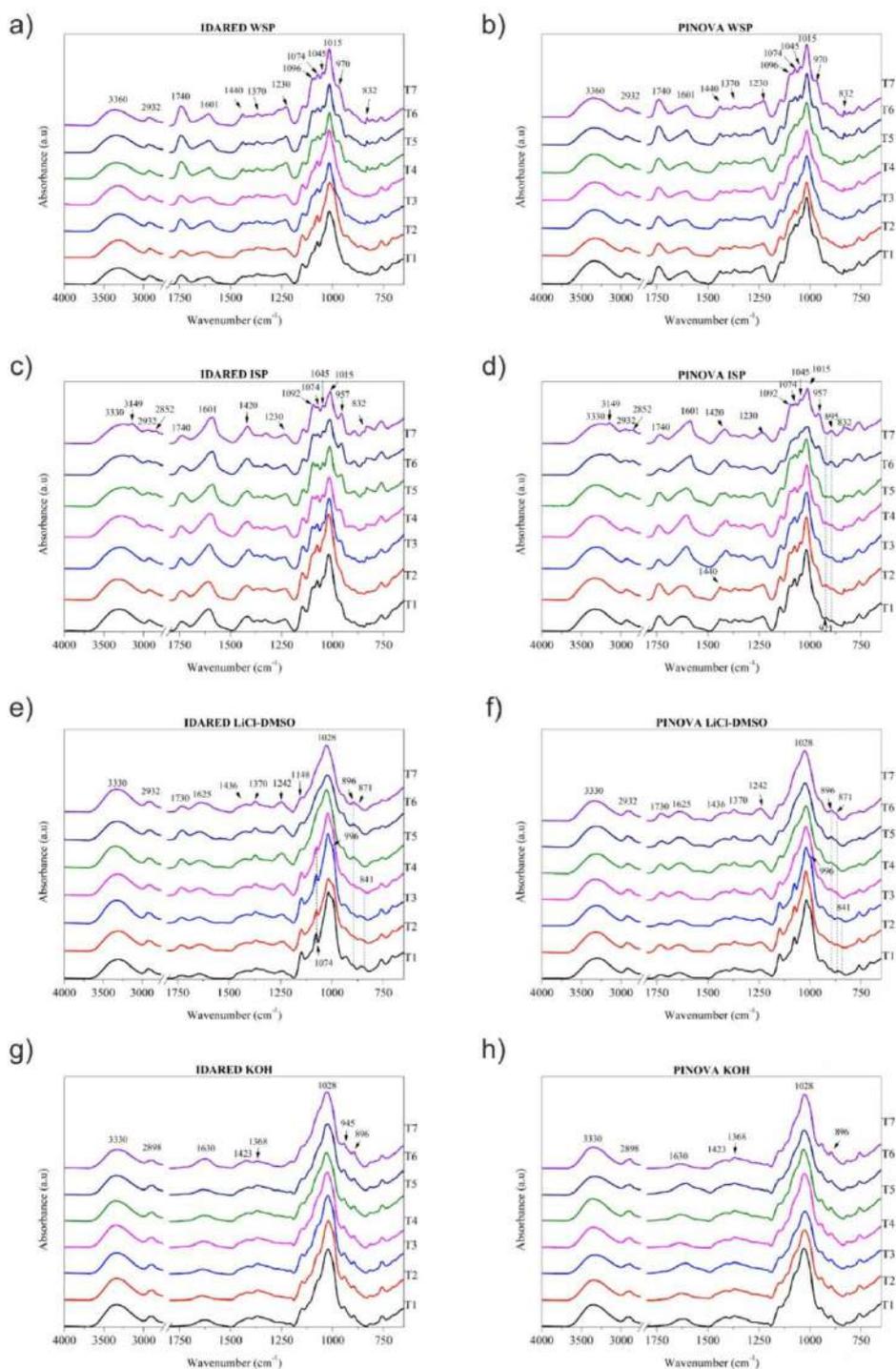


Fig. 1. FT-IR spectra in the range 4000–650 cm^{-1} (the region 2750–1800 cm^{-1} was cut-off due to lack of spectral features) of pectin-rich and hemicellulose-rich polysaccharide fractions of CWMs of apples at T1–T3 (pre-harvest), T4 (optimal harvest) and T5–T7 (post-harvest storage): (a) WSP Idared, (b) WSP Pinova, (c) ISP Idared, (d) ISP Pinova (e) LiCl-DMSO Idared, (f) LiCl-DMSO Pinova, (g) KOH Idared, (h) KOH Pinova. WSP, water-soluble pectins; ISP, imidazole-soluble pectins; LiCl-DMSO, LiCl-DMSO-soluble acetylated hemicelluloses; KOH, 4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH-soluble deacetylated hemicelluloses.

(νCOO^-), and the 1740 cm^{-1} band came from the vibration of the carbonyl group ($\nu\text{C=O}$), which may indicate the presence of the carboxyl group of galacturonic acid (Liu et al., 2021; Szymanska-Chargot & Zdunek, 2013) as well as methyl/acetyl esters (Fu et al., 2018). A higher intensity of the 1740 cm^{-1} band and a lower intensity of the 1600 cm^{-1} band indicate a higher degree of esterification (Chylińska et al., 2016; Santos et al., 2020). Therefore, the spectra for the WSP fraction (Fig. 1a and b) show that pectin in this fraction had a high degree of esterification. Before harvest (T1-T4) WSP from 'Pinova' showed a slightly higher degree of esterification judging on the band ratio (Table S1). During the postharvest period (T5-T7) the degree of esterification of WSP increased and became similar for both cultivars.

The ISP spectra were similar to WSP due to the presence of bands characteristic of pectic polysaccharides, but differed from WSP in the intensity ratio of the 1740 cm^{-1} and 1601 cm^{-1} bands (Table S1). Overall, for the ISP, the 1740 cm^{-1} band had a lower intensity than 1601 cm^{-1} , indicating that pectin extracted with imidazole had a lower degree of esterification. This suggested that imidazole could reduce the ester group in pectin (Biely et al., 2015; Jiang et al., 2021; Rosenbohm et al., 2003). Moreover, imidazole extracts pectins that are linked by Ca^{2+} bridges to the middle lamella (Hegde & Maness, 1996), which also indicates that these are low-esterified pectins. On the basis of bands ratio (Table S1), for 'Idared', the degree of pectin ISP esterification was low and stable during the period T1-T7. For 'Pinova', the intensities of these bands at T1-T2 were almost similar, while starting from T3, a decrease in the intensity of 1740 cm^{-1} and an increase in the intensity of 1600 cm^{-1} were observed, which is related to the decrease in overall esterification degree. In addition, a 1440 cm^{-1} band originating from $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ vibrations in the methyl ester occurred for Pinova at T1 and T2 that indicated that these pectins may have contained some methyl esters, in contrast to ISP from Idared, which did not show this band. Therefore, it can be concluded that mostly acetyl esters were present in ISP fraction.

Crucially, native pectin can be both methylated and acetylated (Gawkowska et al., 2018; Zdunek et al., 2021), but quantitatively the methyl substituents predominate (Renard & Jarvis, 1999). Therefore, the visible bands resulting from the substitution of the carboxyl group can originate from both methyl and acetyl esters. It is known from the literature that there are some shifts of bands to distinguish these substituents (Synytsya et al., 2003). Following this suggestion, the 1440 cm^{-1} band in the WSP (both cultivars during T1-T7) and in the ISP (only Pinova during T1-T2) could come from C-H bending vibrations in the methyl ester. In the rest of samples, i.e. the ISP from Idared (T1-T7) and from Pinova (T3-T7) was shifted to 1420 cm^{-1} that may be assigned to the acetyl ester. Previously, Synytsya et al. (2003) observed that the methyl esters were characterised by a band at 1444 cm^{-1} , while it was shifted to 1435 for acetyl esters in FT-IR spectrum. Subsequently, on WSP spectra, the 1370 cm^{-1} band was assigned to $\nu\text{C-H/C-O/C-C}$ or $\delta\text{C-H/C-O/C-C}$ ester methyl groups in galacturonic and rhamnose rings in the pectin backbone (Fidalgo et al., 2016). Also, the band at 1230 cm^{-1} in the pectin fraction of WSP and ISP mainly corresponded to the νCOC vibrations of the methyl esters (Synytsya et al., 2003).

The intense 1015 cm^{-1} band on the WSP and ISP spectra corresponded to C-O, C-C stretching vibrations of galacturonic acid in pectin (Szymanska-Chargot et al., 2015). Moreover, the WSP spectra contained in the region $900\text{--}1300$ bands characteristic for both rhamnagalacturonan type I and homogalacturonan (1096 cm^{-1} assigned to ν -arabinose stretching, 1045 cm^{-1} assigned to ring vibration, and 1015 cm^{-1} assigned to stretching vibration of pyranose rings in ν -GalA and ν -Rha) or typical only for rhamnagalacturonan (1074 cm^{-1} assigned to ν -galactosyl stretching) or homogalacturonan (970 cm^{-1}) (Szymanska-Chargot et al., 2024). The WSP spectra of Idared T1-T4 and Pinova T1-T5 contained bands patterns at 1074 and 1015 cm^{-1} and, less developed, 1096 and 1045 cm^{-1} characteristic for rhamnagalacturonan type I. In the WSP spectra of Idared T5-T7 and Pinova T6-T7, the relative intensity of bands at 1096 and 1045 cm^{-1} increased, and the band at 970 cm^{-1} appeared, which can be a result of the increasing contribution

of homogalacturonan. In the case of ISP spectra obtained for Idared and Pinova, the band pattern in this region is typical for rhamnagalacturonan spectrum (Liu et al., 2021). The 1045 cm^{-1} may also have indicated the presence of arabinose in the chain of arabinogalactan (Kacuráková et al., 2000). The spectra of the hemicellulose-rich fractions extracted with LiCl-DMSO (Fig. 1e,f) and KOH (Fig. 1g,h) showed bands characteristic of hemicelluloses, such as 896 cm^{-1} derived from β -glycosidic bond vibrations (Szymanska-Chargot et al., 2015) and differences related to extraction medium. The band at 896 cm^{-1} from LiCl-DMSO fractions (Fig. 1e,f) slightly increased in intensity at successive terms T1-T7 suggesting that the content of hemicelluloses in LiCl-DMSO fractions may have increased during their development. In contrast, these changes were not observed for hemicelluloses of the KOH fraction (Fig. 1g,h). This is consistent with our previous studies, in which increases in %mol of mannose and xylose were observed only in the LiCl-DMSO fraction (Pękala et al., 2025).

It was shown that the most intense band 1028 cm^{-1} (C-O, C-C stretching vibration) of LiCl-DMSO and KOH fractions of hemicelluloses was shifted compared to pectin that was at 1015 cm^{-1} . The bands characteristic of hemicelluloses (glucomannan, glucan, xyloglucan, xylan, arabinoxylan) at 1423 and 1368 cm^{-1} in the KOH spectrum, and 1436 and 1370 cm^{-1} in the LiCl-DMSO were present (Szymanska-Chargot et al., 2024). In the LiCl-DMSO fraction, the presence of glucomannans was also confirmed by a band at 871 cm^{-1} corresponding to the C-H vibration in the mannose molecule (Liu et al., 2021) and 1064 cm^{-1} , which was attributed to the C-C stretching vibration in the glucomannan chain (Liu et al., 2021; Zheng et al., 2023). The 945 and 1150 cm^{-1} bands were attributed to stretching vibrations of the xylose ring in xyloglucan (Kacuráková et al., 2000; Szymanska-Chargot et al., 2024), with the 945 cm^{-1} band being more intense for the KOH fraction. Thus, it can be supposed that glucomannans in the LiCl-DMSO fraction and xyloglucans in the KOH fraction may have predominated. This is consistent with earlier reports by Ray et al. (2014), which showed that the extracted LiCl-DMSO fraction primarily contained glucomannans and xyloglucans weakly bound in the cell wall, while the KOH fraction tightly bound xyloglucans.

The LiCl-DMSO fraction contained mainly hemicelluloses; however, the 1074 cm^{-1} band could also correspond to galactans in rhamnagalacturonan. Subsequently, the band at 1625 cm^{-1} was attributed to the asymmetric stretching vibration of COO- galacturonic acid (Peng et al., 2012). Gautreau et al. (2022) also showed that the fraction of polysaccharides extracted with LiCl-DMSO after prior pectin extraction was rich in hemicelluloses, but also identified some residual pectin. DMSO-LiCl-soluble pectins extracted from fruit cell walls have already been reported (Broxterman et al., 2018). Ray et al. (2014) showed that glucuronarabinoxylan was present in the LiCl-DMSO fraction sequentially extracted from the cell wall of apples. Hence, the 1625 cm^{-1} band may have originated from residual pectin and glucuronoxylan. Moreover, in our earlier study, Pękala et al. (2025) analysis of the monosaccharides of the LiCl-DMSO fraction showed a trace content of galacturonic acid and galacturonic acid, comparable to the KOH fraction.

The LiCl-DMSO spectrum showed bands that could originate from acetyl groups (1730 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} , 1242 cm^{-1}), in contrast to the KOH spectrum. The 1730 cm^{-1} band corresponding to the $\nu\text{C=O}$ carbonyl group vibration was shifted compared to pectins, where it occurred at 1740 cm^{-1} . Moreover, the intensity of this band increased with successive developmental terms T1-T7 of the apples. The intensity of 1370 cm^{-1} band, attributed to $\nu\text{C-H/C-O/C-C}$ or $\delta\text{C-H/C-O/C-C}$ (Bi et al., 2016; Synytsya et al., 2003), also increased at T1-T7. Consecutively the 1242 cm^{-1} band of the LiCl-DMSO fraction corresponding to the νCOC of acetyl substitution has been shifted compared to the 1230 cm^{-1} band of pectin methyl esters (Synytsya et al., 2003).

The spectra of Idared and Pinova confirmed that the LiCl-DMSO fraction was rich in acetylated hemicelluloses. The intensity of 1730 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} , and 1242 cm^{-1} bands of the acetyl group could indicate that the natively acetylated hemicelluloses of the LiCl-DMSO

fraction had a low degree of acetylation. Based on the gentle increase in their intensity during T1-T7, it was concluded that there was an increase in the degree of acetylation of hemicelluloses at subsequent pre-harvest, harvest, and post-harvest storage terms. In contrast, no characteristic bands for acetyl groups were shown for the KOH fraction spectrum, as the highly alkaline ($4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH) environment caused deacetylation of hemicelluloses.

3.2. PCA analysis of FT-IR spectroscopic data

PCA analysis highlighted the differences and similarities between the spectra obtained for apples at pre-harvest (T1-T3), optimal harvest (T4), and post-harvest (T5-T7) periods. The results for the ISP (low esterified pectin) and KOH (deacetylated hemicelluloses) have not shown a specific trend of changes in the spectra with successive dates (data not presented). In contrast, an interesting distribution was obtained for the WSP (esterified pectins) and LiCl-DMSO (acetylated hemicelluloses) fractions.

Fig. 2a presents the PC1 (52 %) vs PC2 (35 %) plot for the WSP fraction, while Fig. 2c shows the loadings plot indicating the FT-IR wavenumbers grouping according to cultivar and term. Some differences were observed among varieties along the PC1. Most results for the Pinova variety were distributed on the positive side of the PC1 axis, while the results for the Idared T1-T4 variety were on the negative side

of the axis. This distribution was most influenced by the 1099 cm^{-1} band (C—O stretching vibrations characteristic of all carbohydrates) and the 1068 cm^{-1} band of ring vibrations (C—O) and (C—C) in RG I and galactans (Chylińska et al., 2016), which may indicate a higher contribution of rhamnogalacturonans in the case of Pinova at T1-T4 compared to Idared. This distribution was also influenced by the bands: 1230 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} , 1601 cm^{-1} , 1740 cm^{-1} ($\nu\text{C—O}$, $\nu\text{C—H}$, $\nu\text{COO—}$, $\nu\text{C=O}$, respectively), which can be related to acetyl/methyl esters in pectins and carboxyl group of galacturonic acid. On the other hand, a more distinct distribution of results by term was observed on the PC2 axis, namely the results for pre-harvest terms (T1-T3) and optimal harvest term (T4) were mostly distributed on the positive side of the PC2 axis (only the plot of Idared T3 was on the negative side but near 0 of this axis). In contrast, the data for postharvest storage terms (T6-T7) were distributed mostly on the negative side of the PC2 axis. The data for Idared and Pinova T5 were on the positive side of the PC2 axis, but near 0 of this axis. The distribution on the positive side of the axis was significantly influenced by the 996 cm^{-1} band (Fig. 2c), which is a shoulder of the intense 1015 cm^{-1} band (visualisation would be possible by deconvolution) and corresponds to the ring and side group vibrations (C—C), (C—OH), (C—H) of glucose (Fasoli et al., 2016; Kacuráková et al., 2000). Thus, the distribution on the positive side may have been partially influenced by the presence of hydroxyl groups. The distribution on the negative side of the axis is significantly influenced by the 1099

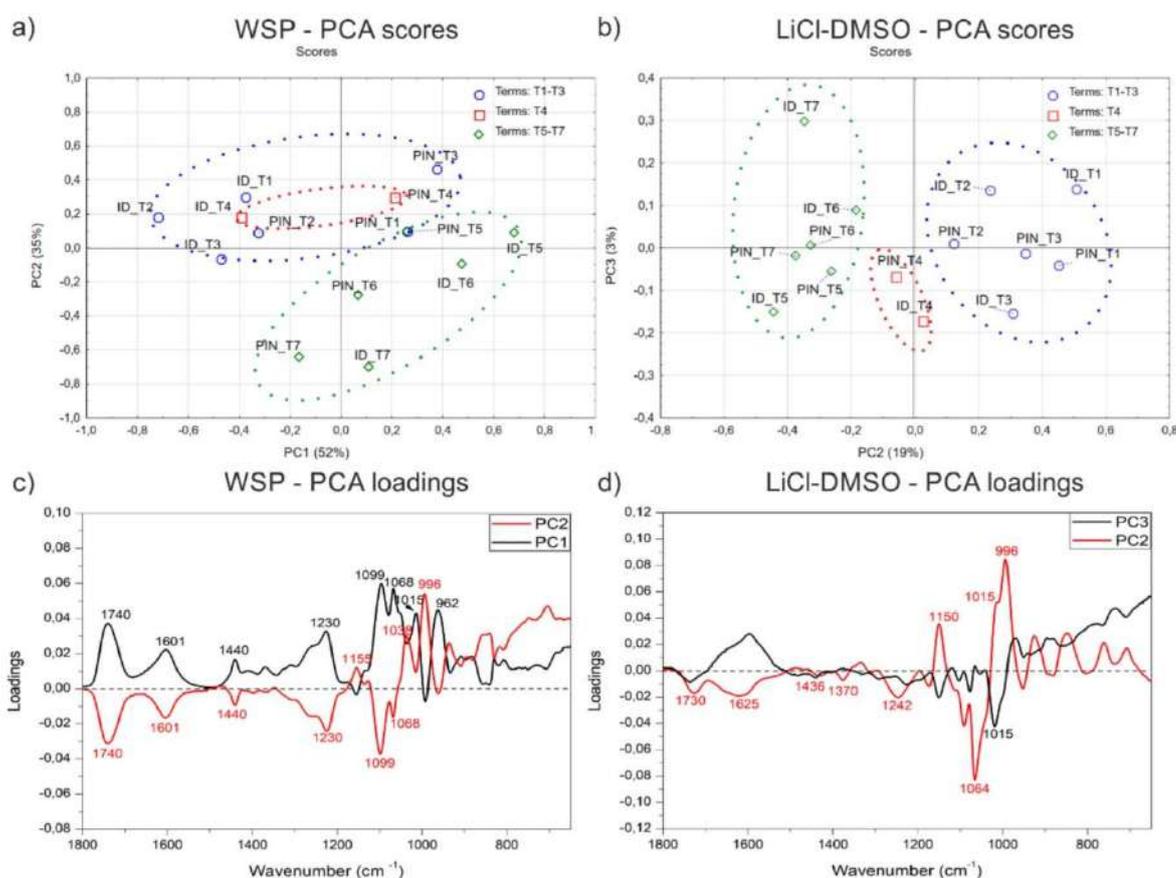


Fig. 2. PCA results of the $1800\text{--}650 \text{ cm}^{-1}$ region in the FT-IR spectra of the WSP and LiCl-DMSO fractions of the CWM of Idared and Pinova apples at T1-T3 (pre-harvest), T4 (optimal harvest) and T5-T7 (post-harvest storage): (a) PCA scores plot for WSP, (b) PCA scores plot for LiCl-DMSO and (c) PCA loading plot for WSP, (d) PCA loading plot for LiCl-DMSO. WSP, water-soluble pectins; LiCl-DMSO, LiCl-DMSO-soluble acetylated hemicelluloses; ID, Idared; PIN, Pinova.

cm^{-1} band ($\nu\text{C}=\text{O}$) and 1230 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} , 1601 cm^{-1} , 1740 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{O}$, $\nu\text{C}-\text{H}$, νCOO^- , $\nu\text{C}=\text{O}$, respectively). Interestingly, on the positive side of the PC1 axis and negative side of the PC2 axis, there was a group of results for Idared and Pinova at post-harvest storage dates T5-T7 (green marked), and this was influenced by the bands originating from the vibration of acetyl/methyl esters and/or carboxyl group of galacturonic acid, as the loadings plot of these particular bands (1230 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} , 1601 cm^{-1} , 1740 cm^{-1}) for PC1 and PC2 have similar intensity in contrast to the other bands.

In the PC2 (19 %) vs PC3 (3 %) plot for the LiCl-DMSO fraction (Fig. 2b) a pronounced distribution of results was obtained due to pre-harvest, optimal harvest, and post-harvest storage dates. The results for pre-harvest dates (T1-T3) were clustered on the positive side of the PC2 axis. Subsequently, the results for optimal harvesting date T4 were close to 0 on the PC2 axis. The results for post-harvest storage dates (T5-T7) were clustered on the negative side of the PC2 axis. Fig. 2 (d) shows the loadings plot for the LiCl-DMSO fraction and the wavenumber influencing the most LiCl-DMSO scores distribution. On the distribution on the negative side of the PC2 axis, for the LiCl-DMSO fraction (hemicelluloses), the bands 1242 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} , and 1730 cm^{-1} can be more closely assigned to the acetyl group. Further, the distribution of results on the negative side of the PC2 axis was strongly influenced by the 1064 cm^{-1} band which is attributed to the stretching of C-C in glucomannan (Zheng et al., 2023). It has already been reported that glucomannans can be acetylated in the cell wall of apples (Lahaye et al., 2021; Ray et al., 2014). Moreover, Lahaye et al. (2021) showed an increase in glucomannan content in the early developmental stages of the fruit and suggested that glucomannan may be a marker of cell expansion whose metabolism can distinguish the texture of ripe fruit. Hence, we can assume that the clear distribution obtained due to pre-harvest, optimal harvest, and post-harvest maturity dates was obtained due to the content of acetylated hemicelluloses, probably acetylated glucomannan.

3.3. Raman spectra

The Raman spectra were obtained as they carry complementary information to the FT-IR spectra and were used to analyze Raman maps. The Raman spectra of WSP fractions of Idared (Fig. 3a) and Pinova (Fig. 3b) showed similarities where the most characteristic bands at $2957/2937\text{ cm}^{-1}$ that can be assigned to $\nu\text{C}-\text{H}$, 1747 cm^{-1} - $\nu\text{C}=\text{O}$, 1602 cm^{-1} - $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$, and 857 cm^{-1} - $\nu_{\text{as}}\text{C}-\text{O}-\text{C}$ skeletal mode of α -anomers in pectins. In the case of WSP from Pinova, Raman spectra at 1602 cm^{-1} increased with sampling term. All the WSP spectra also contained a band at 1457 cm^{-1} , the intensity of which increases in the case of pectins with a low degree of esterification and probably can be assigned to νCOO^- as well (Szymańska-Chargot et al., 2016). The visible increase of the band with a maximum at 1747 cm^{-1} with a subsequent decrease of the band at 1457 cm^{-1} was observed and was higher for Idared WSP. Further, the shift of the band assigned to $\nu_{\text{as}}\text{C}-\text{O}-\text{C}$ skeletal mode of α -anomers in pectins from 847 to 852 cm^{-1} was observed with development and postharvest storage of Idared apples, while for Pinova apples this band was insensitive to fruit development and had a maximum at 849 cm^{-1} (Fig. 4 a, b). Synytsya et al. (2003) noticed that the band with a maximum around 857 cm^{-1} is also sensitive to changes of degree of methylation and degree of acetylation; in the case of increasing degree of methylation this band is shifted towards the shorter wavenumbers, to 850 cm^{-1} , while in the case of increasing degree of acetylation, this maximum is shifted towards 862 cm^{-1} .

The ISP Raman spectra (Fig. 3c,d) were similar to the WSP spectra (Fig. 3a,b) with some exceptions. The band assigned to the $\nu\text{C}-\text{H}$ is shifted to 2937 cm^{-1} which can be connected with a lower degree of ISP fraction acetylation compared with WSP (Synytsya et al., 2003). Synytsya et al. (2003) stated that this band is also contributed by $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ in methylester groups; specifically, the band around 2940 cm^{-1} is

influenced by acetyl esters, while the band at 2960 cm^{-1} is associated with methyl esters. Moreover, the band at 1740 cm^{-1} is quite low for Idared and Pinova. The band characteristic of the $\nu_{\text{as}}\text{C}-\text{O}-\text{C}$ skeletal mode of α -anomers in pectins also appeared at $850-852\text{ cm}^{-1}$, indicating a low degree of esterification in ISP pectins from Idared and Pinova. In previous paper, the degree of methyl and acetyl esters for each fraction of both cultivars was determined by HPLC (Pękala et al., 2025); in the supplementary materials in Table S2 these data are summarised in %weight and for the pectin fraction %mol expressed per mole of GalA. Generally, in the case of methylation degree of WSP, it increased from 86 % to 97 % for Idared and decreased 97-64 % for Pinova. In the case of the acetylation degree of the WSP and ISP fractions, it was below 13 % for both cultivars. The methylation degree of ISP fraction was lower than that of WSP for both cultivars, it oscillated below 30 % for Idared and decreased from 47 % (T1) to about 30 % (T3-T5) and methylation was not detected in (T6-T7) for Pinova.

The Raman spectra of LiCl-DMSO (Fig. 3e,f) contained bands typical for hemicelluloses: 2897 cm^{-1} , $1120-1080\text{ cm}^{-1}$ or 895 cm^{-1} (Szymańska-Chargot et al., 2024), but also bands that are attributed to the acetyl group in hemicelluloses: 2937 cm^{-1} and 1730 cm^{-1} (Himmelsbach & Akin, 1998). The most intense band on the spectrum of LiCl-DMSO hemicelluloses consisted in a large peak with two maxima, one at 2937 cm^{-1} and the other at 2897 cm^{-1} ; interestingly, a shift in intensity towards the arm at 2937 cm^{-1} for T4 and T5-T7 was observed. Thus, this could indicate an increase in the degree of acetylation of hemicelluloses at the term of optimal harvest and post-harvest storage. The bands at 1600 cm^{-1} and 850 cm^{-1} can be related to the residual galacturonate or starch (Pękala et al., 2025). The bands at 895 cm^{-1} and in the range of $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ are typical for $\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$ of β -glycosidic linkage (Barron et al., 2006; Himmelsbach & Akin, 1998; Philippe et al., 2006). While the first is unalterable due to differences in the structure of hemicelluloses, the band pattern in the range $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ is specific for different hemicelluloses. For example, for glucomannan two maxima at ca. 1116 and 1087 cm^{-1} can be found, but at ca. 1120 and 1097 cm^{-1} for xyloglucan. Therefore, Idared LiCl-DMSO is abundant in glucomannan, while Pinova is a mixture of glucomannan and xyloglucan, except that in the case of Pinova T7 xyloglucan predominates. Previously, Pękala et al. (2025) showed that in the case of LiCl-DMSO fraction of Idared cell wall material, the mannose content increased during apple senescence and was higher than for Pinova apples. While, the content of xylose was higher than mannose in the case of LiCl-DMSO fraction of Pinova apples. Interestingly, the band with a maximum at 480 cm^{-1} was observed in acetylated glucomannan Raman spectrum, but also in starch, which can persist in low amount after isolation of polysaccharide fraction (Himmelsbach & Akin, 1998; Pękala, Szymańska-Chargot, Cybulska and Zdunek, 2025). The Raman spectra of KOH fractions presented typical bands for xyloglucan hemicellulose (Fig. 3g,h) (Szymańska-Chargot et al., 2016), and no clear changes were observed at T1-T7. A study by Ray et al. (2014) using MS and HPAEC analyses of the enzymatic digests also showed that the fraction of hemicelluloses extracted with $4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH contained mainly xyloglucans.

3.4. PCA analysis of Raman spectroscopic data

The PCA analysis of the Raman spectra of cell wall polysaccharides was performed. Analogously to PCA analysis of the FT-IR spectra of ISP and KOH, the scores were scattered randomly along the PC axis and no clustering was obtained. This is probably because there were no striking differences between the spectra of those fractions in different developmental terms of apples. The best clustering results were obtained for WSP spectra and good for LiCl-DMSO spectra (Fig. 4).

The PCA plot (Fig. 4a) presents a scatter of scores along the PC1 (68 % of explained variability) vs. PC2 (11 % of explained variability) for the WSP fraction. The terms T1-T4 form the cluster of scores were placed mostly on the positive side of the PC1 axis the scores related to the T5-T7

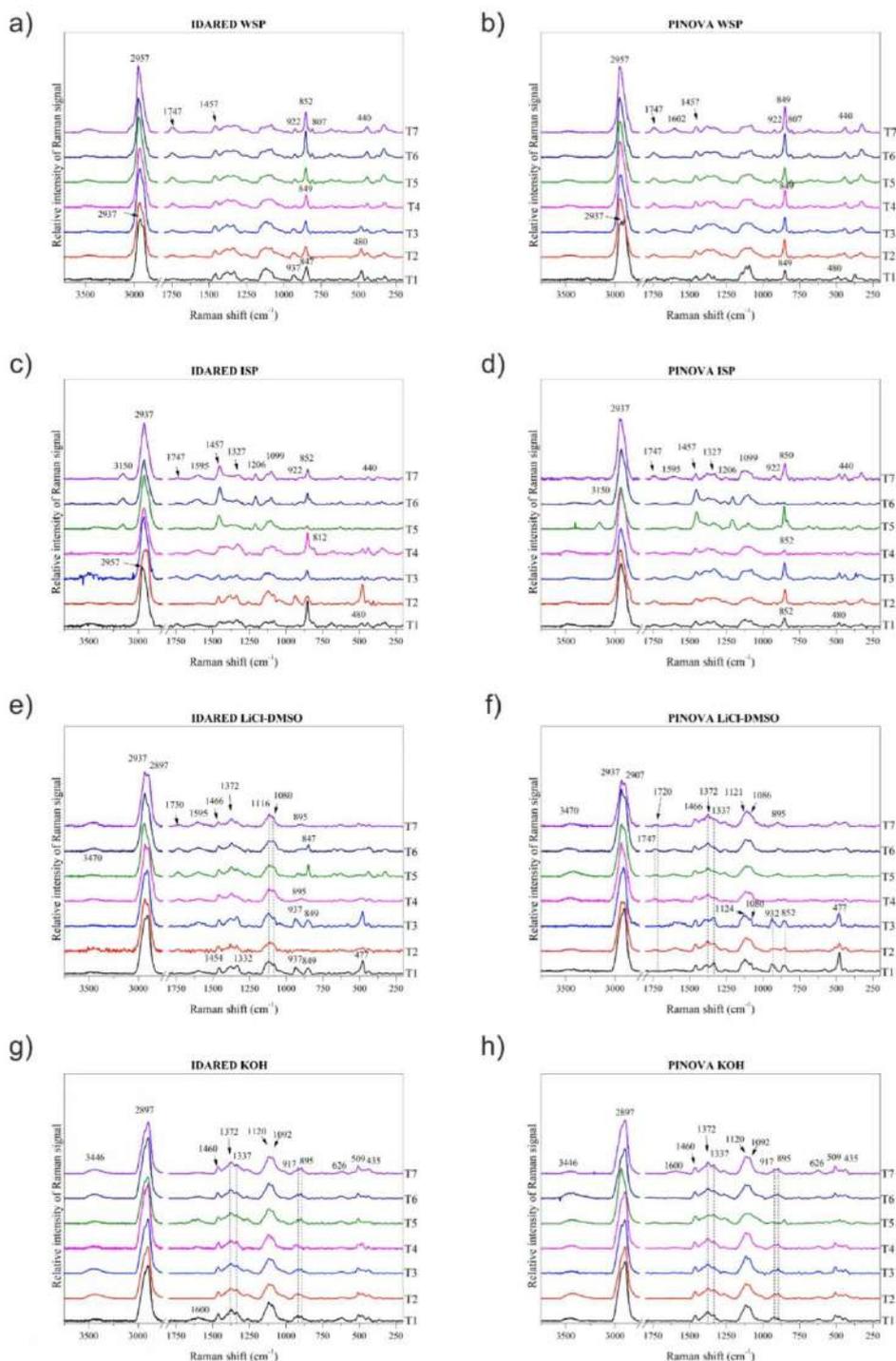


Fig. 3. Raman spectra in the range $3750\text{--}200\text{ cm}^{-1}$ (the region $2750\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ was cut-off due to lack of spectral features) of pectin-rich and hemicellulose-rich polysaccharide fractions of CWM of apples at T1-T3 (pre-harvest), T4 (optimal harvest) and T5-T7 (post-harvest storage): (a) WSP Idared, (b) WSP Pinova, (c) ISP Idared, (d) ISP Pinova (e) LiCl-DMSO Idared, (f) LiCl-DMSO Pinova, (g) KOH Idared, (h) KOH Pinova. WSP, water-soluble pectins; ISP, imidazole-soluble pectins; LiCl-DMSO, LiCl-DMSO-soluble acetylated hemicelluloses; KOH, $4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH-soluble deacetylated hemicelluloses.

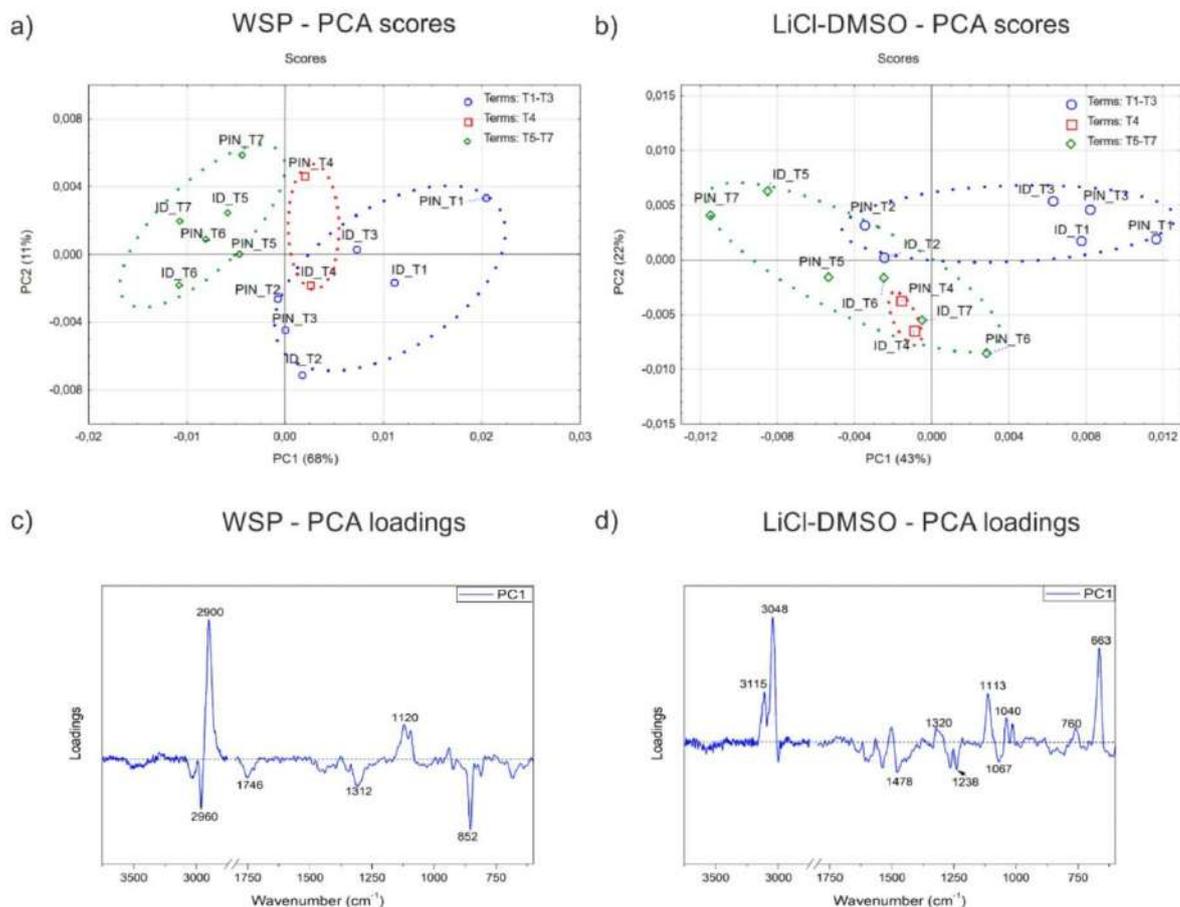


Fig. 4. PCA results of the 3750–2750 and 1800–650 cm^{-1} region in the Raman spectra of the WSP and LiCl-DMSO fractions of the CWM of Idared and Pinova apples at T1-T3 (pre-harvest), T4 (optimal harvest) and T5-T7 (post-harvest storage): (a) PCA scores plot for WSP, (b) PCA scores plot for LiCl-DMSO and (c) PCA loading plot for WSP, (d) PCA loading plot for LiCl-DMSO. WSP, water-soluble pectins; LiCl-DMSO, LiCl-DMSO-soluble acetylated hemicelluloses; ID, Idared; PIN, Pinova.

were scattered on the negative side of the PC1 axis. The scores didn't show any tendency to cluster along PC2. The analysis of PC1 loadings vs. Raman shift shows that the wavenumbers 2900 and 1120 cm^{-1} had the greatest influence on the scores scatters on the positive side of PC1, while wavenumbers 2960, 1746, 1312, and 852 cm^{-1} and assigned to the pectin with a higher degree of esterification – on the scores on the negative side of PC1 (Fig. 4c).

The PCA analysis of the LiCl-DMSO fraction wasn't so clear (Fig. 4b). The PC1 (43 %) vs. PC2 (24 %) scores plot showed that scores obtained for Pinova T1 and T3, Idared T1 and T3 formed one cluster with Pinova T6 on the positive side of PC1, while the rest of the scores were placed on the negative side of PC1 and randomly scattered along PC2. The analysis of loadings showed a positive influence on the scores scattering of 663, 760, 1040, 1113, 1320, 3048, and 3115 cm^{-1} wavenumbers (Fig. 4d). The loadings at 1040, and 1113 cm^{-1} correspond to $\nu\text{C}-\text{C}/\text{C}-\text{O}$ (Synytsya et al., 2003) and can be assigned generally to the saccharide ring. While negative influence had wavenumbers 1067, 1238, and 1478 cm^{-1} which can be assigned to acetylated hemicellulose. However, there was no clear effect of acetylation of hemicelluloses on the distribution of results. The LiCl-DMSO fraction is hemicelluloses with a relatively low degree of acetylation, and also the characteristic band from the vibration of the carbonyl group on the Raman spectrum is less intense than that for IR.

3.5. Raman maps

The T1 (pre-harvest maturity), T4 (optimal harvest maturity), and T7 (3-month post-harvest cold storage) terms were selected for Raman microscopy to capture changes in the distribution and localization of cell wall polysaccharides during apple fruit development. The cell junction area was selected because the integrity of this site determines the integrity of the tissue, and because it is possible to obtain an image of the cell wall of three different adjacent cells. Hyperspectral Raman maps were analyzed using a preliminary analysis of single-band intensity distribution (Fig. 5), multivariate image analysis (true component analysis) based on the reference spectra of individual fractions of polysaccharides isolated at a given term (Fig. 6), and the spectra of high- and low-esterified pectins (Fig. 7).

3.5.1. Single Raman band imaging

The Raman average spectra of CWM are presented in Fig. S2. On this basis, the marker band at ca. 2933 cm^{-1} assigned to νCH in all cell wall polysaccharides was selected to depict the cell wall. In the preliminary analysis, we also endeavored to localize cellulose using the 1090 cm^{-1} marker. However, this band is assigned to $\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$ of β -glycosidic linkage (cellulose, xyloglucan) and also to $\nu\text{C}-\text{C}$, $\nu\text{C}-\text{O}$, ring vibration in other hemicelluloses (glucomannan or xylan for example).

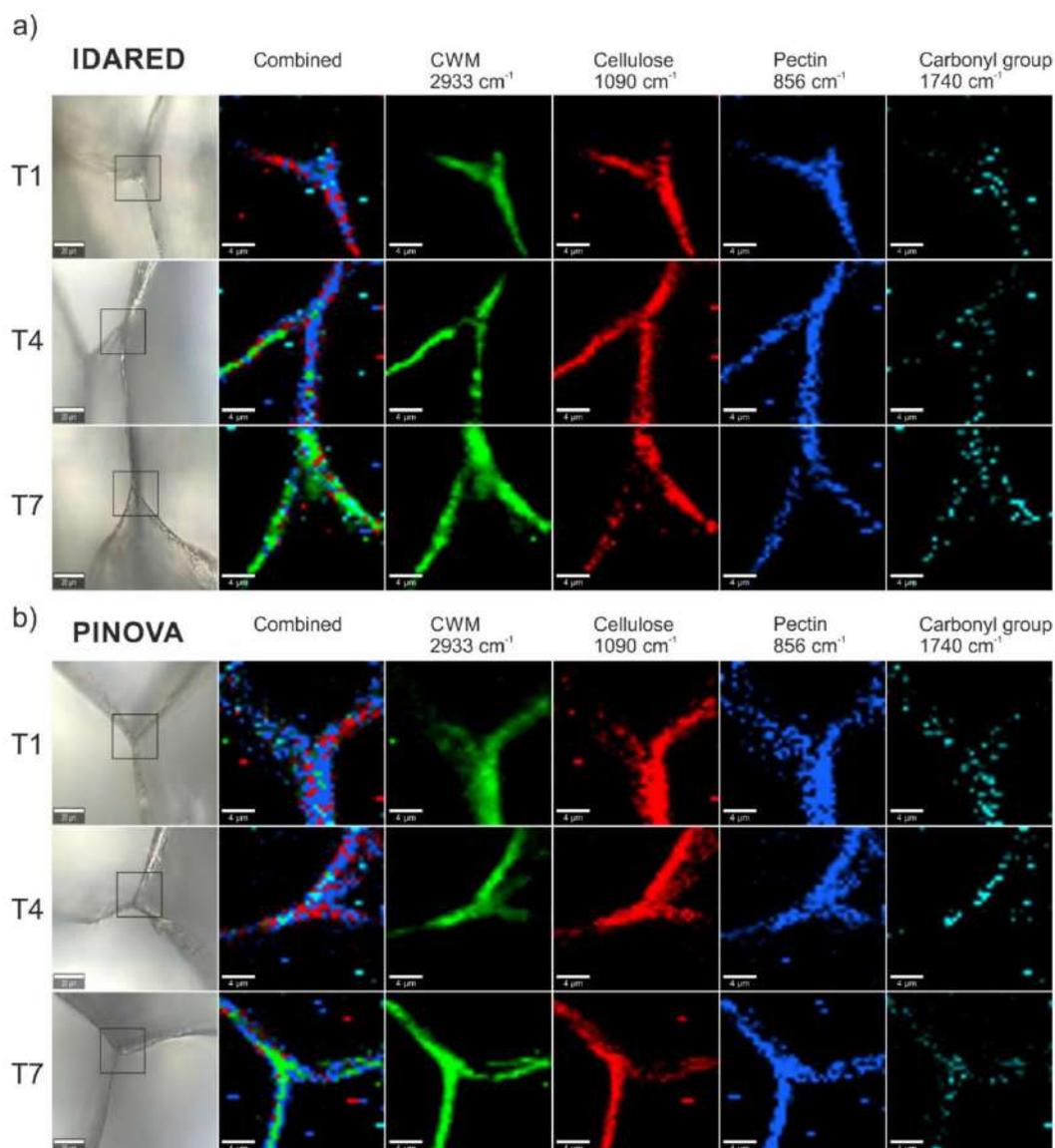


Fig. 5. Raman imaging of CWM, cell wall material (2933 cm^{-1}), cellulose (1090 cm^{-1}), pectin (856 cm^{-1}), carbonyl group (1740 cm^{-1}) in the cell wall of Idared (a) and Pinova (b) apples at T1 (pre-harvest), T4 (optimal harvest) and T7 (3-month post-harvest) terms. Microscopic image bars $20\text{ }\mu\text{m}$, Raman image bars $4\text{ }\mu\text{m}$.

Nevertheless, Agarwal (2006) demonstrated that the contribution of hemicelluloses to this band is lower, and masked by cellulose. Therefore, the 1090 cm^{-1} band, which is intense for cellulose, often served as its marker in Raman imaging analysis of the plant cell wall (Chylińska et al., 2014; Huang et al., 2019). The band at approx. 850 cm^{-1} is the most characteristic of pectic polysaccharides and is used to present the distribution of this polysaccharide family (Chylińska et al., 2014; He et al., 2020). Finally, the broad band between 1750 and 1720 cm^{-1} is characteristic of the stretching vibrations of the carbonyl group in the carboxyl, ester, and acetyl groups. For pectins, the carbonyl group may originate from the carboxyl group of galacturonic acid, methyl, and acetyl esters (Schulz et al., 2014; Synytsya et al., 2003). However, for hemicelluloses, the carbonyl group is mainly identified as the presence

of an acetyl group (Ponzecchi et al., 2024). In the case of glucuronarabinoxylan, the intensity of this characteristic band could be affected by the vibration of the carboxyl group of glucuronic acid. However, this is more relevant when analysing the spectra of hemicelluloses isolated from commelinid monocots, such as grasses, which are more abundant in glucuronarabinoxylans as opposed to dicots such as apples, where they are found in trace amounts.

Hyperspectral analysis of Raman maps marked by characteristic bands (combined image, Fig. 5) showed that pectin polysaccharides (blue color, intensity distribution of band at 856 cm^{-1}), were dominant and evenly distributed in the whole cell wall for both apple varieties at the pre-harvest date (T1) and harvest date (T4). At T4 for Idared, a component of the cell wall (green color, intensity distribution of band at

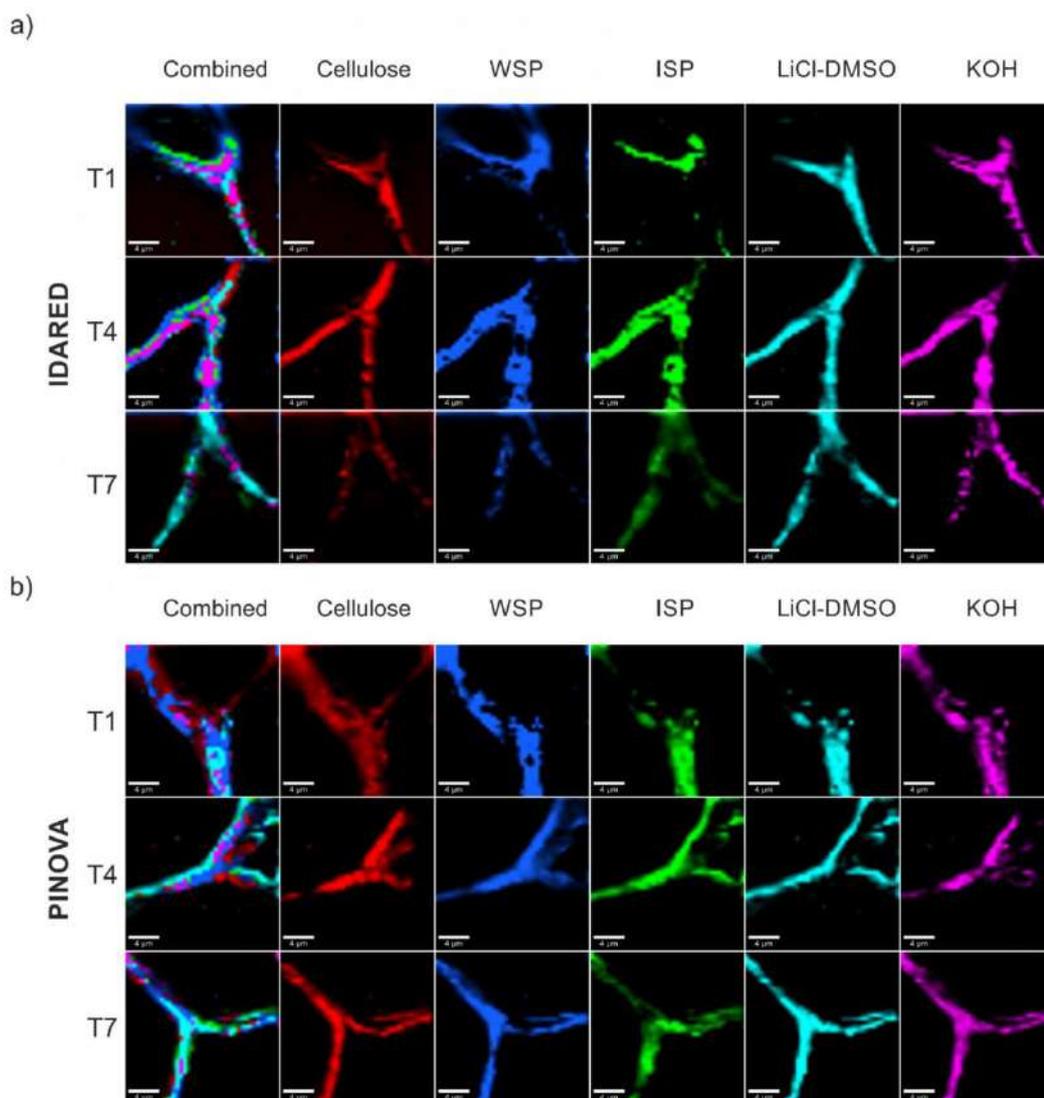


Fig. 6. Raman Imaging of distribution of each cell wall component: water-soluble pectins (WSP), imidazole-soluble pectins (ISP), LiCl-DMSO-soluble acetylated hemicelluloses (LiCl-DMSO), $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KOH-soluble deacetylated hemicelluloses (KOH), cellulose in the cell wall of Idared (a) and Pinova (b) apples at T1 (pre-harvest), T4 (optimal harvest) and T7 (3-month post-harvest) terms as the result of the true component analysis. Raman image bars $4 \mu\text{m}$.

2933 cm^{-1}) other than pectin and cellulose (red color, intensity distribution of band at 1090 cm^{-1}), which probably can be identified as hemicellulose, was visible in one part of the wall. After three months of post-harvest cold storage (T7), there was a noticeable decrease in pectin content, especially for Idared. This is, however in contrary to the results of monosaccharide composition showing that the content of galacturonic acid in the WSP and ISP fractions of both cultivars rather increased (Pękala et al., 2025). On the other hand, previously it was shown by Raman microscopy that in both tomato and apple ripening, the amount of pectin decreases and its distribution goes from concentrated in the central lamella to distributed evenly in the cell wall (Chylińska et al., 2017; Szymańska-Chargot et al., 2016). The band at 2933 cm^{-1} was the most intense for Idared at T7. Presumably, after partial pectin degradation, these may be hemicellulose polysaccharides. Basically, the green color (intensity distribution of band at 2933 cm^{-1}) should indicate the

presence of all polysaccharides of the cell wall material (cellulose, pectins, and hemicelluloses). But if pectins were dominant, then the color blue should dominate, and in the case of cellulose, it would be red. So, in the case of visible degradation of pectic polysaccharides (less blue color, intensity distribution of band at 856 cm^{-1}), the green color could come from the presence of the remaining component of the cell wall hemicellulose. Unfortunately, it is impossible to unambiguously localize hemicelluloses in apple tissue using specific markers of characteristic bands, due to overlapping bands originating from cellulose. Therefore, in the next part, Raman imaging combined with multivariate data analysis was carried out using spectra of individual fractions of pectic and hemicellulose polysaccharides and cellulose isolated from apples.

For cellulose, analysis with the 1090 cm^{-1} marker, which reflects mainly the distribution of cellulose, showed only a slight decrease in the band intensity in the cell wall of Idared and Pinova apples at T7, with no

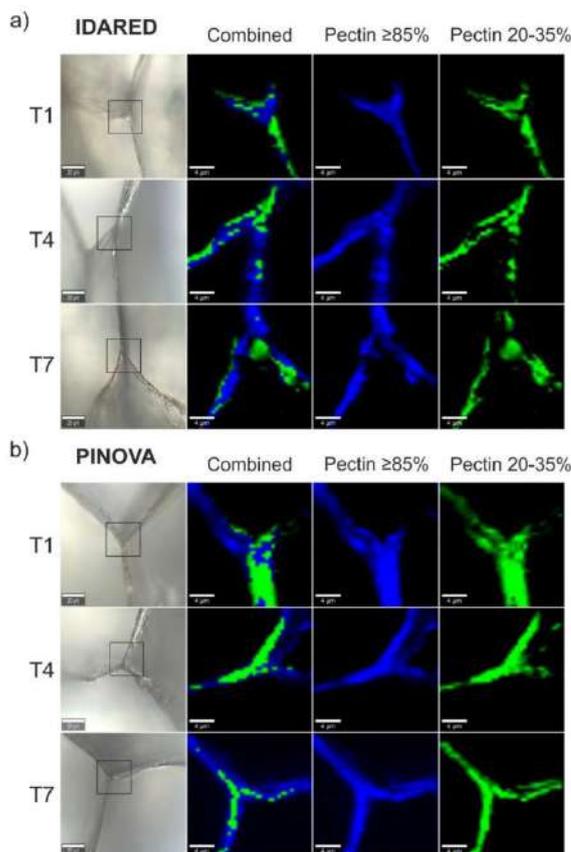


Fig. 7. Raman Imaging of distribution of low-esterified pectin (PEC DE 20–34 %) and high-esterified pectins (PEC DE \geq 85 %) in the cell wall of Idared (a) and Pinova (b) apples at T1 (pre-harvest), T4 (optimal harvest) and T7 (3-month post-harvest) terms as the result of the true component analysis. Microscopic image bars 20 μm , Raman image bars 4 μm .

differences between varieties. Perhaps these amounts were over-estimated by the contribution of hemicelluloses, since, as mentioned above, the 1090 cm^{-1} band occurs for cellulose, and also for hemicelluloses. Raman images showed that cellulose at the T1-T4 terms is covered mainly by pectins, while at T7 by other cell wall components, probably hemicelluloses.

The presence of the carbonyl group of polysaccharides, as the intensity distribution of the band at 1740 cm^{-1} (turquoise color), was identified in the cell wall in predictably small amounts, and its distribution in the wall did not indicate specific clusters. For T1 and T4 terms, where pectin predominates (blue color, intensity distribution of band at 856 cm^{-1}), the marked presence of carbonyl groups may indicate the presence of esterified pectin, especially for Pinova. Interestingly, for T7, the presence of pixels with turquoise color may indicate the presence of more carbonyl groups and was observed for polysaccharides of Idared apples. Assuming that these were probably hemicelluloses due to the pectin degradation, we can speculate that the Raman images show a higher content of acetylated hemicelluloses at T7 for Idared than for Pinova. These assumptions are consistent with our previous studies (Pękala et al., 2025), in which we showed a higher degree of acetylation of hemicelluloses at T7: 6.32 wt% in Idared apples than 4.32 wt% in Pinova using a quantitative method, namely high-performance liquid chromatography.

3.5.2. True component analysis

True component analysis was carried out to show the distribution of cell wall polysaccharides, distinguishing higher- and lower-esterified pectins, cellulose with hemicelluloses, and acetylated and deacetylated hemicelluloses. For this purpose to obtain the best possible fit, the analysis was carried out on the average spectra of the entire $4000\text{--}0\text{ cm}^{-1}$ wavenumber range of WSP, ISP, LiCl-DMSO, KOH fractions at the terms T1, T4, and T7 (Fig. 3a-h) and microfibrillar cellulose Fig. S3. As described earlier, the WSP fraction contains pectin with a higher degree of esterification than ISP pectin, LiCl-DMSO contains acetylated hemicelluloses, while KOH contains deacetylated hemicelluloses. The obtained color maps show the distribution of each polysaccharide fraction in the given cell wall (Fig. 6).

Pectins of the WSP fraction predominated at T1 and T4, while there was a decrease at T7 for both apple varieties. The Pinova variety seemed to have a higher content of highly esterified WSP than the Idared variety at T1-T4 based on combined images. The localisation of WSP and ISP fraction pectins in the cell wall was similar, only subtle differences were observed for Idared T1 where ISP (low-esterified) pectins were accumulated in the corners of the wall. In general, pectins of the WSP fraction were distributed fairly evenly in the cell wall, while pectins of the ISP fraction accumulated locally near the wall junctions from the three cells, as concluded from the combined images. The degree of esterification of pectins changes during plant development, which we also confirmed in our analysis of FT-IR spectra (Fig. 1a,b,d) and quantitatively in earlier work (Pękala et al., 2025). In general, the WSP fractions were pectins with a higher degree of esterification than the pectins of the ISP fraction, but the degree of esterification of these pectin polysaccharides changed at the T1-T7 terms. Therefore, to visualize the location of strictly highly and lowly esterified pectins, the same for all terms, a true component analysis (Fig. 7) was carried out based on the spectra of DE \geq 85 % pectins and DE 20–35 % pectins (Fig. S3). High-esterified pectins were shown to be evenly distributed along whole cell walls, while low-esterified pectins, were less evenly distributed, formed subtle clusters, and this was most evident at T7, where they accumulate in the cell wall corner. This is consistent with previous reports by Leszczuk et al. (2019) using another method, immunocytochemistry, which showed that deesterified HG was present within and strictly in the corners of cell junctions and highly esterified HG was present throughout the cell wall surface of Gala Must apples. In addition, they showed that the localization of deesterified HG tightly in the corners of cell junctions was particularly evident for apples after three months of storage, similar to our study for low-esterified pectin. Also, the study by Yang et al. (2022) showed that deesterified homogalacturonan was concentrated in the corners of the three cellular junctions of Honeycrisp apples. The content of high- and low-esterified pectin depends not only on the developmental stage of apples but also on their variety. The study by Li et al. (2020) showed differences between varieties, namely, at the immature and mature stages, apples which become mealy rapidly (Hongjiangjun and Gala, 3 days) contained more unmethylated HG, while apples which become mealy moderately, slowly and non-mealy (Red Delicious, 7 days; Ralls Genet, 14 days; Fuji, 49 days, respectively) contained more highly methylated HG. In this work, Raman imaging showed that at pre-harvest and harvest maturity dates (T1, T4), Pinova apples presumably contained mainly pectin of the WSP (higher-esterified) fraction. Importantly, Idared apples significantly lose firmness during three-month post-harvest storage compared to Pinova, which maintains firmness (Pękala et al., 2025). Therefore, the higher content of high-esterified pectins at ripening and harvest maturity may be related to maintaining apple firmness during post-harvest storage.

Importantly, a distinction was shown between cellulose and hemicelluloses of the LiCl-DMSO and KOH fractions. This was most evident for Idared T7, where hemicelluloses were still identified (Fig. 6, combined image turquoise and magenta color). In addition, it was shown that acetylated hemicelluloses of the LiCl-DMSO fraction predominated

at T7 in contrast to KOH deacetylated hemicelluloses for both apple varieties. In general, the hemicelluloses of the LiCl-DMSO and KOH fractions were distributed along the entire cell wall, with no clear clusters, but a more uniform distribution was observed for the acetylated LiCl-DMSO hemicelluloses.

In the analysis of acetylated hemicelluloses in the cell wall, the distribution into high-acetylated and low-acetylated hemicelluloses was not investigated, because the natively acetylated hemicelluloses in the cell wall had a low degree of acetylation, as presented in the LiCl-DMSO fraction spectra (Fig. 1 e,f). The distribution of pectins in the cell wall seemed to be more fuzzy, while hemicelluloses seemed to form a more slender arrangement, which was mainly noticeable for Idared. Presumably, this may have been related to the cutting of the apple tissue during which a subtle blurring of pectins, which are less bonded to cellulose than hemicelluloses in the plant's cell wall, may have occurred.

4. Conclusion

FT-IR, Raman spectroscopy, and Raman imaging have provided insight into the characteristics of structural changes in polysaccharides and their distribution in the apple cell wall during fruit development. Moreover, these studies identify FT-IR and Raman bands specific to acetyl groups, which are shifted in hemicelluloses compared to pectins.

The spectra of WSP and ISP fractions confirmed the presence of bands characteristic of pectins, with differences in the degree of esterification. Overall, the pectins in the WSP fraction had a higher degree of esterification than those in the ISP. In addition, the degree of esterification of WSP pectins increased during fruit development.

The spectra of the LiCl-DMSO and KOH fractions showed characteristic bands for hemicelluloses and bands indicating different compositions. The LiCl-DMSO fraction consisted mainly of glucomannans and xyloglucans, while the KOH fraction consisted of xyloglucans. Spectra of the LiCl-DMSO fraction contained bands confirming the presence of natively acetylated hemicelluloses and an increase in the degree of acetylation during the period from pre-harvest maturity to post-harvest storage.

Based on PCA analysis of both FT-IR and Raman spectroscopy results, it was observed that the distribution of results for acetylated hemicelluloses was influenced by bands associated with the acetyl group. Moreover, a clear distribution of results specifically for the pre-harvest, optimal harvest, and post-harvest storage periods was obtained for FT-IR results, where the distribution was influenced by bands from the acetyl group and also mannan. Therefore, we emphasise that acetylated glucomannan is an essential marker of modifications occurring in the cell wall during fruit development.

Raman imaging with True Component Analysis based on the overall spectra of individual polysaccharide fractions isolated from the apple cell wall was shown to allow a more accurate localisation of these polysaccharides in the cell wall compared to a method using specific markers of characteristic bands. The distribution of cellulose, pectins, and hemicelluloses in the plant cell wall was presented. Interestingly, a distinction was made between the location of highly esterified (WSP) and low esterified (ISP) pectin fractions, as well as acetylated (LiCl-DMSO) and deacetylated (KOH) hemicelluloses. It was observed that after three months of post-harvest storage, pectins were less abundant in the cell wall, in contrast to acetylated hemicelluloses. The esterification of pectins and hemicelluloses affected their distribution in the cell wall. Highly esterified pectins were evenly distributed in the wall, while low-esterified pectins accumulated in the corners of the wall. In general, hemicelluloses did not form specific clusters in the cell wall, but low-acetylated hemicelluloses of the LiCl-DMSO fraction were more evenly distributed in the cell wall. Differences between apple varieties were also observed: in Idared apples (described as soft) in post-harvest storage, the abundance of acetylated hemicelluloses was more pronounced than in Pinova apples (described as firm). However, it should be emphasized that the Raman imaging method is time-consuming, and

this limitation determines the narrow scanning area of the sample tissue.

The study highlighted the role of acetylated hemicelluloses in the dynamics of changes occurring in apple cell walls during post-harvest storage, determined employing FT-IR and Raman spectroscopy. Therefore, it will contribute to a better understanding of changes in polysaccharide composition and distribution in the plant cell wall in relation to fruit ripening and postharvest storage. This is crucial not only for assessing fruit quality but also for selecting the appropriate raw material for extracting polysaccharides with specific structures and functional groups.

CRedit authorship contribution statement

P. Pękala: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **M. Szymańska-Chargot:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **A. Zdunek:** Writing – review & editing.

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.

Acknowledgment

This research was funded in whole or in part by National Science Center-Poland projects nr NCN PRELUDIUM BIS UMO-2020/39/O/NZ9/00241.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.146129>.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- Adebawo, F., Sadeghifar, H., Tilotta, D., Jameel, H., Liu, Y., & Lucia, L. (2019). Spectroscopic interrogation of the acetylation selectivity of hardwood biopolymers. *Starch/Stärke*, 71(11–12). <https://doi.org/10.1002/star.201900086>
- Agarwal, U. P. (2006). Raman imaging to investigate ultrastructure and composition of plant cell walls: Distribution of lignin and cellulose in black spruce wood (*Picea mariana*). *Planta*, 224(5). <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0295-z>
- Albaladeh, A. A., Berhe, A. A., & Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 97(2). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>
- Albersheim, P., Neukom, H., & Deuel, H. (1960). Splitting of pectin chain molecules in neutral solutions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 90(1), 46–51. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(60\)90609-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(60)90609-3)
- 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). [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80161-6](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80161-6)
- Barron, C., Robert, P., Guillon, F., Saulnier, L., & Rouau, X. (2006). Structural heterogeneity of wheat arabinoxylans revealed by Raman spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 341(9). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.03.025>
- Berglund, J., Kishani, S., Morais De Carvalho, D., Lawoko, M., Wohlerl, J., Henriksson, G., ... Vilaplana, F. (2020). Acetylation and sugar composition influence the (m)solubility of plant β -Mannans and their interaction with cellulose surfaces. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(27). <https://doi.org/10.1021/acscuschemeng.0c01716>
- Bi, R., Berglund, J., Vilaplana, F., McKee, L. S., & Henriksson, G. (2016). The degree of acetylation affects the microbial degradability of mannans. *Polymer Degradation and Stability*, 133, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.polydegradstab.2016.07.009>
- Bicely, P., Malovíková, A., Hirsch, J., Morkeberg Krogh, K. B. R., & Ebringerová, A. (2015). The role of the glucuronoxylan carboxyl groups in the action of endoxylanases of three glycoside hydrolase families: A study with two substrate

- mutants. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850(11). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.07.003>
- Billy, L., Mehinagic, E., Royer, G., Renard, C. M. G. C., Arvisenet, G., Prost, C., & Jourjon, F. (2008). Relationship between texture and pectin composition of two apple cultivars during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 47(3). <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.07.011>
- Brownleader, M. D., Jackson, P., Mobasheri, A., Pantelides, A. T., Sumar, S., Trevan, M., & Dey, P. M. (1999). Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(2). <https://doi.org/10.1080/10408399908500494>
- Broxterman, S. E., van Erven, G., & Schols, H. A. (2018). The solubility of primary plant cell wall polysaccharides in LiCl DMSO. *Carbohydrate Polymers*, 200. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.083>
- Cavalier, D. M., & Keegstra, K. (2006). Two xyloglucan xylosyltransferases catalyze the addition of multiple xylosyl residues to cellosexan. *Journal of Biological Chemistry*, 281(45). <https://doi.org/10.1074/jbc.M606379200>
- Chylińska, M., Szymańska-Chargot, M., Deryto, K., Tchórzewska, D., & Zdunek, A. (2017). Changing of biochemical parameters and cell wall polysaccharides distribution during physiological development of tomato fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 119, 328–337. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.09.010>
- Chylińska, M., Szymańska-Chargot, M., & Zdunek, A. (2014). Imaging of polysaccharides in the tomato cell wall with Raman microspectroscopy. *Plant Methods*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-14>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.121>
- Coimbra, M. A., Barros, A., Barros, M., Rutledge, D. N., & Delgadillo, I. (1998). Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 37(3). [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00066-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00066-6)
- Coimbra, M. A., Barros, A., Rutledge, D. N., & Delgadillo, I. (1999). FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts. *Carbohydrate Research*, 317(1–4). [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00071-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00071-3)
- Darvill, A. G., McNeil, M., & Albersheim, P. (1978). Structure of plant cell walls: VIII. A new pectic polysaccharide. *Plant Physiology*, 62(3). <https://doi.org/10.1104/pp.62.3.418>
- De Vries, J. A., Den Uijl, C. H., Voragen, A. G. J., Rombouts, F. M., & Pilnik, W. (1983). Structural features of the neutral sugar side chains of apple pectic substances. *Carbohydrate Polymers*, 3(3). [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(83\)90018-8](https://doi.org/10.1016/0144-8617(83)90018-8)
- De Vries, J. A., Voragen, A. G. J., Rombouts, F. M., & Pilnik, W. (1984). Changes in the structure of apple pectic substances during ripening and storage. *Carbohydrate Polymers*, 4(1). [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(84\)90041-9](https://doi.org/10.1016/0144-8617(84)90041-9)
- Fasoli, M., Dell'Anna, R., Dal Santo, S., Balestrini, R., Sanson, A., Pezzotti, M., ... Zenoni, S. (2016). Pectins, hemicelluloses and celluloses show specific dynamics in the internal and external surfaces of grape berry skin during ripening. *Plant and Cell Physiology*, 57(6). <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw080>
- Ferreira, D., Barros, A., Coimbra, M. A., & Delgadillo, I. (2001). Use of FT-IR spectroscopy to follow the effect of processing in cell wall polysaccharide extracts of a sun dried pear. *Carbohydrate Polymers*, 45(2). [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00320-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00320-9)
- Fidalgo, A., Ciriminna, R., Camaroglio, D., Tamburino, A., Cravotto, G., Grillo, G., ... Pagliaro, M. (2016). Eco friendly extraction of pectin and essential Oils from Orange and lemon peels. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(4). <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01716>
- Fischer, M., Arrigoni, E., & Amadó, R. (1994). Changes in the pectic substances of apples during development and postharvest ripening. Part 2: Analysis of the pectic fractions. *Carbohydrate Polymers*, 25(3). [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90201-1](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90201-1)
- Fry, S. C. (1989). The structure and functions of xyloglucan. *Journal of Experimental Botany*, 40(1). <https://doi.org/10.1093/jxb/40.1.1>
- Fry, S. C. (1995). Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.pl.46.060195.002433>
- Fry, S. C. (2010). Cell Wall polysaccharide composition and covalent crosslinking. *Annual Plant Reviews, Plant Polysaccharides: Biosynthesis and Bioengineering*, 41. <https://doi.org/10.1002/9781444391015.ch1>
- Fu, G., Yue, P., Hu, Y., Li, N., Shi, Z., & Peng, F. (2018). Fractionation of DMSO-extracted and NaOH-extracted hemicelluloses by gradient ethanol precipitation from Neosinocalamus affinis. *International Journal of Polymer Science*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9587042>
- Gautreau, M., Durand, S., Paturel, A., Le Gall, S., Foucat, L., Falourd, X., ... Beaugrand, J. (2022). Impact of cell wall non-cellulosic and cellulosic polymers on the mechanical properties of flax fibre bundles. *Carbohydrate Polymers*, 291. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119599>
- Gawkowska, D., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2018). Cross-linking of sodium carbonate-soluble pectins from apple by zinc ions. *Carbohydrate Polymers*, 196. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.024>
- Gierlinger, N., Sapei, L., & Paris, O. (2008). Insights into the chemical composition of *Equisetum hyemale* by high resolution Raman imaging. *Planta*, 227(5). <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0671-3>
- Gierlinger, N., & Schwanninger, M. (2006). Chemical imaging of poplar wood cell walls by confocal Raman microscopy. *Plant Physiology*, 4, 1246–1254. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066993>
- Gille, S., & Pauly, M. (2012). O-acetylation of plant cell wall polysaccharides. *Frontiers in Plant Science*, 3(JAN). <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00012>
- Gross, K. C., & Sams, C. E. (1984). Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: A species survey. *Phytochemistry*, 23(11). [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84075-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84075-3)
- Harker, F. R., & Hallett, T. C. (1992). Physiological changes associated with development of meeliness of apple fruit during cool storage. *HortScience*, 27(12), 1291–1294.
- Hayashi, T. (1989). Xyloglucans in the primary Cell Wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.pl.40.060189.001035>
- He, Q., Zabolina, O. A., & Yu, C. (2020). Principal component analysis facilitated fast and noninvasive Raman spectroscopic imaging of plant cell wall pectin distribution and interaction with enzymatic hydrolysis. *Journal of Raman Spectroscopy*, 51(12). <https://doi.org/10.1002/jrs.6022>
- Hegde, S., & Maness, N. O. (1996). Sugar composition of pectin and hemicellulose extracts of peach fruit during softening over two harvest seasons. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(6), 1162–1167. <https://doi.org/10.21273/jashs.121.6.1162>
- Hersedia, A., Jiménez, A., & Guillén, R. (1995). Composition of plant cell walls. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 200(1). <https://doi.org/10.1007/BF01192903>
- Himmelsbach, D. S., & Akin, D. E. (1998). Near-infrared Fourier-transform Raman spectroscopy of flax (*Linum usitatissimum* L.) stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3). <https://doi.org/10.1021/jf970656k>
- Huang, W., Zhu, N., Zhu, C., Wu, D., & Chen, K. (2019). Morphology and cell wall composition changes in lignified cells from loquat fruit during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110975>
- Jaeger, S. R., Antúnez, L., Ares, G., Swaney Stueve, M., Jin, D., & Harker, F. R. (2018). Quality perceptions regarding external appearance of apples: Insights from experts and consumers in four countries. *Postharvest Biology and Technology*, 146. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.08.014>
- Jiang, S. L., Li, Y. X., Cui, Y. S., Dong, C., & Du, J. (2021). Isolation, purification and structural characterization of two pectin-type polysaccharides from *Coccoloba tinctoria* Nutt. And their proliferation activities on RAW264.7 cells. *Glycoconjugate Journal*, 38(2). <https://doi.org/10.1007/s10719-021-09982-y>
- Kacuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., & Ebringerová, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43(2). [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X)
- Kacuráková, M., & Wilson, R. H. (2001). Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*, 44(4). [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00245-9)
- Knee, M. (1973). Polysaccharide changes in cell walls of ripening apples. *Phytochemistry*, 12(7), 1543–1549. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80365-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80365-6)
- Koller, A., & Neukom, H. (1964). Detection of oligogalacturonic acids by thin-layer chromatography. *BBA - Specialized Section on Mucoproteins and Mucopolysaccharides*, 83(3). [https://doi.org/10.1016/0926-6526\(64\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0926-6526(64)90020-5)
- Kyonogasho, C., Christiaens, S., Shipgehman, A., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2015). FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit and vegetable based matrices. *Food Chemistry*, 176. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.033>
- Lahaye, M., Tabi, W., Le Bot, L., Delaire, M., Orsel, M., Campoy, J. A., ... Le Gall, S. (2021). Comparison of cell wall chemical evolution during the development of fruits of two contrasting quality from two members of the Rosaceae family: Apple and sweet cherry. *Plant Physiology and Biochemistry*, 168. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.10.002>
- Leszczuk, A., Chylińska, M., & Zdunek, A. (2019). Distribution of arabinogalactan proteins and pectins in the cells of apple (*malus × domestica*) fruit during post-harvest storage. *Annals of Botany*, 123(1). <https://doi.org/10.1093/aob/mcy133>
- Li, H., Wang, Y., Zhao, P., Guo, L., Huang, L., Li, X., & Gao, W. (2023). Naturally and chemically acetylated polysaccharides: Structural characteristics, synthesis, activities, and applications in the delivery system: A review. *Carbohydrate Polymers*, 313. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120746>
- Li, Q., Xu, R., Fang, Q., Yuan, Y., Cao, J., & Jiang, W. (2020). Analyses of microstructure and cell wall polysaccharides of flesh tissues provide insights into cultivar difference in mealy patterns developed in apple fruit. *Food Chemistry*, 321. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126707>
- Liu, X., Renard, C. M. G. C., Bureau, S., & Le Bourvellec, C. (2021). Revisiting the contribution of ATR-FTIR spectroscopy to characterize plant cell wall polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117935>
- Martins, J. R., Llanos, J. H. R., Botaro, V., Gonçalves, A. R., & Brienza, M. (2024). Hemicellulose biomass degree of acetylation (natural versus chemical acetylation) as a strategy for based packaging materials. *Bioenergy Research*. <https://doi.org/10.1007/s12155-024-10734-7>
- McCann, M. C., & Knox, J. P. (2010). Plant Cell Wall biology: Polysaccharides in architectural and developmental contexts. *Annual Plant Reviews, Plant Polysaccharides: Biosynthesis and Bioengineering*, 41. <https://doi.org/10.1002/9781444391015.ch14>
- McNeil, M., Darvill, A. G., & 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), 1128–1134. <https://doi.org/10.1104/pp.66.6.1128>
- Melton, L. D., Smith, B. G., Ibrahim, R., & Schröder, R. (2009). Mannans in primary and secondary plant cell walls. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 39(1).
- Mohamed, H. T., Untereiner, V., Sockalingum, G. D., & Brézillon, S. (2017). Implementation of infrared and Raman modalities for glycosaminoglycan

- characterization in complex systems. *Glycoconjugate Journal*, 34(3). <https://doi.org/10.1007/s10719-016-9743-6>
- Monsoor, M. A., Kalapathy, U., & Proctor, A. (2001). Improved method for determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6). <https://doi.org/10.1021/jf0009448>
- 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). <https://doi.org/10.1093/aob/mcr149>
- Pauly, M., & Keegstra, K. (2016). Biosynthesis of the plant Cell Wall matrix polysaccharide xyloglucan. *Annual Review of Plant Biology*, 67. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112222>
- Pauly, M., & Ramírez, V. (2018). New insights into wall polysaccharide o-acetylation. In, vol. 9. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01210>
- Pękala, P., Szymańska Chargot, M., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2025). Monosaccharide composition and degree of acetylation of non-cellulosic cell wall polysaccharides and their relationship to apple firmness. *Food Chemistry*, 470, Article 142639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.142639>
- Peng, F., Bian, J., Peng, P., Xiao, H., Ren, J. L., Xu, F., & Sun, R. C. (2012). Separation and characterization of acetyl and non-acetyl hemicelluloses of *Arundo donax* by ammonium sulfate precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(16). <https://doi.org/10.1021/jf3000828>
- Philippe, S., Barron, C., Robert, P., Devaux, M. F., Saulnier, L., & Guillon, F. (2006). Characterization using Raman microspectroscopy of arabinoxylans in the walls of different cell types during the development of wheat endosperm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14). <https://doi.org/10.1021/jf060466m>
- Ponzecchi, A., Alfredsen, G., Fredriksson, M., Thybring, E. E., & Thygesen, L. G. (2024). Localization and characterisation of brown rot in two types of acetylated wood. *Cellulose*, 31(3). <https://doi.org/10.1007/s10570-023-05680-0>
- Ray, S., Vigouroux, J., Queimener, B., Bonnin, E., & Lahaye, M. (2014). Novel and diverse fine structures in LiCl-DMSO extracted apple hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 108(1). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.017>
- 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). Acetylation and methylation of homogalacturonans 1: Optimisation of the reaction and characterisation of the products. *Carbohydrate Polymers*, 39(3). [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00006-5)
- Rosenholm, C., Lundt, I., Christensen, T. M. I. E., & Young, N. W. G. (2003). Chemically methylated and reduced pectins: Preparation, characterisation by ¹H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties. *Carbohydrate Research*, 338(7). [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00440-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00440-8)
- Santos, E. E., Amaro, R. C., Bustamante, C. C. C., Guerra, M. H. A., Soares, L. C., & Froes, R. E. S. (2020). Extraction of pectin from agroindustrial residue with an ecofriendly solvent: Use of FTIR and chemometrics to differentiate pectins according to degree of methyl esterification. *Food Hydrocolloids*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105921>
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Schulz, H., Krämer, A., Naumann, A., & Gudi, G. (2014). *Infrared and Raman spectroscopic mapping and imaging of plant materials*. 6. Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9783527678136.ch6> (Vol. 9783527336524).
- Steele, N. M., McCann, M. C., & Roberts, K. (1997). Pectin modification in cell walls of ripening tomatoes occurs in distinct domains. *Plant Physiology*, 114(1), 373–381. <https://doi.org/10.1104/pp.114.1.373>
- Smyntysva, A., Čopíková, J., Matějka, P., & Machovič, V. (2003). Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydrate Polymers*, 54(1). [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00158-9)
- Szymańska Chargot, M., Chylińska, M., Kruk, B., & Zdunek, A. (2015). Combining FT-IR spectroscopy and multivariate analysis for qualitative and quantitative analysis of the cell wall composition changes during apples development. *Carbohydrate Polymers*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.039>
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Pieczywek, P. M., Rösch, P., Schmitt, M., Popp, J., & Zdunek, A. (2016). Raman imaging of changes in the polysaccharides distribution in the cell wall during apple fruit development and senescence. *Planta*, 243(4). <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2456-4>
- Szymańska Chargot, M., Pękala, P., Siemińska Kuczer, A., & Zdunek, A. (2024). A determination of the composition and structure of the polysaccharides fractions isolated from apple cell wall based on FT-IR and FT-Raman spectra supported by PCA analysis. *Food Hydrocolloids*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109688>
- Szymańska-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). <https://doi.org/10.1007/s11483-012-9279-7>
- Weinstein, L., & Albersheim, P. (1979). Structure of plant cell walls. *Plant Physiology*, 63(3). <https://doi.org/10.1104/pp.63.3.425>
- Xu, C., Leppänen, A. S., Eklund, P., Holmlund, P., Sjöholm, R., Sundberg, K., & Willför, S. (2010). Acetylation and characterization of spruce (*Picea abies*) galactoglucomannans. *Carbohydrate Research*, 345(6). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.01.007>
- Yang, L., Cong, P., He, J., Bu, H., Qin, S., & Lyu, D. (2022). Differential pulp cell wall structures lead to diverse fruit textures in apple (*Malus domestica*). *Protoplasma*, 259(5). <https://doi.org/10.1007/s00709-021-01727-w>
- Yuen, S. N., Choi, S. M., Phillips, D. L., & Ma, C. Y. (2009). Raman and FTIR spectroscopic study of carboxymethylated non starch polysaccharides. *Food Chemistry*, 114(3). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.053>
- 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). <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). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12689>
- Zhang, B., Zhang, M., Shen, M., Li, H., Zhang, Z., Zhang, H., Zhou, Z., Ren, X., Ding, Y., Xing, L., & Zhao, J. (2021). Quality monitoring method for apples of different maturity under long-term cold storage. *Infrared Physics and Technology*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2020.103580>
- Zheng, B., Yang, H., Xu, X., Xiang, Z., Hong, Z., Zheng, H., Wu, A., & Li, H. (2023). Characterization of hemicellulose in *Cunninghamia lanceolata* stem during xylogenesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 246. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125530>

9.1. Materiały uzupełniające publikacji P.3

Supplementary Data

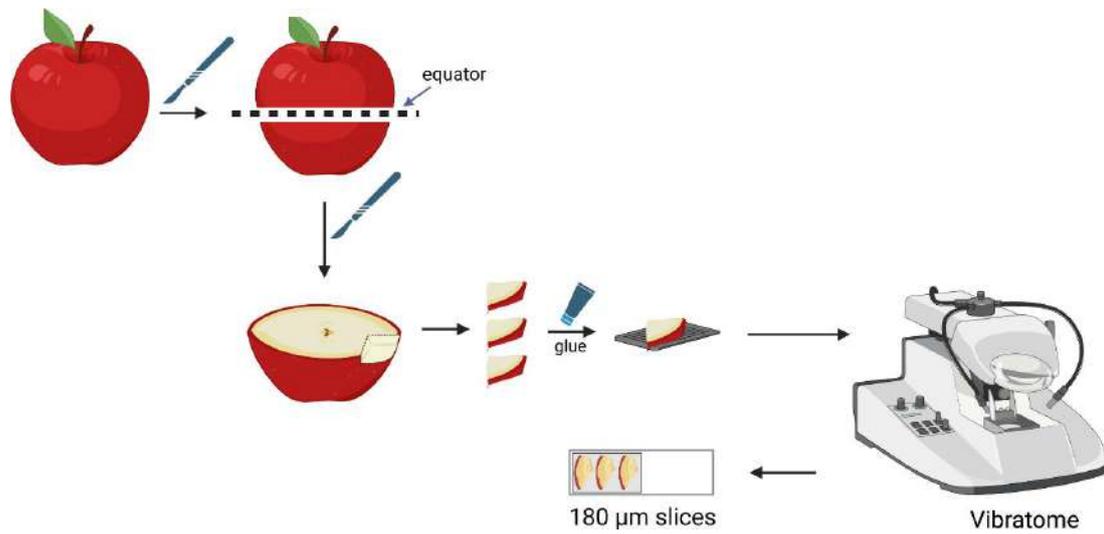


Fig. S1. Diagram of apple tissue preparation for Raman microscopy.

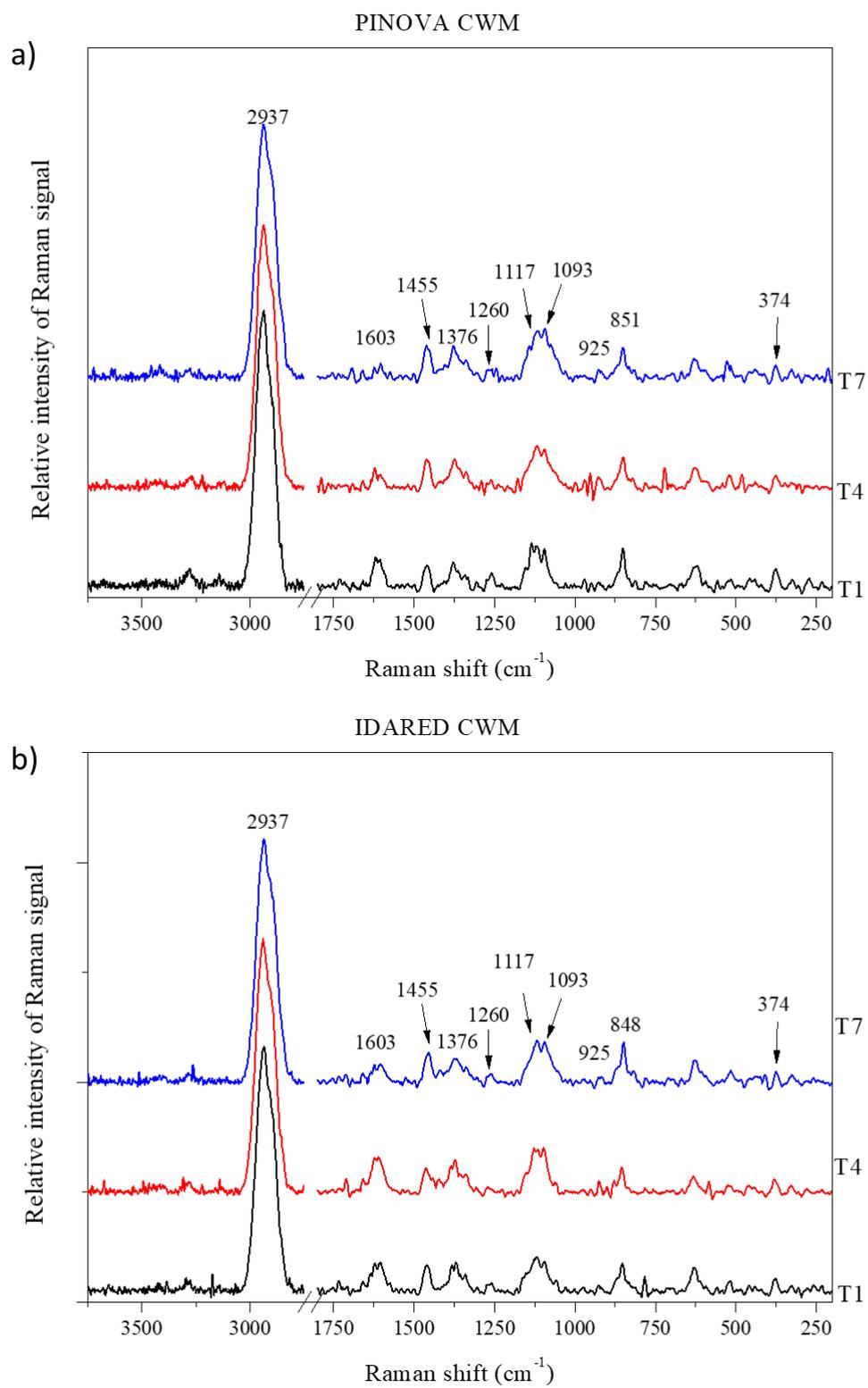


Fig. S2. Raman spectra in the range of 3750-2750 and 1750-200 cm⁻¹ extracted as an average spectrum from Raman maps obtained for terms T1, T4, and T7 of a) Pinova and b) Idared.

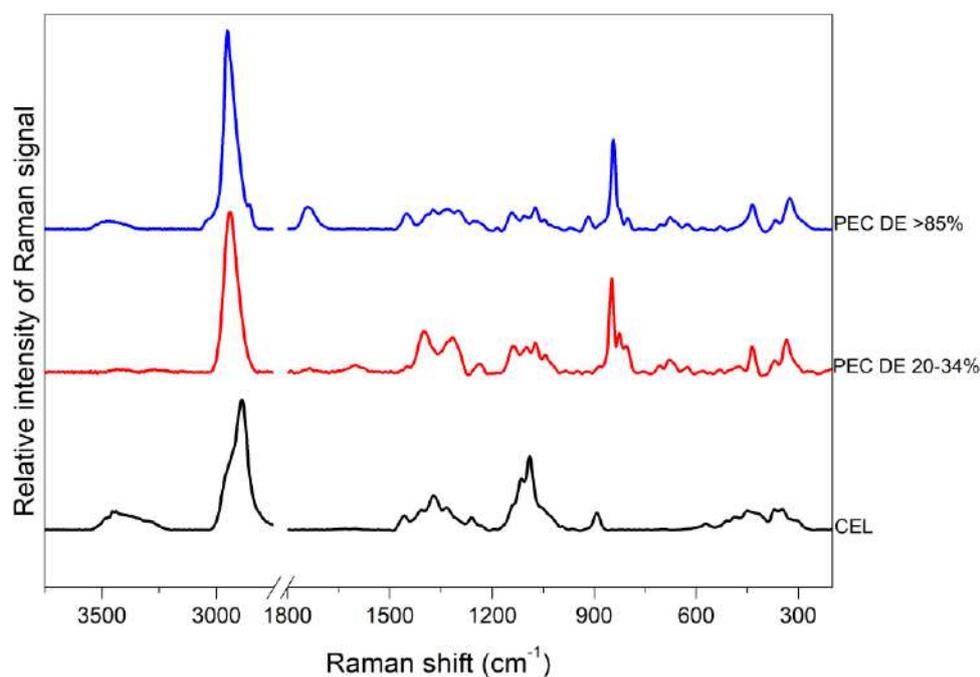


Fig. S3. Raman spectra in the range of 3750-2750 and 1800-250 cm^{-1} obtained for microfibrillar cellulose (CEL), low-esterified pectin (PEC DE 20-34%) and high-esterified pectins (PEC DE \geq 85%).

Table S1. The ratio of band intensity at 1740 cm^{-1} and 1601 cm^{-1} from FT-IR results for WSP (water-soluble pectin) and ISP (imidazole-soluble pectin).

	TERM	1740/1601 RATIO		TERM	1740/1601 RATIO
ID WSP	T1	1.248	ID ISP	T1	0.446
	T2	1.200		T2	0.497
	T3	1.154		T3	0.433
	T4	1.193		T4	0.489
	T5	1.532		T5	0.603
	T6	1.415		T6	0.395
	T7	1.541		T7	0.316
PIN WSP	T1	1.360	PIN ISP	T1	1.014
	T2	1.424		T2	1.148
	T3	1.342		T3	0.421
	T4	1.377		T4	0.546
	T5	1.363		T5	0.751
	T6	1.278		T6	0.333
	T7	1.539		T7	0.408

Table S2. Results of the degree of methylation and acetylation of polysaccharides of WSP, ISP, LiCl-DMSO, and KOH fractions based on data published in: Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2025). Monosaccharide composition and degree of acetylation of non-cellulosic cell wall polysaccharides and their relationship to apple firmness. *Food Chemistry*, 470, 142639

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.142639>

	Name	Fraction	Term	Mean	SD
Dm (%) ^a	ID	WSP	1	86,44	3,84
Dm (wt%) ^b	ID	WSP	1	4,50	0,22
Dac (wt%) ^c	ID	WSP	1	1,13	0,04
Dac (%) ^d	ID	WSP	1	5,58	0,33
Dm (%) ^a	ID	WSP	2	74,64	1,66
Dm (wt%) ^b	ID	WSP	2	5,49	0,37
Dac (wt%) ^c	ID	WSP	2	1,52	0,16
Dac (%) ^d	ID	WSP	2	6,24	0,84
Dm (%) ^a	ID	WSP	3	64,23	2,51
Dm (wt%) ^b	ID	WSP	3	4,91	0,21
Dac (wt%) ^c	ID	WSP	3	1,64	0,10
Dac (%) ^d	ID	WSP	3	7,32	0,81
Dm (%) ^a	ID	WSP	4	72,94	0,24
Dm (wt%) ^b	ID	WSP	4	6,44	0,57
Dac (wt%) ^c	ID	WSP	4	2,25	0,22
Dac (%) ^d	ID	WSP	4	9,48	0,22
Dm (%) ^a	ID	WSP	5	79,10	5,51
Dm (wt%) ^b	ID	WSP	5	8,61	1,00
Dac (wt%) ^c	ID	WSP	5	3,06	0,04
Dac (%) ^d	ID	WSP	5	11,69	1,01
Dm (%) ^a	ID	WSP	6	78,73	1,13
Dm (wt%) ^b	ID	WSP	6	7,87	0,50
Dac (wt%) ^c	ID	WSP	6	1,92	0,16
Dac (%) ^d	ID	WSP	6	7,11	0,40
Dm (%) ^a	ID	WSP	7	96,94	0,35
Dm (wt%) ^b	ID	WSP	7	10,84	0,78
Dac (wt%) ^c	ID	WSP	7	2,24	0,25
Dac (%) ^d	ID	WSP	7	7,42	0,43
Dm (%) ^a	ID	ISP	1	0,00	0,00
Dm (wt%) ^b	ID	ISP	1	0,00	0,00
Dac (wt%) ^c	ID	ISP	1	1,91	0,03
Dac (%) ^d	ID	ISP	1	6,95	0,89
Dm (%) ^a	ID	ISP	2	7,13	12,36
Dm (wt%) ^b	ID	ISP	2	0,68	1,18
Dac (wt%) ^c	ID	ISP	2	1,49	0,02
Dac (%) ^d	ID	ISP	2	5,08	0,48

Dm (%) ^a	ID	ISP	3	24,87	0,96
Dm (wt%) ^b	ID	ISP	3	2,77	0,31
Dac (wt%) ^c	ID	ISP	3	2,91	0,43
Dac (%) ^d	ID	ISP	3	10,43	1,27
Dm (%) ^a	ID	ISP	4	23,37	1,45
Dm (wt%) ^b	ID	ISP	4	2,55	0,16
Dac (wt%) ^c	ID	ISP	4	1,77	0,25
Dac (%) ^d	ID	ISP	4	5,20	1,06
Dm (%) ^a	ID	ISP	5	30,15	2,96
Dm (wt%) ^b	ID	ISP	5	5,14	0,86
Dac (wt%) ^c	ID	ISP	5	2,54	0,63
Dac (%) ^d	ID	ISP	5	5,51	1,43
Dm (%) ^a	ID	ISP	6	7,09	12,28
Dm (wt%) ^b	ID	ISP	6	1,23	2,13
Dac (wt%) ^c	ID	ISP	6	1,97	0,25
Dac (%) ^d	ID	ISP	6	3,46	0,72
Dm (%) ^a	ID	ISP	7	0,00	0,00
Dm (wt%) ^b	ID	ISP	7	0,00	0,00
Dac (wt%) ^c	ID	ISP	7	2,13	0,23
Dac (%) ^d	ID	ISP	7	4,11	0,25
Dm (%) ^a	PIN	WSP	1	97,13	0,19
Dm (wt%) ^b	PIN	WSP	1	6,33	0,66
Dac (wt%) ^c	PIN	WSP	1	1,53	0,25
Dac (%) ^d	PIN	WSP	1	6,95	0,78
Dm (%) ^a	PIN	WSP	2	91,22	2,31
Dm (wt%) ^b	PIN	WSP	2	7,63	0,65
Dac (wt%) ^c	PIN	WSP	2	2,30	0,26
Dac (%) ^d	PIN	WSP	2	9,90	0,77
Dm (%) ^a	PIN	WSP	3	97,65	2,09
Dm (wt%) ^b	PIN	WSP	3	6,51	0,33
Dac (wt%) ^c	PIN	WSP	3	1,89	0,14
Dac (%) ^d	PIN	WSP	3	9,62	1,62
Dm (%) ^a	PIN	WSP	4	86,55	9,65
Dm (wt%) ^b	PIN	WSP	4	5,69	0,72
Dac (wt%) ^c	PIN	WSP	4	1,80	0,23
Dac (%) ^d	PIN	WSP	4	11,35	0,44
Dm (%) ^a	PIN	WSP	5	76,48	2,87
Dm (wt%) ^b	PIN	WSP	5	6,92	0,56
Dac (wt%) ^c	PIN	WSP	5	2,34	0,28
Dac (%) ^d	PIN	WSP	5	12,23	0,37
Dm (%) ^a	PIN	WSP	6	65,67	1,85
Dm (wt%) ^b	PIN	WSP	6	5,54	0,32

Dac (wt%) ^c	PIN	WSP	6	1,27	0,15
Dac (%) ^d	PIN	WSP	6	5,25	0,42
Dm (%) ^a	PIN	WSP	7	63,54	3,28
Dm (wt%) ^b	PIN	WSP	7	5,97	0,32
Dac (wt%) ^c	PIN	WSP	7	1,08	0,09
Dac (%) ^d	PIN	WSP	7	3,13	0,83
Dm (%) ^a	PIN	ISP	1	46,28	0,93
Dm (wt%) ^b	PIN	ISP	1	3,34	0,14
Dac (wt%) ^c	PIN	ISP	1	1,37	0,16
Dac (%) ^d	PIN	ISP	1	5,52	0,94
Dm (%) ^a	PIN	ISP	2	59,02	6,23
Dm (wt%) ^b	PIN	ISP	2	4,75	0,64
Dac (wt%) ^c	PIN	ISP	2	1,53	0,03
Dac (%) ^d	PIN	ISP	2	5,97	0,28
Dm (%) ^a	PIN	ISP	3	31,78	2,97
Dm (wt%) ^b	PIN	ISP	3	2,25	0,16
Dac (wt%) ^c	PIN	ISP	3	2,00	0,36
Dac (%) ^d	PIN	ISP	3	10,49	1,10
Dm (%) ^a	PIN	ISP	4	35,37	2,56
Dm (wt%) ^b	PIN	ISP	4	2,71	0,12
Dac (wt%) ^c	PIN	ISP	4	2,54	0,21
Dac (%) ^d	PIN	ISP	4	13,23	0,75
Dm (%) ^a	PIN	ISP	5	29,38	0,76
Dm (wt%) ^b	PIN	ISP	5	2,05	0,23
Dac (wt%) ^c	PIN	ISP	5	1,76	0,27
Dac (%) ^d	PIN	ISP	5	9,16	0,35
Dm (%) ^a	PIN	ISP	6	0,00	0,00
Dm (wt%) ^b	PIN	ISP	6	0,00	0,00
Dac (wt%) ^c	PIN	ISP	6	1,32	0,13
Dac (%) ^d	PIN	ISP	6	5,00	0,71
Dm (%) ^a	PIN	ISP	7	0,00	0,00
Dm (wt%) ^b	PIN	ISP	7	0,00	0,00
Dac (wt%) ^c	PIN	ISP	7	1,42	0,21
Dac (%) ^d	PIN	ISP	7	4,07	0,84
Dm (wt%) ^b	ID	LiCl	1	2,48	0,18
Dac (wt%) ^c	ID	LiCl	1	2,31	0,16
Dm (wt%) ^b	ID	LiCl	2	2,66	0,32
Dac (wt%) ^c	ID	LiCl	2	3,24	0,61
Dm (wt%) ^b	ID	LiCl	3	2,94	0,18
Dac (wt%) ^c	ID	LiCl	3	3,12	0,21
Dm (wt%) ^b	ID	LiCl	4	2,75	0,66
Dac (wt%) ^c	ID	LiCl	4	3,57	0,72

Dm (wt%) ^b	ID	LiCl	5	5,36	0,40
Dac (wt%) ^c	ID	LiCl	5	4,23	0,65
Dm (wt%) ^b	ID	LiCl	6	2,83	0,42
Dac (wt%) ^c	ID	LiCl	6	3,99	0,72
Dm (wt%) ^b	ID	LiCl	7	4,41	0,60
Dac (wt%) ^c	ID	LiCl	7	6,32	0,35
Dm (wt%) ^b	ID	KOH	1	1,41	1,22
Dac (wt%) ^c	ID	KOH	1	0,05	0,04
Dm (wt%) ^b	ID	KOH	2	0,79	1,37
Dac (wt%) ^c	ID	KOH	2	0,04	0,02
Dm (wt%) ^b	ID	KOH	3	1,74	1,55
Dac (wt%) ^c	ID	KOH	3	0,04	0,03
Dm (wt%) ^b	ID	KOH	4	2,86	0,19
Dac (wt%) ^c	ID	KOH	4	0,11	0,05
Dm (wt%) ^b	ID	KOH	5	0,00	0,00
Dac (wt%) ^c	ID	KOH	5	0,15	0,05
Dm (wt%) ^b	ID	KOH	6	0,00	0,00
Dac (wt%) ^c	ID	KOH	6	0,35	0,00
Dm (wt%) ^b	ID	KOH	7	2,51	0,11
Dac (wt%) ^c	ID	KOH	7	0,15	0,02
Dm (wt%) ^b	PIN	LiCl	1	2,19	0,23
Dac (wt%) ^c	PIN	LiCl	1	1,60	0,53
Dm (wt%) ^b	PIN	LiCl	2	2,19	0,22
Dac (wt%) ^c	PIN	LiCl	2	2,44	0,17
Dm (wt%) ^b	PIN	LiCl	3	2,56	0,22
Dac (wt%) ^c	PIN	LiCl	3	2,63	0,10
Dm (wt%) ^b	PIN	LiCl	4	2,36	0,14
Dac (wt%) ^c	PIN	LiCl	4	3,56	0,29
Dm (wt%) ^b	PIN	LiCl	5	2,57	0,25
Dac (wt%) ^c	PIN	LiCl	5	3,76	0,19
Dm (wt%) ^b	PIN	LiCl	6	2,97	0,14
Dac (wt%) ^c	PIN	LiCl	6	3,67	0,60
Dm (wt%) ^b	PIN	LiCl	7	2,84	0,36
Dac (wt%) ^c	PIN	LiCl	7	4,33	0,21
Dm (wt%) ^b	PIN	KOH	1	0,72	1,25
Dac (wt%) ^c	PIN	KOH	1	0,24	0,03
Dm (wt%) ^b	PIN	KOH	2	0,00	0,00
Dac (wt%) ^c	PIN	KOH	2	0,26	0,09
Dm (wt%) ^b	PIN	KOH	3	1,33	1,16
Dac (wt%) ^c	PIN	KOH	3	0,23	0,04
Dm (wt%) ^b	PIN	KOH	4	0,00	0,00
Dac (wt%) ^c	PIN	KOH	4	0,15	0,03

Dm (wt%) ^b	PIN	KOH	5	0,00	0,00
Dac (wt%) ^c	PIN	KOH	5	0,39	0,05
Dm (wt%) ^b	PIN	KOH	6	0,00	0,00
Dac (wt%) ^c	PIN	KOH	6	0,29	0,02
Dm (wt%) ^b	PIN	KOH	7	0,00	0,00
Dac (wt%) ^c	PIN	KOH	7	0,29	0,08

a - The degree of methylation refers to the mole of methyl group*100% per mole of GalA

b – The degree of methylation refers to the mass of methanol*100% per mass of polysaccharides of a given fraction

c - The degree of acetylation refers to the mass of acetic acid*100% per mass of polysaccharides of a given fraction

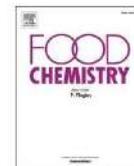
d – The degree of acetylation refers to the mole of acetyl group*100% per mole of GalA

Mean value of three repetitions, SD – standard deviation, WSP, water-soluble pectins; ISP, imidazole-soluble pectins; LiCl-DMSO, LiCl-DMSO-soluble acetylated hemicelluloses; KOH, 4 mol·L⁻¹ KOH-soluble deacetylated hemicelluloses.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

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

A study of the properties of hemicelluloses adsorbed onto microfibrillar cellulose isolated from apple parenchyma

Monika Szymańska-Chargot^{a,*}, Patrycja Pękala^a, Dawid Myśliwiec^b, Jolanta Cieśla^a, Piotr M. Pieczywek^a, Anna Siemińska-Kuczer^a, Artur Zdunek^a

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

^b UNB, Al. Gen. W. Sikorskiego 3, 20-814 Lublin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Cellulose
Hemicellulose
Pectin
Adsorption kinetic
Adsorption isotherm
Cellulose-hemicellulose composites

ABSTRACT

Binding assays of commercially available hemicelluloses and pectins, and microfibrillar cellulose isolated from apple parenchyma were prepared. Initial studies showed that among all of the non-cellulosic polysaccharides examined, only the hemicelluloses (xyloglucan, xylan, glucomannan, β-D-glucan) showed the ability to adsorb to microfibrillar cellulose. Among several adsorption models tested, the best fit was obtained for the Redlich-Peterson isotherm. Moreover, the linear vs. the branched structure and the size of the hemicelluloses have an influence over the extent of the adsorption to cellulose. The Fourier Transform Infrared and Raman spectra showed that a rather weak interaction took place between the hemicelluloses and cellulose. Also, the differential scanning calorimetry and the light scattering method results showed that after adsorption, cellulose has less mobility. Moreover, the mechanical properties of cellulose films changed after the addition of the chosen hemicelluloses and the films became less elastic but more resistant to a breaking force.

1. Introduction

Understanding the nature of the mutual interactions between the three main components of the plant cell wall - cellulose-hemicellulose-pectin - is important, especially when considering the mechanical properties of the cell wall at the macroscale, but also, in order to improve the design of new composites based on those polysaccharides and for improved plant biomass conversion (Lucenius et al., 2019). Moreover, each cell wall polysaccharide and cell wall as a whole form a part of the dietary fibre intake, they are used as a thickener and filler in food systems (Abik et al. 2023; An et al. 2022). At the same time, plant waste is a rich source of plant cell wall polysaccharides that are ready to be utilized. Cellulose is one of the most widely available, biodegradable and biocompatible natural polymers, currently there is a substantial effort being put into using it as a component of new composites. Cellulose is the main component of each plant cell wall, the others are hemicelluloses and pectins. The structural features of plant cell wall polymers have been the subject of research and are now defined for the

most part. Cellulose is a polymer of D-glucose linked with (1,4)-β-glycosidic linkages and organized in the plant cell wall in microfibrillar bundles. The hemicelluloses are a broad family of polysaccharides isolated in an alkaline environment, the backbone of which is usually formed of glucose, xylose or mannose monosaccharides and which contain sugar subunits, the main representatives of which are xyloglucan, xylan, or glucomannans (Zykwinska et al., 2008b). While pectins are a family of polysaccharides, they are based on galacturonic acid units and have highly branched residual groups with both acidic and neutral sugars. The cell wall itself provides the structural framework of the plant, it plays a critical role in their growth and development, on the one hand it has to be resistant, on the other it must be very flexible in the face of cell growth. The study of the interaction between those natural polymers is important for the purpose of designing new biomaterials that mimic nature.

The common method of the study of interaction between those polysaccharides is preparation of bacterial cellulose membranes growing in the broth with addition of pectic or hemicellulosic

Abbreviations: C, cellulose; G, β-D-glucan; GM, glucomannan; X, xylan; XG, xyloglucan; C+G, cellulose-β-D-glucan system; C+GM, cellulose-glucomannan system; C+X, cellulose-xylan system; C+XG, cellulose-xyloglucan system; FTIR, Fourier Transform Infrared spectroscopy.

* Corresponding author at: Institute of Agrophysics PAS, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland.

E-mail addresses: m.szymanska@ipan.lublin.pl (M. Szymańska-Chargot), p.pekala@ipan.lublin.pl (P. Pękala), j.ciesla@ipan.lublin.pl (J. Cieśla), ppieczywek@ipan.lublin.pl (P.M. Pieczywek), a.sieminska@ipan.lublin.pl (A. Siemińska-Kuczer), a.zdunek@ipan.lublin.pl (A. Zdunek).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137116>

Received 7 April 2023; Received in revised form 27 July 2023; Accepted 6 August 2023

Available online 7 August 2023

0308-8146/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

polysaccharides (Gu & Catchmark, 2014). Despite the many advantages of using bacterial cellulose for testing, this method is not free of some drawbacks. For example, adding different polysaccharides to the medium in which the cellulose-producing bacteria grow, there is no possible way to control the amount of substances that bacteria build up into the cellulose composite. Therefore, to avoid these disadvantages the physicochemical studies of cellulose as adsorbent and pectin and hemicellulose as adsorbates. In the literature cellulose is reported among many others as an adsorbent (Chen et al. 2022, Myśliwiec, Chylińska, Szymańska-Chargot, Chibowski, & Zdunek, 2016; Zykwińska, Ralet, Garnier, & Thibault, 2005; Zykwińska et al., 2008a, 2008b). This approach is relatively simple but it provides a lot of valuable information about process kinetics and the nature of the interaction between adsorbent and adsorbate. Furthermore, such studies would allow for the separation of the effect of metabolic processes from the effect of different concentrations of pectin and hemicellulose with regard to the cell wall structure and cellulose microfibrils themselves (Dammak et al. 2015; Gu & Catchmark 2014; Villares et al. 2015). However, the main disadvantages of this approach are the exclusion of some interactions which occur at the moment that cellulose and polysaccharides assemble, differences in the polysaccharide structure from their native form and difficulties with the detection of weak interactions. Another issue is that the adsorption experiments are analyzed using several research methods which are based on indirect determination of the amount of the adsorbed substance using UV-VIS spectroscopy, chromatography, and other techniques. Experimental results illustrating the quantitative adsorption are used to choose an appropriate adsorption model giving information on the nature of the interaction. Additionally, infrared spectroscopy (FTIR), Raman spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC), atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM), microelectrophoresis, and potentiometric titration are used to support and complete the adsorption data.

Previous investigations of pectin and hemicellulose adsorption on cellulose microfibrils have already been conducted, but vast majority of experiments were done at high temperature, which may not correspond to the conditions that might be found in environmental systems. To date, as reported in the literature, the adsorption of xyloglucan, xylan, glucomannan, arabinoxylan, arabinan, and pectins on cellulose with different degrees of esterification was studied. However, the cellulose used originated from different sources and had different properties; it was microcrystalline Avicel cellulose, but also bacterial cellulose or cellulose originating from potato or sugar beet (Gu & Catchmark, 2014; Myśliwiec et al., 2016; Zykwińska et al., 2005). Also, Langmuir or Freundlich models are currently favored for adsorption of xyloglucan (one of the hemicelluloses) onto cellulose. In this case, for the first time the adsorption of a wide range of pectic and hemicellulosic polysaccharides onto microfibrillar cellulose was studied in one place. Therefore, the main objective of the paper was to evaluate the potential of microfibrillar cellulose as an adsorbent of a wide range of plant cell wall polysaccharides, which are available commercially. The cellulose used in the experiment was isolated directly from apple parenchyma and maintained in the never-dried form while the experiment was performed at ambient temperature and neutral pH. In order to mimic the natural composite i.e. plant cell wall, different commercially available polysaccharides belonging to the hemicellulose and pectin families were used to determine their adsorption on the surface of cellulose microfibrils and to evaluate the impact of the mechanical properties of cellulose films with the addition of adsorbed polysaccharides. The results of this work may be used to verify whether or not pectic and hemicellulosic polysaccharides have the ability to adsorb and therefore interact with cellulose microfibrils. In addition, the results could be used in the future to design new biomaterials or food additives with unique properties as well as to improve the properties of existing ones (e.g. modified polysaccharides, the composites of lignocellulosic materials).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Never-dried microfibrillar cellulose was isolated from apple parenchyma using the method described in details by Szymańska-Chargot et al. 2017. The apples of Gala variety were bought in local grocery shop. Briefly, the thermochemical method used involved hot water, acid and alkaline extractions to remove the pectic and hemicellulosic polysaccharides from apple pomace. The final step used sodium hypochlorite to remove residual polysaccharides and lignins. After isolation, the cellulose was boiled several times in distilled water to remove free sugars and left in the wet state in the cold (4 °C) until the start of the experiment in the concentration of approx. 10% (solid-to-water ratio) (Myśliwiec et al. 2016). Commercially available hemicelluloses: β -D-glucan (G) (from barley, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany), glucomannan (GM) (from konjac, Megazyme Brey, Irland), xylan (X) (from beechwood, Sigma Aldrich), xyloglucan (XG) (from tamarind seed, Megazyme, Brey, Irland), and pectins: galactan (from potato, Megazyme, Brey, Irland), arabinan (from sugar beet, Megazyme, Brey, Irland), rhamnogalacturonan (from soybean pectin fibre, Megazyme, Brey, Irland), pectins esterified from citrus fruit with different degrees of esterification: 20–34%, 55–70%, and \geq 85% (Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany) were all used in the experiment without further purification. The sugar composition of each polysaccharide is presented according to the information provided by the supplier in SM Table 1 of the Supplementary Material section.

The initial properties of the cellulose such as the degree of crystallinity and the total acidic groups content were measured. The cellulose crystallinity was determined using the Segal method (Szymańska-Chargot et al., 2019). The acidic groups content was determined according to the standard conductometric titration method described in SCAN-CM 65:02 (SCAN-CM, 2006). The sugar composition of cellulose was conducted after hydrolysis of freeze-dried apple cellulose in 72% sulfuric acid by 1 h (pre-hydrolysis), followed by dilution of sulfuric acid by addition of water and further hydrolysis in 80 °C by 2 h (post-hydrolysis). After which the resulting solution was neutralized by the addition of sodium hydroxide solution (3 M). The content of glucose, xylose and mannose was determined by using the Megazyme D-Mannose/D-Fructose/D-Glucose Assay kit and D-Xylose Assay Kit (Megazyme, Brey, Irland).

2.2. Methods

2.2.1. Adsorption experiment

Adsorption studies were carried out using a static indirect method. The concentration of hemicellulose/pectin was determined before contact with cellulose and also after contact at a specific time. All of the experiments were carried out in a water bath shaker at room temperature (23 ± 1 °C). The pH of the solutions was monitored by adding phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4, C = 0.1 M, I = 0.1). In general terms, 4.83 g of cellulose pulp (0.5 g of cellulose dry weight), 5 g of phosphate buffer and 25 g of a hemicellulose/pectin solution of a given concentration were added, this mixture was topped up with distilled water to form a 50 g solution. The suspensions were shaken during the entire process (200 rpm/min). The suspensions were filtered through syringe filters (NYL 0.45 μ m, Millipore, Merck, Darmstadt, Germany), and 1 ml of clear solution was taken for the determination of the concentration of the chosen polysaccharides after adsorption. Initially, in order to establish whether adsorption has taken place, the mixing process was conducted over a period of 24 h. The concentration of a given polysaccharide was determined before and after adsorption and in the case of a positive initial adsorption result another adsorption equilibrium experiment was carried out. The time required to reach an equilibrium condition was estimated by withdrawing samples at intervals of time until a state of equilibrium was reached. Different initial

concentrations of each polysaccharide solution were prepared through the proper dilution of stock solutions. Each point of the isotherm is an average of three independent replicates.

The carbohydrate content was determined using the sulphuric acid-UV method as follows (Mysliwiec et al. 2016). A 1 ml aliquot of carbohydrate solution was mixed with 3 ml of concentrated sulphuric acid in a test tube and vortexed for 30 s. The temperature of the mixture rose rapidly within 10–15 s after the addition of sulphuric acid. Then, the solution was cooled on ice for 2 min to bring it to room temperature. Finally, UV light absorption was read at 315 nm using a UV spectrophotometer. Solutions for the calibration curve were prepared following the same procedure as above.

2.2.2. Adsorption models

Several models of adsorption isotherms, such as two-parameter (Langmuir, Freundlich, Jovanovic, Temkin), three-parameter (Langmuir-Freundlich, Sips, Toth, Fowler-Guggenheim, Radke-Prausnitz, Redlich-Peterson) and four-parameter (Marczewski, Fritz-Schluneder) models were tested. Among them, the best fit was obtained using the Freundlich isotherm:

$$a = k \cdot c^{1/n} \quad (1)$$

and the Redlich-Peterson isotherm

$$a = a_m \cdot \frac{kc}{1 + kc^n} \quad (2)$$

where in Eqs. (1)–(2) k ($\text{dm}^3 \cdot \text{mg}^{-1}$) and n (dimensionless) are the adsorption constants of the process, a_m ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) is the maximum adsorption (adsorption capacity), and c ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) stands for the adsorbate equilibrium concentration in solution.

The Freundlich equation (1) is a purely empirical isotherm (Chang et al., 2000). The Redlich-Peterson isotherm for low adsorptions is similar to the Henry ($a = kc$) isotherm, while for medium and high adsorptions it behaves like the Freundlich isotherm.

In order to estimate how well the model explains the experimental data, apart from the R^2 parameter, both the Akaike informational criterion (AIC) and the corrected Akaike information criterion (AIC_{corr}) which takes into account the number of model parameters to avoid overfitting, were taken into consideration (Mysliwiec et al., 2016).

For the description of adsorption kinetics the first-order equation was used:

$$\frac{a}{a_{\text{eq}}} = 1 - \sum_{i=1}^3 A_i \exp(-k_i t) \quad (3)$$

where a_{eq} ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) is equilibrium adsorption, A_i is the contribution of the i th process (fast, moderate, slow) in the total adsorption and k_i (min^{-1}) is the kinetic constant of the i th process, t (min) denotes time.

2.2.3. Characterization of the hemicellulose, cellulose and cellulose-hemicellulose dispersions in PBS buffer using a light scattering method

When adsorption of hemicellulose was observed (please see SM Table 1), additional properties were determined on the hemicellulose-cellulose systems.

A series of hemicellulose (H) dispersions at concentrations ranging from 10 mg/L to 200 mg/L (X), 400 mg/L (G and XG) and 800 mg/L (GM) in 0.001 M PBS at pH 7.4 were prepared and conditioned with a gentle mixing for 24 h at 20 °C. The ranges of the applied concentrations covered those used in the adsorption experiment. The maximum value of the concentration was limited by the precipitation of hemicelluloses.

The dispersions of the cellulose (C; 10,000 mg/L), hemicellulose (H) and cellulose-hemicellulose (C + H) systems in PBS (0.001 M) at pH 7.4 and the concentration of H corresponding to the highest value of adsorption (i.e. 800, 400, 200 and 90 mg/L, respectively for GM, G, XG and X) were selected. However, these systems were too concentrated for particle size measurements. Therefore, 10-fold lower concentrations were used. The C suspension was homogenized using Ultraturax (IKA,

Staufen, Germany) for 10 min. The samples were conditioned using gentle mixing for 24 h at 20 °C.

The samples prepared above were characterized using back dynamic light scattering (the mean hydrodynamic diameter and polydispersity index (PdI) (ISO, 2017)) and laser Doppler electrophoresis (electrophoretic mobility (EM) and zeta potential (ZP) (Delgado et al., 2007)). The measurements were performed using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Ltd., Malvern, UK) using six repetitions at 20 °C.

2.2.4. Characterization of the cellulose-hemicellulose systems

Additionally, for the C + H systems after adsorption was conducted overnight, the samples were characterized using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry (DSC). The C + H systems were prepared like the adsorption system above by adding 25 g of 1.6 mg/ml GM, 0.8 mg/ml G, 0.4 mg/ml XG and 0.2 mg/ml X to 0.01 mg/ml cellulose dispersion in a 0.01 M phosphate buffer. After adsorption overnight, the dispersion was filtered on a nylon filter (0.45 μm) and water was poured over it. The resulting solid was freeze-dried prior to the measurements taking place.

2.2.4.1. Differential scanning calorimetry (DSC). A DSC analysis was performed using a TA Instruments DSC 250 (Waters, DE, USA) instrument. Each time the approx. 10 mg of lyophilized sample (stored in a desiccator before the measurement was carried out) was sealed in aluminium pans (not hermetic). Then, the sample was gradually heated in the range of 20–400 °C under a nitrogen flux of 50 ml min^{-1} and the heating rate was 10 °C min^{-1} . The DSC data were analysed using Trios v.4.2.1 (TA Instruments, Waters, DE, USA) software.

2.2.4.2. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. The FTIR spectra were collected using a Nicolet 6700 FTIR spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and a Smart iTR attenuated total reflection (ATR) sampling accessory was used. After adsorption, the lyophilised samples were placed directly on an ATR crystal and measured. The spectra in the spectral range of 4000–650 cm^{-1} were recorded and for each material, 3 samples (200 scans each) were examined under the same conditions at a spectral resolution of 4 cm^{-1} . After that, the average spectrum was obtained. These spectra were normalized to the area under each spectrum. All spectral manipulation was carried out using Origin Pro 8.5 (OriginLab Corporation, USA).

2.2.4.3. Raman spectroscopy. The Raman Fourier transform spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was used for the acquisition of Raman spectra. The Nd:YAG laser emitting light at $\lambda = 1064$ nm and the output power was 1 W was used for sample excitation. The Raman signal was detected using a Ge detector cooled with liquid nitrogen. The spectra were recorded in the range of 3700–150 cm^{-1} , with a resolution of 8 cm^{-1} . For each material, the average of 3 spectra (the result of 300 individual scans each) were obtained. All spectral manipulation was carried out using Origin Pro 8.5 (OriginLab Corporation, USA).

2.2.5. Characterization of cellulose-hemicellulose films

2.2.5.1. Cellulose film preparation. The cellulose – hemicellulose films were prepared using a modified method of high vacuum filtration (Szymańska-Chargot et al., 2019). Only the hemicelluloses which had the ability to be adsorbed on cellulose were used. Prior to the preparation of each film, the first 100 g of 0.2% cellulose suspended in distilled water was dispersed with Ultraturax (IKA, 10 min) and then mixed with 100 g of hemicellulose solution having a concentration of 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm and 800 ppm. The sample was mixed using a magnetic stirrer for 16 h after which it was poured through a filter (filtration set, Chempur, Poland), and the filtrate was kept under 0.6 bar (Basic 36 vacuum pump, AgaLabor, Poland). The resulting films contained 0.2 g of

cellulose and 10 mg, 20 mg, 40 mg or 80 mg of a given hemicellulose. For each variant, two films were prepared. Dried films were used for further analysis. The filtrate was checked for the presence of sugars and only small amounts were detected. Therefore we assumed that all the hemicelluloses were trapped in the cellulose microfibrils.

2.2.5.2. Mechanical properties. Prior to mechanical testing, samples of the cellulose films were cut into rectangular strips, with a length of 40 mm and a width of 3 mm. Precise measurements of the sample width were carried out using the Olympus SZX16 (Olympus Corporation, Japan) microscope with an SDF PLAPO 0.5 XPF lens, equipped with a DFK 51BU02.H digital camera (The Imaging Source Europe GmbH, Bremen, Germany). The thickness of each sample was measured using a digital micrometer BAKER IP54 (Baker Gauges India Private Limited, India) with a measurement accuracy equal to 0.001 mm. The uniaxial tensile tests were performed using a miniature tensile stage (Deben Microtest, Suffolk, UK). These tests were carried out until the mechanical failure of the samples occurred. The initial gap between the grips was set at 10 mm. The sample deformation rate was equal to 0.1 mm/min. The force–elongation curves were analysed automatically using Python code (<https://github.com/ppieczzywek/TDA>). The sample dimensions were used to recalculate the captured tensile force and elongation into stress (σ) and strain (ϵ), respectively. The obtained bilinear stress–strain curves were characterized by six parameters: elastic modulus E1 (slope in the first linear section of the curve), strain hardening modulus E2 (slope in the second linear section of the curve), strain at break, stress at break, stress at the proportional limit and toughness (defined as the area under the σ - ϵ curve).

2.2.6. Statistical analysis

The obtained results were analysed using Statistica 13.1 software (StatSoft, Cracow, Poland). One-way ANOVA and post-hoc HSD Tukey test of probability of means differences with alpha level 0.05 was performed.

3. Results

3.1. Cellulose substrate characterization

The cellulose in the never-dried microfibrillar state was isolated from apple parenchyma (Szymańska-Chargot, Chylińska, Gdula, Koziol, Zdunek, 2017). One of the most important features of cellulose, which determines its properties is the degree of crystallinity and the amount of acidic groups on the cellulose surface. The degree of crystallinity of the cellulose which was determined using the XRD method was 45.49% and was found to be in good agreement with previous data (Szymańska-Chargot et al., 2017). The concentration of acidic groups on the cellulose surface was 18.43 $\mu\text{mol/g}$. The content of acidic groups is a measure of the charge on the surface of the cellulose. This charge is introduced on the surface through the method of cellulose extraction. Additionally, the sugar composition of cellulose determined. The obtained composition of cellulose is 87.35 \pm 0.49 % of glucose, 2.79 \pm 0.03 % xylose, and 2.15 \pm 0.04 % of mannose. Previous study reports that rhamnose and galactose are present in concentrations below 1%, while arabinose and uronic acids weren't found (Becker, et al., 2021). Therefore, the purity of isolated microfibrillar cellulose is high, but residual sugars (after pectins and hemicelluloses) on the surface should be bare in mind. A similar isolation of cellulose (from sugar beet cell wall material) was conducted by Zykwińska et al. (2005, 2008b). However, the sugar composition of cellulose wasn't presented and in turn, there is no information on the purity of used cellulose in these studies (Zykwińska et al. 2005, 2008b).

3.2. Adsorption kinetics and equilibrium

The initial adsorption experiment involving 24 h of adsorption of the chosen polysaccharides onto cellulose microfibrils showed that only the hemicelluloses: xyloglucan, xylan, glucomannan and β -D-glucan were adsorbed onto microfibrillar cellulose and for those polysaccharides a further detailed analysis was performed. In the case of the chosen pectins no adsorption was observed (SM Table 2). The adsorption kinetics for the chosen hemicelluloses are shown in Fig. 1 a. The overall kinetics experiment was conducted for 24 h, but the equilibrium for most systems was reached after 3–4 h.

In order to further analyse the obtained data we have assumed that the adsorption of hemicelluloses onto cellulose microfibrils consists of several parallel processes that are consistent with first-order kinetics (Eq. (3)). The results of the fitting are presented in Fig. 1a. and Table 1.

After fitting the data to this model, we can compare the rates of individual components (k) and how large their share is in the total adsorption rate (A). Three components were used to denote fast, moderate and slow processes (Table 1).

The fast processes are dominated by G and X (with a contribution of 0.964 and 0.847, respectively), and GM also forms a part of the fast process (0.538), the moderate process also played an important role with a contribution 0.376. XG behaves in a completely different way, in this case the moderate and slow processes dominated. In the case of xyloglucan, it was hypothesized that the xylose groups which are chemically available probably prevent some rapid process of chemical bonding with the cellulose surface and that the slower ones come to the fore. However, while the adsorption of xyloglucan on cellulose is still significant, it probably doesn't determine the affinity of the hemicellulose to the cellulose surface, but rather the rate of adsorption. The kinetic constants for the slow component are very similar in terms of the order of magnitude ($k_3 < 0.01 \text{ min}^{-1}$), so it may be assumed that the same process occurs in each case, which in the case of large polymeric molecules, is most likely to be diffusion/reconformation. This means that with an increasing concentration of adsorbate in the system, the hemicellulose macromolecules can only be adsorbed after the reconformation of already adsorbed molecules has occurred, this allows new molecules to reach the surface of the adsorbent. The most probable explanation of the fast process mechanism is that it includes the formation of the loops-and-tails conformation of hemicellulose molecules on the cellulose surface, while there is no time for a macromolecular rearrangement and for the formation of a flat conformation on the cellulose surface. This is the case with G, GM and X. In the case of XG, for which the moderate and slow processes play a role, the dominating process is diffusion and reconformation to form a flat rearrangement on the cellulose microfibrils. This is in line with the previous results of xyloglucan adsorption on both the Avicel cellulose and the cellulose nanocrystals which shows that the dominant process in the studied systems was the reconformation of a polymer in the adsorbed layer (Kabel et al., 2007; Mysliwiec et al., 2016; Villares et al., 2015). Moreover, the increasing concentration of xyloglucan in the adsorption system also led to the formation of loops and tails (Villares et al., 2015).

The adsorption isotherms for the chosen hemicelluloses are shown in Fig. 1 b and c. Among all of the adsorption isotherm models tested, the best fit was obtained for the Freundlich (Eq. (1)) and Redlich-Peterson (Eq. (2)) models (SM Table 3). Usually, the Redlich-Peterson isotherm is tested for heterogeneous adsorbents and for a high concentration of adsorbate it is approximated by the Freundlich isotherm, while for low concentrations, the Henry isotherm is more suitable. Both models are purely empirical and allow for the formation of multiple layers on the adsorbate surface or, to be more precise, the models don't have a maximum adsorption capacity for a single adsorbed layer (Chang et al., 2000; Mysliwiec et al., 2016). The adsorption isotherms may be divided into two parts: first there is a rapid increase and then a plateau is reached. In the case of X and XG, a plateau was obtained for the lower adsorption maxima, while for G and GM, the maximum adsorption

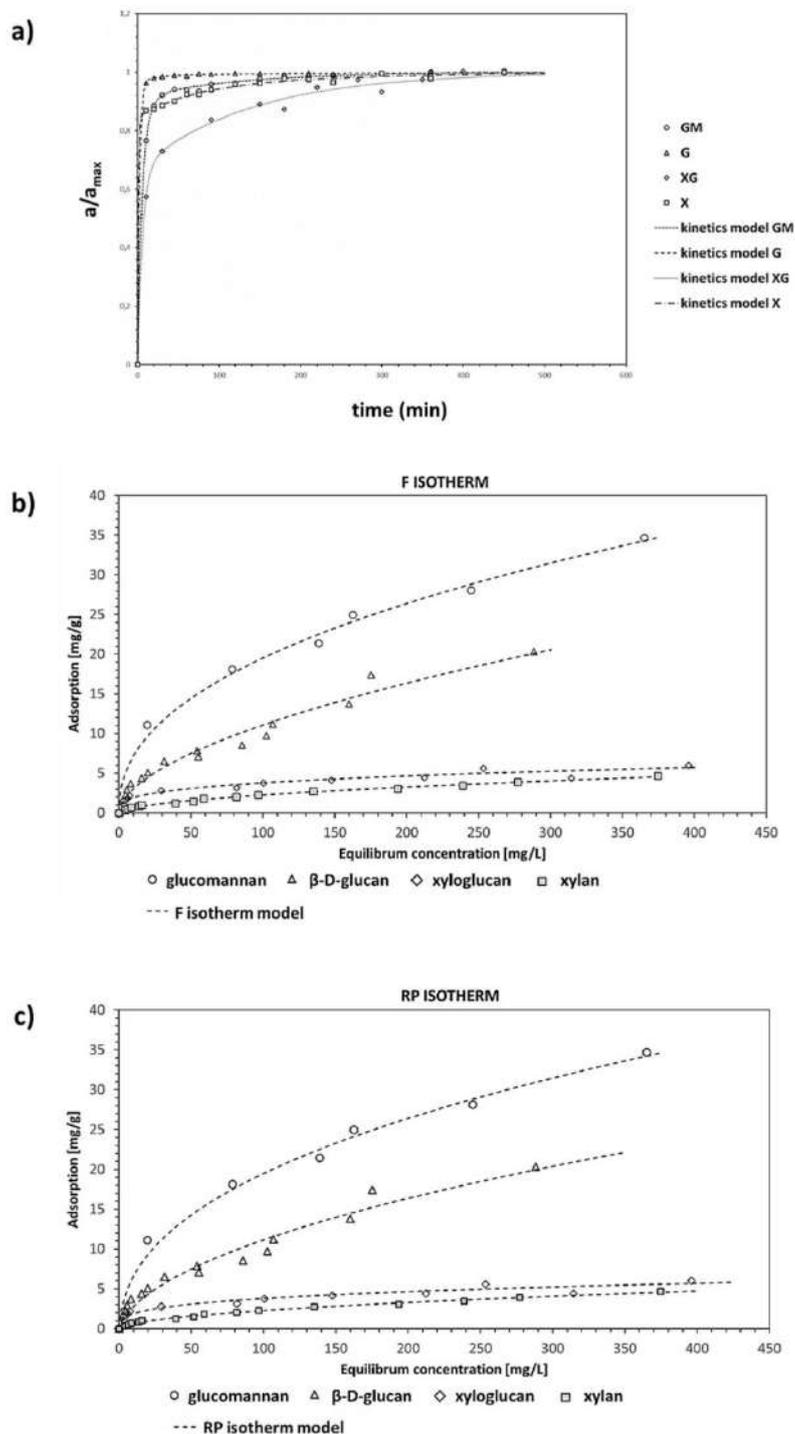


Fig. 1. Adsorption kinetics of GM, G, XG and X on microfibrillar cellulose as plots of adsorption versus time. (GH – glucomannan; G – β -D-glucan; XG – xyloglucan; X – xylan) (a). The adsorption isotherms of the chosen hemicelluloses (GH – glucomannan; G – β -D-glucan; XG – xyloglucan; X – xylan) on microfibrillar cellulose: F – Freundlich isotherm (b), RP – Redlich-Peterson isotherm (c).

Table 1

The parameters of the kinetic model used for the analysis of adsorption of the chosen hemicelluloses (X, XG, G, GM) on microfibrillar cellulose. The bold values of *A* indicate the significant impact of the subprocess on the total adsorption rate.

PROCESS		HEMICELLULOSE			
		GM	G	XG	X
FAST	A ₁	0.538	0.964	0.041	0.847
	k ₁ [1/min]	0.271	0.458	0.983	1.188
MODERATE	A ₂	0.376	0.026	0.628	0.095
	k ₂ [1/min]	0.116	0.051	0.168	0.015
SLOW	A ₃	0.086	0.01	0.331	0.006
	k ₃ [1/min]	0.008	0.003	0.007	0.005

GM – glucomannan, G – β-D-glucan, XG – xyloglucan, X – xylan.

capacity was not reached (within the range of equilibrium concentrations that were studied).

3.3. Characterizations of particle size and electrokinetic properties of C + H systems

Dispersions of C and C + H mixtures in 0.0001 M PBS at concentrations corresponding to the highest adsorption were characterized in terms of the hydrodynamic diameter, Pdl, EM and ZP. The results obtained are summarized in Table 2. Additionally, an effect of H concentration in 0.001 M PBS concerning particle size and EM is shown in SM Fig. 1.

All of the systems tested were heterogeneous in terms of particle size (Pdl > 0.5). There were no significant differences in hydrodynamic diameter between C and H with the exception of X, the size of which was lower. In the case of C + G and C + XG, both the particle size and polydispersity were significantly higher than those of C. There were no significant differences in EM (and ZP) between H and C. However, the absolute values of both EM and ZP that were determined for C + G and C + GM were lower than those for C.

In addition, the results obtained for H (without assigning the data to a specific hemicellulose) and C + H (without assigning the data to a specific hemicellulose) were analysed. Statistically significant correlations were found between the particle size of H and the EM of C + H (R = 0.9665) as well as between the EM of H and the hydrodynamic diameter of C + H (R = 0.7989). The lower the particle diameter of H, the higher the observed absolute value of EM in the C + H systems. Simultaneously, the higher that the absolute value of the H EM was, the lower the mean hydrodynamic diameter which was determined in the C + H systems. It was originally hypothesized that the correlations above resulted from the presence of free (not-adsorbed) H particles in C + H systems. However, there were no correlations between the particle sizes of H and C + H (R = 0.5474), the particle sizes of H and the

Table 2

Physicochemical parameters describing dispersions of C, H and C + H in 0.0001 M PBS at 20 °C. MHD – the mean hydrodynamic diameter, Pdl – polydispersity index, EM – electrophoretic mobility, ZP – zeta potential.

Sample	MHD (nm)	Pdl	EM (µmcm/Vs)	ZP (mV)
C	430 ± 98 ^b	0.58 ± 0.09 ^b	-0.99 ± 0.32 ^a	-14.03 ± 4.54 ^a
G	531 ± 94 ^b	0.70 ± 0.18 ^{ab}	-0.90 ± 0.35 ^{ab}	-12.77 ± 4.89 ^{ab}
C + G	929 ± 199 ^a	0.76 ± 0.03 ^a	-0.48 ± 0.09 ^b	-6.84 ± 1.24 ^b
GM	526 ± 123 ^b	0.83 ± 0.17 ^a	-0.93 ± 0.06 ^a	-13.17 ± 0.90 ^a
C + GM	486 ± 80 ^b	0.62 ± 0.09 ^{ab}	-0.49 ± 0.16 ^b	-6.86 ± 2.24 ^b
X	285 ± 19 ^c	0.53 ± 0.10 ^b	-1.04 ± 0.10 ^a	-14.68 ± 1.44 ^a
C + X	333 ± 60 ^{bc}	0.65 ± 0.19 ^{ab}	-1.03 ± 0.08 ^a	-14.51 ± 1.17 ^a
XG	417 ± 78 ^b	0.60 ± 0.16 ^{ab}	-0.65 ± 0.23 ^{ab}	-9.19 ± 3.29 ^{ab}
C + XG	1016 ± 316 ^a	0.81 ± 0.16 ^a	-0.74 ± 0.20 ^{ab}	-10.47 ± 2.79 ^{ab}

*The letters show the results of a one-way ANOVA and post-hoc HSD Tukey test, p < 0.05.

polydispersity of C + H (R = 0.3397) as well as the EM of H and the C + H particles (R = 0.3920).

By taking into account that both the H and C + H systems were prepared using the H concentrations that corresponded to the highest adsorption (see: Adsorption kinetics and equilibrium), the relationships between amount of adsorbed H (a_m) and the physicochemical properties of H and C + H were checked. The amount of adsorbed H (a_m) was proportional to the mean diameter of the particles in the H dispersion (R = 0.6341). The higher the amount of H that was adsorbed, the lower the absolute value of EM determined in the C + H dispersion (R = 0.7029).

3.4. Characterization of the cellulose-hemicellulose systems after adsorption

The thermal degradation of the C + H systems involves two processes. The first is the evaporation of low volatile molecules such as water at around 100 °C, and the second is the main thermal degradation or crystalline melting. In the case of the C and the C + H systems both processes were presented as endothermic peaks on the DSC curve (SM Fig. 2). The thermal degradation of C occurs for temperatures at around 300 °C. The addition of hemicellulose caused an increase in the degradation temperature of the C + H systems by a few degrees. The enthalpy of the degradation process for pure cellulose is 206.81 J/g and the addition of hemicellulose caused a drop in enthalpy, the only exception is the C + X system (Table 3). The lowest enthalpy of degradation, 165.79 J/g was obtained for the C + XG systems. The temperature onset for all samples regardless of the hemicellulose used was similar and the obtained values were 318.47 °C for cellulose and between 318 and 321 °C for the C–H systems.

In the case of FTIR, two regions were taken into account: 3700–2800 cm⁻¹ (OH and CH₂ stretching region) and 1225–980 cm⁻¹ (mainly the O–C–O linkage vibrations and C–C, C–OH, C–H ring and side group vibration). The first one may reflect the interaction with OH and CH₂ groups, while the changes in the second one may provide information about the overall interactions with cellulose microfibrils (SM Fig. 3a, b).

The absorbance of the bands at 1200 and 1054 cm⁻¹ denoting C–O–C symmetrical and asymmetrical stretching, respectively, decreased after the addition of hemicelluloses as compared with the spectrum of pure cellulose. The bands between 1030 and 1018 cm⁻¹ are assigned to the C–C, C–OH, C–H ring and side group vibration. In the case of the C–H systems and compared with the C spectrum the shift of the band at 1026 cm⁻¹ towards lower wavenumbers (delta = 7 cm⁻¹) occurs. The absorbance of the band at 997 cm⁻¹ (C–C, C–OH, C–H ring and side group vibration) increased after the addition of G and GM hemicelluloses. The lowest intensities were obtained for the C–X and C–XG systems. In the case of the bands between 3800 and 2800 cm⁻¹ which may be attributed to intramolecular H-bonds O2H...O6 (3431 cm⁻¹), intramolecular H-bonds O2H...O6 (3335 cm⁻¹), intramolecular H-bonds O3H...O5 (3280 cm⁻¹) and intermolecular H-bonds O6H...O3' (2891 cm⁻¹), the position of the bands didn't change which may be the result of the very weak interaction between the cellulose and the hemicelluloses used.

In the case of the Raman spectra of cellulose and cellulose-hemicellulose systems are presented in SM Fig. 4a, b. The Raman

Table 3

Thermal characteristics of the C and C + H systems obtained from DSC curves.

	SEMIMELTING PROCESS		
	T _{MAX} °C	Enthalpy J/g	T _{onset} °C
C	341.26	206.81	318.47
C + GM	349.88	183.05	318.02
C + G	347.65	190.01	321.91
C + XG	348.48	165.79	319.71
C + X	347.52	211.40	319.60

spectra were characterized by a strong stretching vibration of C—H in the pyranose ring of the polysaccharides. The lowest intensity of this band was obtained for cellulose, while for the C—H systems its intensity was similar. The region below 1500 cm^{-1} of the Raman shift is dominated by the vibration of the COC, CH₂, CH and OH groups. For cellulose, but also for some hemicelluloses, the most characteristic bands were found at around 1461, 1411, 1374, 1337, 1266, 990 and 962 cm^{-1} and assigned different vibrations of methylene (—CH₂) and methine (—CH) groups. The scissoring (bending) of —CH₂ is sensitive to the conformation of the C6H₂OH group and the band at around 1460 cm^{-1} is related to the gg conformation (Szymańska-Chargot et al., 2019). The Raman spectrum of cellulose also includes bands at 1148 cm^{-1} and 1200 cm^{-1} related to the asymmetric and symmetric C—O—C stretching vibrations of glycosidic linkages, respectively. Additionally, the band at 1200 cm^{-1} may be assigned to a ring or to the deformation vibrations of secondary hydroxyl groups. The bands at 1120 and 1095 cm^{-1} are characteristic of the asymmetric and symmetric stretching vibrations of the glycosidic bond in cellulose, respectively. Those bands are also characteristic for hemicelluloses, e.g. xyloglucan where the main backbone consists of β -1-4-linked glucose residues which are found in the cellulose polymer, for example. The band at 896 cm^{-1} is assigned to the methine group at C1 and the intensity of this band may be related to the amount of cellulose disorder, and any decrease in this peak may be a sign that the hemicelluloses caused the cellulose microfibrils to start to form more stable and ordered structures in water. The shoulder band at 1055 cm^{-1} was assigned to OH...O hydrogen bonding, but also to CO stretching in the primary and secondary alcohol groups.

3.5. The mechanical properties of composites of microfibrillar cellulose and hemicelluloses

The interaction between cellulose and hemicellulose has an influence on the mechanical properties of cellulose-hemicellulose composites and also on those of the plant cell wall. Therefore, the influence of the addition of different hemicelluloses in different concentrations on the mechanical properties of microfibrillar cellulose-based films were determined (Fig. 2). In order to standardize the composites, a set amount of each hemicellulose was added. During the high vacuum filtration, the cellulose filtration cake is formed which additionally causes hemicellulose retention, and higher amounts of hemicelluloses than those resulting from the adsorption study could be added to the film preparation.

In general terms, the Young's modulus of the cellulose-hemicellulose films increased (significantly or not) in all cases as compared with the cellulose film. In the case of GM and G hemicelluloses, the increase in Young's modulus was proportional to the increasing amount of hemicellulose additive (Fig. 2a). The maximum value of the elasticity module was obtained in the cases of C + GM0.4 and C + G0.4 and it was around 5.8 GPa and 5.9 GPa, respectively, and for C + X0.4 it was even higher, the value of 6.3 GPa meant that the cellulose films with the addition of glucan, glucomannan and xylan became less elastic. Only the films containing XG behave in a different way; in the case of the lowest amount of XG additive, Young's moduli dropped down to 2.8 GPa but then started increasing to a value of 7 GPa in the case of C + XG0.4.

Strain hardening is a measure of material strength in the plastic deformation regions. Even though the material still experiences some deformation, it is able to endure more tensile stress without weakening (Fig. 2 b). In the case of composites, with the addition of GM, G and XG, strain hardening increased significantly. However, for the sample C + XG0.05 this value decreased. In the case of samples with the addition of X, the increase in the strain hardening value wasn't so significant as it was in the case of the other samples.

On the other hand, all of the films experienced a similar strain at break, oscillating at around a value of 4.7% that was obtained for cellulose films (Fig. 2c). In the case of the stress at break, the addition of hemicellulose generally increased this value to around 123 MPa for C +

GM, and to around 127 MPa for C + G, 125 MPa for C + XG, and 1017 MPa for C + X compared to the cellulose film which produced a value of 87.6 MPa (Fig. 2d). Only the addition of 0.05 mg of XG caused a lowering in the stress at break. The stress at elasticity limit was also improved after the addition of each hemicellulose: for the cellulose film was it approx. 40 MPa, and it increased to 59.4 MPa for the C + X films, 60.1 MPa for C + XG, 52 MPa for C + G and 49.8 MPa for C + GM (Fig. 2e). The toughness which is a measure of the ability of the material to be deformed without any fracturing of the C + H films was improved by the addition of hemicelluloses (Fig. 2f) and increased from 2.7 MJ/m^3 (cellulose) to around $3\text{--}4\text{ MJ/m}^3$ however, again the films containing 0.05 or 0.1 mg of XG experienced a reduction in toughness to 1.6 and 1.8 MJ/m^3 .

4. Discussion

The hemicelluloses and pectins and their potential to interact with cellulose has tremendous influence over the properties of composites based on plant cell wall polysaccharides. In the present paper, the adsorption of the chosen hemicelluloses and pectic polysaccharides on microfibrillar cellulose was investigated. Adsorption was only obtained in the case of the chosen hemicelluloses and the adsorption rate increased in the following order: X < XG < G < GM. The Freundlich model was used several times to explain the adsorption mechanism of hemicelluloses on cellulose (Zykwiniska et al., 2005) while the Redlich-Peterson model was used for the first time and showed the best fit to the experimental data. To date, the most explored isotherms for the description of hemicellulose-cellulose interaction has been either Langmuir or Freundlich (Dammak et al., 2015; Villares et al., 2015). The first one assumes the formation of a monolayer on the sorbent surface, and the second one is used for heterogenous surfaces with varied surface affinities in which the more attractive sites are occupied first (Guechi & Hamdaoui, 2016). While the cellulose microfibril has a heterogenous surface containing both hydrophilic and hydrophobic sites, the Langmuir model would seem to be inadequate in this case. Instead, the Redlich-Peterson model can be used as a compromise between the Langmuir and Freundlich isotherms. It allows for the formation of multilayers but it is rather appropriate for the large molecules forming different conformations.

To date, the adsorption of xyloglucan on cellulose has been the most widely studied system and the Freundlich or Langmuir models were proposed to explain the adsorption. In general, it is assumed that the Freundlich model is rather more related to the heterogeneity of the cellulose surface than the possibility of multilayer formation by the xyloglucan (Zykwiniska et al., 2008a). Moreover, xyloglucan also showed different conformations on the cellulose surface which were dependent on its concentration in the system. A lower concentration (below $3.5\text{ }\mu\text{g/L}$) led to a flat conformation, while increasing xyloglucan concentration led to the formation of trains and loops on the cellulose surface (Dammak et al., 2015). In the case of xylan which is a smaller molecule than xyloglucan only the formation of a flat conformation was possible.

Moreover, the xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan. The galactosylation and fucosylation of xyloglucan also influence the interaction with cellulose microfibrils – the substitution of xyloglucan usually enhanced the interaction with cellulose (Lima and Buckeridge 2001). Most recently, apple xyloglucan composed of unbranched linear glucan motifs, typical XXXG motifs, and fucosylated (XXFG) and galactosylated (XXLG, XLXG, and XLLG) parts was adsorbed on cellulose (Chen et al. 2022). The greatest binding affinity was exhibited by the fucosylated and galactosylated xyloglucan fractions. The influence of the different molecular weights of apple xyloglucan additionally modified by enzyme action on adsorption onto cellulose nanofibers was also investigated (Chen et al. 2022). The lower molecular weight of the apple xyloglucan was associated with better adsorption on cellulose nanofibers.

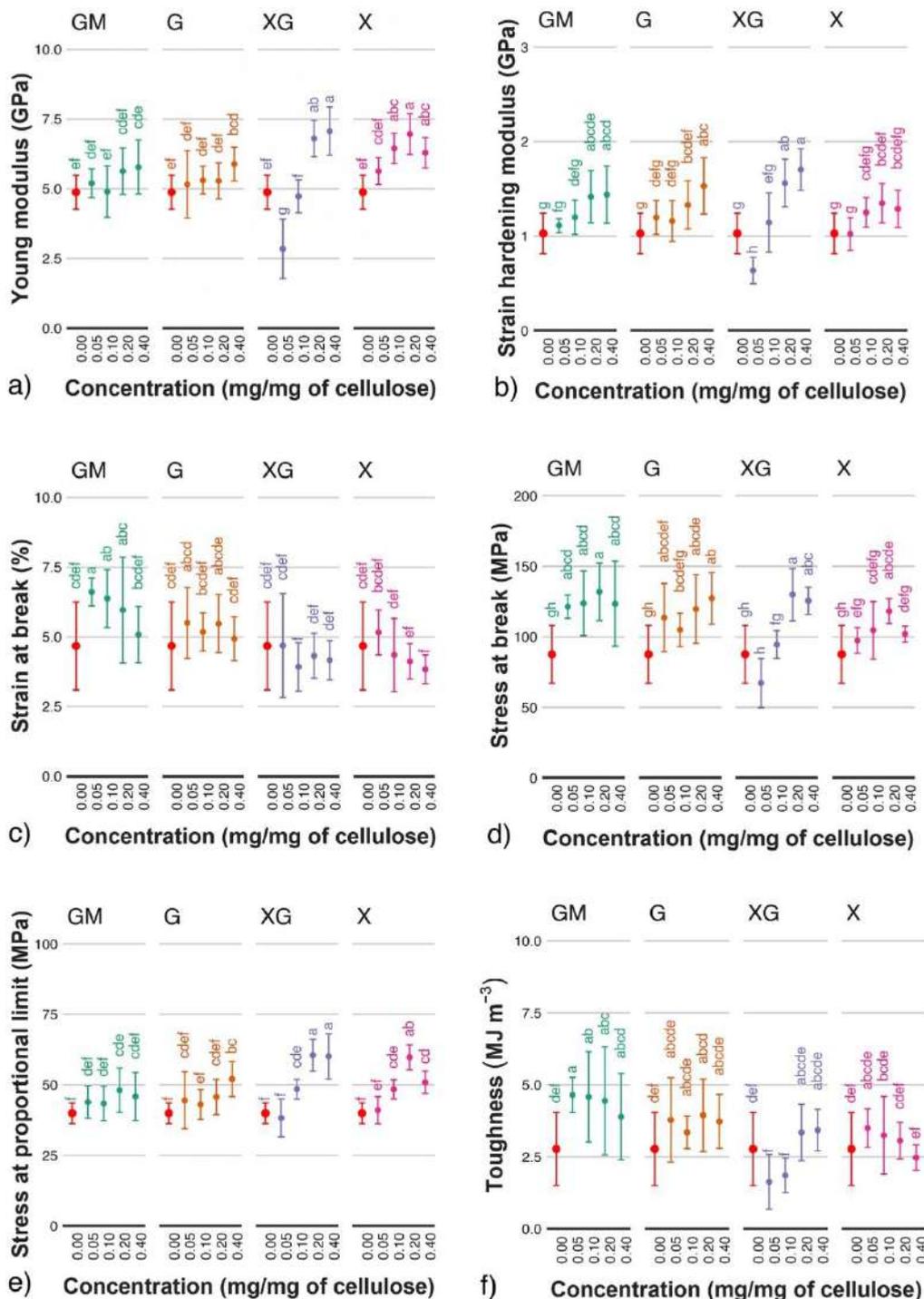


Fig. 2. Mechanical properties of the cellulose-hemicellulose composites: Young's modulus (elastic modulus) (a), strain hardening modulus (b), strain at break (c), stress at break (d), stress at the proportional limit (e) and toughness (f). The data points stand for the mean values of the measured parameters, while bars indicate the standard deviations. Treatments marked with the same letter are not significantly different. The groups were calculated according to the HSD Tukey test of probability of means differences with alpha level 0.05. The control samples are marked in red.

Moreover, again it was confirmed that XG adsorbs in an extended conformation (trains) at a low XG to cellulose ratio, while tails and loops are formed at a high XG concentration and a saturated cellulose surface.

In the case of β -D-glucan and glucomannan adsorption on cellulose was shown, however, not in such high amounts as were found in the present study (Kiemle et al., 2014). The secondary cell wall hemicelluloses as galactoglucomannan can undergo O-acetylation. Moreover, a lower degree of mannan O-acetylation was related to higher binding affinity for hemicellulose on cellulose (Melton et al. 2009; Berglund et al. 2020). It was even concluded that, similar to xyloglucan and xylan, glucomannans can act as crosslinking agents between cellulose microfibrils. Previously, it has also been suggested that mixed-linked glucomannan is tightly bound to cellulose in low-arabinoxylan cell walls and can interact with arabinoxylan (Smith-Moritz et al. 2015).

The apple microfibrillar cellulose has quite a low degree of crystallinity and is composed of long and thin nanofibrils (Szymańska-Chargot et al., 2019) (Fig. 3a). The influence of cellulose crystallinity on the adsorption rate of xyloglucan has already been investigated and the results are ambiguous (Gu & Catchmark, 2014; Kiemle et al., 2014). On the other hand, the structure of the molecule, especially the side groups of the polysaccharides used as adsorbates was shown to have an effect on their adsorption rate. For example, in the case of pectic polysaccharides, as adsorbates the low methylated galacturonic acid backbone showed a slightly improved performance as compared to the highly methylated pectins (Lin et al., 2016). Also, the presence of sugar side chains which were arabinose and galactose for the most part, improved the adsorption rate while highly branched side chains make adsorption impossible (Zykwinska et al., 2008a). Nevertheless, even in the case of the positive adsorption of pectic polysaccharides on cellulose, its rate of adsorption was very slight as compared with the hemicelluloses (Zykwinska et al., 2008b). In this case, the pectic polysaccharides used: galactan, arabinan, rhamnogalacturonan, as well as the pectins with different degrees of esterification showed no affinity to the apple microfibrillar cellulose used. On the other hand, the structure of hemicelluloses is much more simple than that of the pectic polysaccharides. Hemicelluloses are usually linear chains with the glucose, mannose or xylose as a backbone and sugar units such as xylose, galactose, arabinose, glucuronic acid or fucose as side chains (Fig. 3b). In the present study, the highest adsorption was obtained for glucomannan and β -D-glucan. The glucomannan used in this study contained the repeating units of mannose and glucose linked by a β -1,4-glycosidic bond, while β -D-glucan is an unbranched polymer composed of D-glucose molecules connected by a β -1,4-glycosidic and β -1,3-glycosidic bond. While xyloglucan has a backbone composed of β -1,4-glucose with the xylan sugar as the main substitution, some arabinose, galactose and fucose may also be present. Xylan is composed of β -1,4-xylose with substitution mainly by arabinose, galactose and glucuronic acid (Fig. 3b). By taking into account the adsorption rate in the following order GM > G > XG > X the conclusion may be reached that the linear molecules composed mainly of glucose have a higher affinity to cellulose as compared to XG and X which have side chains (Fig. 3c). Moreover, XG which has a glucose backbone and xylose as sidechain had a higher adsorption rate comparing with X which has xylose as the backbone.

The adsorption kinetics showed that in the case of GM and G, the rapid processes dominated which probably led to the formation of trains and loops while there was no time to change the conformation on cellulose (Fig. 3c). In the case of XG, the kinetic models showed that the moderate and slow processes dominated, which may lead to changes in conformation on cellulose which also depends on the XG concentration. On the other hand, the low adsorption rate with the domination of rapid processes in the case of X adsorption may lead one to the conclusion that the flat conformation on cellulose microfibrils took place (Fig. 3c). This is also reflected in the results of the analysis of the electrophoretic mobility and mean hydrodynamic diameter.

Studies concerning the physicochemical properties of H in 0.001 M PBS confirmed the effect of concentration on changes in conformation

and also on the interactions of the macromolecules. In the case of G and XG, the observed decrease in the hydrodynamic diameter probably resulted from the structural reorganization of the macromolecules, the formation of more compact particles as well as changes which occurred to the structure and thickness of the solvation layer. For the barley G, it was shown by (Shelat et al., 2011) that the particles size was affected by the kinematic viscosities of the samples and ranged from about 200 nm to 400 nm at concentrations lower than 2000 mg/L. Among the H studied in a PBS solution at pH 7.4, an increase in the hydrodynamic diameter with increasing concentration was only determined for GM. Xylan, the last of the analysed H, was characterized by the most negative values of EM and ZP, and it showed no changes in hydrodynamic diameter at the concentration range applied. However, it was shown by (Kabel et al., 2007), that the stable nanoparticle aggregates with a size of around 300 nm may be formed by X in water. Performing a comparison of the results obtained and the literature data is difficult due to the different plant materials used, the dispersing media and the concentration ranges applied. However, for the majority of H studied in 0.001 M PBS, the effect of concentration on the size of the dispersed particles was notable. In considering this, it would be expected that such changes in the physicochemical properties of the H dispersion would accompany the adsorption process on C (with a decrease occurring in the concentration of H in the equilibrium solution compared to that in the applied solution).

Taking into account the effect of individual H on C, in the case of GM, there was no change in the size of the dispersed particles but the negatively charged functional groups of C were shielded which led to a decrease in the absolute value of EM. The G - C interaction resulted in an increase in the hydrodynamic diameter and a simultaneous decrease in the absolute value of EM. A similar effect, i.e. an increase in the particle size, was observed for XG but in this case a decrease in the absolute value of EM was insignificant. The adsorption of XG on C and the structure of the formed C + H complexes depended on the chemical structure of XG and the hydrophobicity of the C surface (Zhao et al., 2014). It was demonstrated for XG adsorption on the surface of cellulose nanocrystal (CNC) that low-molecular XG formed an extended layer whereas XG that had a higher molecular weight formed accessible loops and tails onto the C surface, thereby preventing C aggregation (Villares et al., 2017). This is consistent with the results obtained, showing an increase in the hydrodynamic diameter without any change in EM. It was found that the cellulose crystalline configuration is not affected by the adsorption of the mixed-linkage G, which forms a *para*-crystalline layer (Martínez-Sanz et al., 2017). A hydrogel formed by G on a C surface may form a foundation for the further attachment of other polysaccharides (Kiemle et al., 2014). The structure of the X layer adsorbed on the surface of C depends on the degree of acetylation. For highly acetylated X, this layer is dense and poorly hydrated, while for the de-acetylated X it is more hydrated (Jaafar et al., 2019). In the case of the experiment discussed above, X adsorption was low and thus no effect on EM was observed (as compared to the C and C + H systems).

The results of further statistical analysis generally show that the adsorption of small H particles with a high absolute value of EM was low on C. The higher the hydrodynamic diameter and the lower the absolute value of EM of the H particle interacting with C, the greater the particle size with a lower absolute value of EM in the C + H system and the higher the a_m value.

FT-IR and FT-Raman spectra, as well as the DSC thermograms of bulk residues after adsorption, were obtained to reveal the nature of the interaction between hemicelluloses and cellulose. In general terms, DSC showed that the degradation temperature increased in the case of the C + H systems as compared with cellulose. Higher temperature values of degradation may indicate that the cellulose has less mobility and that crystalline melting occurs with difficulty. Usually, the thermal stability of cellulose composites is substantially influenced by the intermolecular bonding between the cellulose and the polymer matrix. Close intermolecular bonding could enhance the bond dissociation energy required for

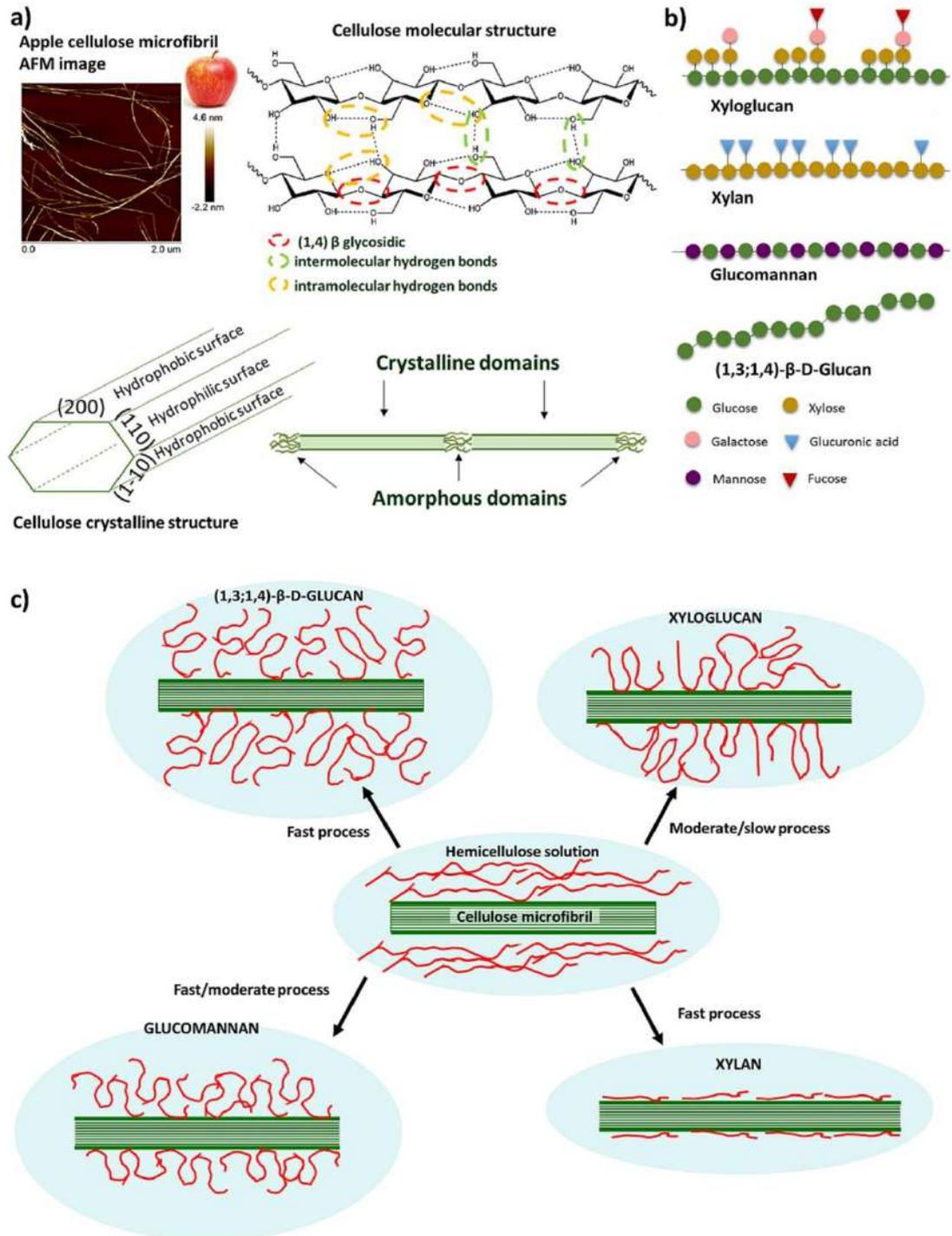


Fig. 3. The apple cellulose microfibril AFM image, cellulose molecular structure, crystalline structure and cellulose microfibril structure (a). The schematic representation of the structure of hemicellulose having the affinity to adsorb onto cellulose microfibrils: xyloglucan, xylan, glucomannan and (1,3;1,4)-β-D-Glucan (b). Possible models of the adsorption of the chosen hemicelluloses onto cellulose microfibrils (c).

the chain cleavage of macromolecules. In this case, the enthalpy in the case of C + GM, C + G and C + XG decreased as compared with the enthalpy obtained for cellulose alone. This could be evidence of incorporation by the hemicelluloses of the spacing between the cellulose microfibrils and in turn, of the lower stability of the systems. Moreover, the FT-IR and FT-Raman spectra showed that the weak interactions between hemicelluloses and cellulose are the most possible as the bands reflecting the H bonds didn't undergo changes. It supports also the results obtained by other researchers. [Wohlert et al. \(2022\)](#) concluded that the hydrogen bonds are not the main factor responsible for interactions between xyloglucan and cellulose simultaneously highlighting the importance of water molecules in the system. The increase of the entropy was assumed as main driver of adsorption process ([Kishani et al. 2021](#)). The molecular dynamic simulation has also revealed that the interaction with cellulose occurs over a short distance, and adsorption on the hydrophobic surface of the microfibril is preferable, indicating the importance of hydrophobic forces ([Park and Cosgrove, 2015](#)).

It is challenging to investigate the mechanical properties of small domains in plant cell walls. Therefore certain composites which mimic the plant cell wall were prepared. One of the methods used is the preparation of bacterial cellulose pellicles in the presence of plant cell wall hemicelluloses and pectins ([Chibrikov et al., 2023](#)). However, the structure of bacterial cellulose fibrils differs from those found in plants. Another method used is the direct preparation of the composites of plant cellulose and certain chosen hemicelluloses via solvent casting or through the use of a high pressure filtration method ([Szymańska-Chargot et al., 2019](#)). In general, the mechanical properties of the apple cellulose films were slightly inferior compared to those obtained previously for apple microfibrillar cellulose films ([Szymańska-Chargot et al., 2019](#)). Previously, it was mainly the mechanical properties of bacterial cellulose or nanocellulose and hemicelluloses composites that were investigated. The presence of xyloglucan in bacterial cellulose led to a decrease in Young's modulus and in terms of tensile strength and strain ([Chibrikov et al., 2023](#); [Gu & Catchmark, 2014](#)). However, in the case of the XG composites with Avicel cellulose, there was a dependence of the mechanical properties on the ratio of XG to cellulose ([Bendaoud et al., 2017](#)). A similar behaviour was obtained for the composites of cellulose nanofibrils and galactoglucomannan ([Luceñius et al., 2019](#)). The influence of xylan addition to the cellulose on the resulting mechanical properties of the composites is inconclusive. In the case of both the cellulose nanofibrils-xylan and bacterial cellulose-xylan composite, Young's modulus decreased with increasing xylan concentration, but in the case of 5–10% xylan in the composite, Young's modulus increased ([Chibrikov et al., 2023](#)). Basic information produced by the experiment concerns the influence of β -D-glucan on the mechanical properties of cellulose composites, however, the available results actually showed a decrease in Young's modulus, tensile strength and strain after the addition of 28–30% xylan to bacterial cellulose pellicles ([Mikkelsen et al., 2015](#)). In this case, a decrease in most mechanical properties only occurred for the initial amounts of XG as compared with pure cellulose film ([Fig. 2](#)). In the case of other XG concentrations and all of the concentrations used for GM, G and X, an increase in Young's modulus was obtained for the composites which means a lower elasticity value for the cellulose-hemicellulose composites. The stress at break (tensile strength) increased after the addition of chosen hemicelluloses, while an elongation at break decrease occurred with the increasing concentration of hemicelluloses. Again, the exceptions were the initial concentrations of XG.

5. Conclusion

The results obtained through an analysis of the adsorption of the chosen hemicelluloses and pectins on cellulose microfibrils undoubtedly showed that only in the case of hemicelluloses did an interaction occur. In the case of pectins, the results showed that no adsorption occurred or that the extent of the adsorption was below the sensitivity of the

analytical method. However, this result confirms those of previous studies which also showed that even if an interaction between cellulose and pectins occurs then it is very weak. Moreover, the amounts of adsorbed hemicellulose on microfibrillar cellulose in a never-dried state were lower than those obtained previously. Two isotherms were fitted to the experimental points which were Freundlich and Redlich-Peterson. These models have led to the conclusion that in the case of hemicellulose adsorption on cellulose there is no monolayer formation, while the large hemicellulose molecules can have different spatial structures. In the case of the chosen hemicelluloses, a different kinetic behaviour of adsorption was obtained but with the advantage of the fast process. This in turn could be evidence that hemicelluloses undergo reformation and formation of trains-and-tails on the surface of cellulose. The affinity of hemicellulose particles to cellulose increases with decreases in their EM and an increase in particle size. The smaller the molecule of hemicellulose, the lower the adsorption on cellulose. In the case of xylan which is the smallest molecule (the mean hydrodynamic diameter) the flat conformation on cellulose surface is the most probable. Also, the interaction of hemicellulose and cellulose has an influence on the mechanical properties of cellulose-based films. The films with different concentration of hemicellulose to cellulose were prepared. It was shown that the addition of hemicelluloses led to a rigidity of the films and also to an increase in their strength. However, the most interesting results were obtained for xyloglucan. The mechanical properties of the cellulose-xyloglucan films were dependent on the concentration of hemicellulose added to the cellulose film. The final conclusion can be made that the microfibrillar cellulose in a never-dried state has the potential to study the interaction with other non-cellulosic cell wall polysaccharides. The interaction between cellulose-hemicelluloses but not between cellulose and pectins has an impact if it comes to for example designing new food and packaging or coating materials using those cellulose-polysaccharide systems.

CRedit authorship contribution statement

Monika Szymańska-Chargot: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Patrycja Pękala:** Data curation, Investigation, Methodology, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Dawid Myśliwiec:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Software, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Jolanta Cieśla:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Piotr M. Pieczywek:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Writing – original draft. **Anna Siemińska-Kuczer:** Investigation, Methodology. **Artur Zdunek:** Writing – review & editing.

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

Data will be made available on request.

Acknowledgment

This research was funded in whole or in part by National Science Centre-Poland project no. NCN OPUS UMO-2018/29/B/NZ9/00141. For the purpose of Open Access, the author has applied a CC-BY public copyright license to any Author Accepted Manuscript (AAM) version arising from this submission

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137116>.

References

- Abik, F., Palasingh, C., Bhattarai, M., Leivers, S., Ström, A., Westereng, B., ... Nypelö, T. (2023). Potential of Wood Hemicelluloses and Their Derivates as Food Ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(6), 2667–2683. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06449>
- An, Y., Liu, W., Li, W., Pan, L., Lu, M., Cesarino, L., ... Zeng, W. (2022). Dietary fiber in plant cell walls—the healthy carbohydrates. *Food Quality and Safety*, 6, 1–17. <https://doi.org/10.1093/fqsa/fyab037>
- Becker, M., Alin, K., Bacher, M., Xu, C., Sundberg, A., Willfor, S., ... Potthast, A. (2021). Comparative hydrolysis analysis of cellulose samples and aspects of its application in conservation science. *Cellulose*, 28, 8719–8734. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04048-6>
- Bendaoud, A., Kehrbusch, R., Baranov, A., Duchemin, B., Maigret, J. E., Falourd, X., ... Leroy, E. (2017). Nanostructured cellulose-xyloglucan blends via ionic liquid/water processing. *Carbohydrate Polymers*, 168, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.080>
- Berglund, J., Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dhital, S., Gaunitz, S., Henriksson, G., ... Vilaplana, F. (2020). Wood hemicelluloses exert distinct biomechanical contributions to cellulose fibrillar networks. *Nature Communications*, 11, 4692. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18390-z>
- Chiang, H. T., Furuya, E. G., Miura, Y., & Noll, K. E. (2000). Effect of surface functional group on Freundlich adsorption isotherm. *Water Science and Technology*, 42(3–4), 161–166. <https://doi.org/10.2166/WST.2000.0374>
- Chen, M., Cathala, B., & Lalaiye, M. (2022). Adsorption of apple xyloglucan on cellulose nanofiber depends on molecular weight, concentration and building blocks. *Carbohydrate Polymers*, 296, Article 119994.
- 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>
- Dammak, A., Quémener, B., Bonnin, E., Alvarado, C., Bouchet, B., Villares, A., ... Cathala, B. (2015). Exploring architecture of xyloglucan cellulose nanocrystal complexes through enzyme susceptibility at different adsorption regimes. *Biomacromolecules*, 16(2), 589–596. https://doi.org/10.1021/BM5016317/SUPPL_FILE/BM5016317_SI_001.PDF
- Delgado, A. V., Gonzalez-Caballero, F., Hunter, R. J., Koopal, L. K., & Lyklema, J. (2007). Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *Journal of Colloid and Interface Science*, 309(2), 194–224. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.12.075>
- Guechi, E. K., & Hamdaoui, O. (2016). Sorption of malachite green from aqueous solution by potato peel: Kinetics and equilibrium modeling using non-linear analysis method. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S416–S424. <https://doi.org/10.1016/j.arabjcc.2011.05.011>
- Gu, J., & Catchmark, J. M. (2014). Roles of xyloglucan and pectin on the mechanical properties of bacterial cellulose composite films. *Cellulose*, 21(1), 275–289. <https://doi.org/10.1007/S10570-013-0115-0/FIGURES/6>
- Jaafar, Z., Mazzeau, K., Boissière, A., Le Gall, S., Villares, A., Vigouroux, J., ... Cathala, B. (2019). Meaning of xylan acetylation on xylan cellulose interactions: A quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) and molecular dynamic study. *Carbohydrate Polymers*, 226, Article 115315. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115315>
- Kabel, M. A., van den Borne, H., Vincken, J. P., Voragen, A. G. J., & Schols, H. A. (2007). Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.09.006>
- Kienle, S. N., Zhang, X., Esker, A. R., Toriz, G., Gatenholm, P., & Cosgrove, D. J. (2014). Role of (1,3)(1,4)- β -glucan in cell walls: Interaction with cellulose. *Biomacromolecules*, 15(5), 1727–1736. https://doi.org/10.1021/BM5001247/SUPPL_FILE/BM5001247_SI_001.PDF
- Kishani, S., Bensselfelt, T., Wågberg, L., & Wohlert, J. (2021). Entropy drives the adsorption of xyloglucan to cellulose surfaces – A molecular dynamics study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 588, 485–493. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.12.113>
- Lima, D. U., & Buckeridge, M. S. (2001). Interaction between cellulose and storage xyloglucans: The influence of the degree of galactosylation. *Carbohydrate Polymers*, 46, 157–163. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00297-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00297-6)
- 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>
- Lucentis, J., Valle Delgado, J. J., Parikka, K., & Österberg, M. (2019). Understanding hemicellulose-cellulose interactions in cellulose nanofibril-based composites. *Journal of Colloid and Interface Science*, 555, 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.07.053>
- Martinez-Sanz, M., Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Gidley, M. J., & Gilbert, E. P. (2017). Multi scale characterisation of deuterated cellulose composite hydrogels reveals evidence for different interaction mechanisms with arabinoxylan, mixed-linkage glucan and xyloglucan. *Polymer*, 124, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.07.036>
- Melton, L. D., Smith, B. G., Ibrahim, R., & Schröder, R. (2009). Mannans in primary and secondary plant cell walls. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 39, 159–160.
- Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Wilson, S. M., Baic, A., & Gidley, M. J. (2015). Interactions of Arabinoxylan and (1,3)(1,4)- β -Glucan with Cellulose Networks. *Biomacromolecules*, 16(4), 1232–1239. https://doi.org/10.1021/ACS.BIOMAC.5B00009/SUPPL_FILE/BM5B00009_SI_001.PDF
- Mysiwić, D., Chylińska, M., Szymańska-Chargot, M., Chibowski, S., & Zdunek, A. (2016). Revision of adsorption models of xyloglucan on microcrystalline cellulose. *Cellulose*, 23(5). <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0995-x>
- Park, Y. B., & Cosgrove, D. J. (2015). Xyloglucan and its interactions with other components of the growing cell wall. *Plant Cell Physiology*, 56, 180–194. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu204>
- SCAN CM. (2006). Total acidic group content.
- Shelat, K. J., Vilaplana, F., Nicholson, T. M., Gidley, M. J., & Gilbert, R. G. (2011). Diffusion and rheology characteristics of barley mixed linkage β -glucan and possible implications for digestion. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1732–1738. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.004>
- Smith Moritz, A. M., Hao, Z., Fernández Niño, S. G., Fangel, J. U., Verhertbruggen, Y., Holman, H. Y., ... Vega Sánchez, M. E. (2015). Structural characterization of a mixed-linkage glucan deficient mutant reveals alteration in cellulose microfibril orientation in rice coleoptile mesophyll cell walls. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00628>
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Gdula, K., Koziol, A., & Zdunek, A. (2017). Isolation and characterization of cellulose from different fruit and vegetable pomaces. *Polymers*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/polym9100495>
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Pieczywek, P. M., & Zdunek, A. (2019). Tailored nanocellulose structure depending on the origin. Example of apple parenchyma and carrot root celluloses. *Carbohydrate Polymers*, 210. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.070>
- Wohlert, M., Bensselfelt, T., Wågberg, L., Furó, I., Berglund, L. A., & Wohlert, J. (2022). Cellulose and the role of hydrogen bonds: Not in charge of everything. *Cellulose*, 29, 1–23. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04325-4>
- Villares, A., Bizot, H., Moreau, C., Rolland-Sabaté, A., & Cathala, B. (2017). Effect of xyloglucan molar mass on its assembly onto the cellulose surface and its enzymatic susceptibility. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1105–1112. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.072>
- Villares, A., Moreau, C., Dammak, A., Capron, I., & Cathala, B. (2015). Kinetic aspects of the adsorption of xyloglucan onto cellulose nanocrystals. *Soft Matter*, 11(32), 6472–6481. <https://doi.org/10.1039/C5SM01413A>
- Zhao, Z., Crespi, V. H., Kubicki, J. D., Cosgrove, D. J., & Zhong, L. (2014). Molecular dynamics simulation study of xyloglucan adsorption on cellulose surfaces: Effects of surface hydrophobicity and side chain variation. *Cellulose*, 21(2), 1025–1039. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0041-1/FIGURES/10>
- Zykwinska, A., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2008a). Modelling of xyloglucan, pectins and pectic side chains binding onto cellulose microfibrils. *Carbohydrate Polymers*, 74(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.01.011>
- Zykwinska, A., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2008b). Competitive binding of pectin and xyloglucan with primary cell wall cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 74(4), 957–961. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.05.004>
- 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. <https://doi.org/10.1104/PP.105.065912>. <https://github.com/ppieczywek/TDA>

10.1. Materiały uzupełniające publikacji P.4

Supplementary material

SM Table 1. The sugar composition (weight %) of the polysaccharides used in the present study is according to the information provided by each polysaccharide supplier.

	Glc%	Xyl%	Gal%	Man%	GlcA%	Ara%	Rha%	GalA%	Fuc%
Glucomannan	40	60							
β-D-glucan	94								
Xyloglucan	45	34	17			2			
Xylan		86.1			11.3				
Galactan			87			3	4	6	
Arabinan			18.7			69	1.4	10.2	
Rhamnogalacturonan		28	25			7	13	51	21
Citrus pectin DE 20-34%								>74	
Citrus pectin DE 55-70%								>74	
Citrus pectin DE ≥85%								>74	

Glc- glucose, Xyl – xylose, Gal – galactose, Man – mannose, GlcA – glucuronic acid, Ara – arabinose, Rha – rhamnose, GalA – galacturonic acid, Fuc – fucose, DE – esterification degree

SM Table 2. A comparison of the absorbance of the polysaccharide solutions used for the initial adsorption study before and after 24h of mixing with cellulose. Positive adsorption was obtained for xyloglucan, xylan, β-D-glucan and glucomannan – a reduction in the absorbance value was obtained after contact with cellulose. However, the lack of a decrease in the absorbance value after mixing with cellulose was observed for pectins, arabinan, galactan and rhamnogalacturonan which is the evidence of no adsorption occurring in this case.

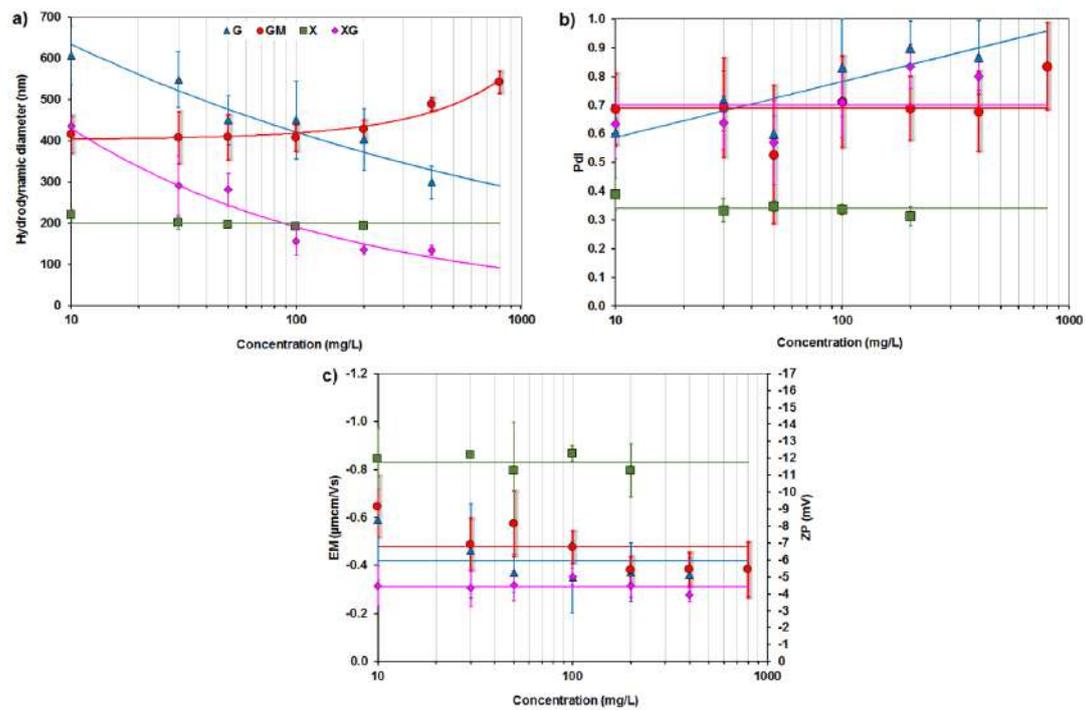
Sample	Initial concentration (ppm)	Absorbance of initial adsorbate concentration	Absorbance of supernatant after polysaccharide mixing with cellulose for 24 h
Pectin DE 20-34%	200	0.960	0.876
Pectin DE 55-70%	200	0.926	0.902
Pectin DE>85%	200	0.922	0.803
Arabinan	200	0.945	0.923
Galactan	200	0.815	0.763
Rhamnogalacturonan	200	0.800	0.830
β-D-glucan	200	1.049	0.070
Xyloglucan	200	0.763	0.038
Glucomannan	200	1.015	0.027
Xylan	200	1.994	0.555

SM Table 3. Fitting the experimental data to the theoretical models of Freundlich and the Redlich-Peterson isotherms.

Freundlich model					Redlich-Peterson model				
	G	GM	X	XG		G	GM	X	XG
k	0.82	2.63	0.20	0.96	a_m	1.27	3.01	0.22	1.00
n	1.77	2.30	1.88	3.36	k	0.71	1.40	2.53	6.47
					n	0.50	0.58	0.49	0.71
AIC_{corr}	44.97	25.19	3.30	25.28	AIC_{corr}	48.73	45.24	6.87	28.83
R²	0.73	0.98	0.82	0.92	R²	0.72	0.99	0.82	0.90

GM – glucomannan, G – β -D-glucan, XG – xyloglucan, X – xylan.

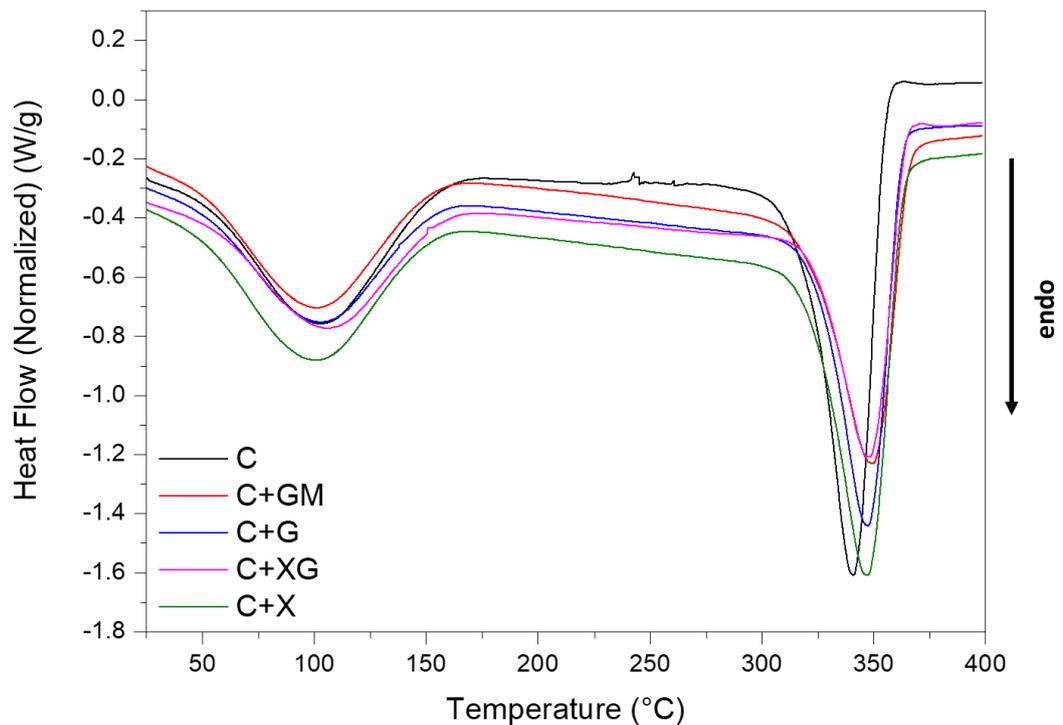
Hemicelluloses in PBS



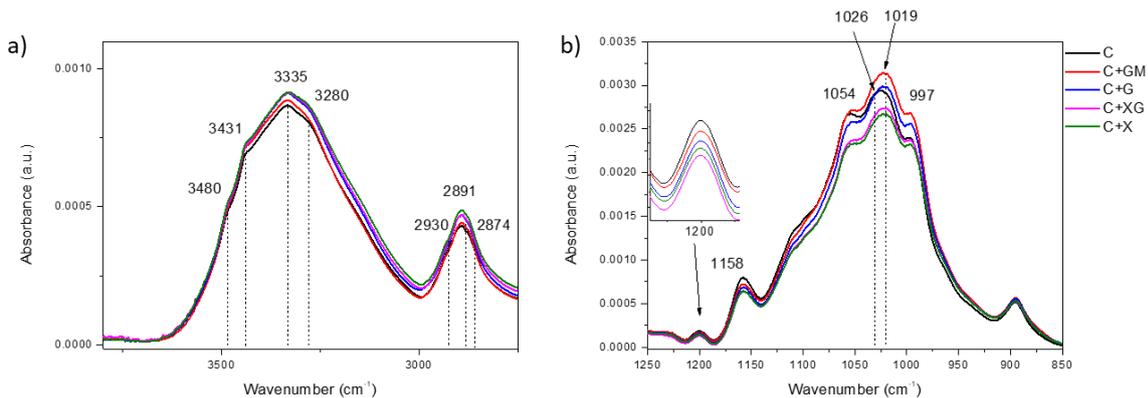
SM Fig. 1. An effect of H concentration in 0.001 M PBS on a) hydrodynamic diameter, b) polydispersity index (PDI), and c) electrophoretic mobility (EM) at 20°C.

The effect of the H concentration in 0.001 M PBS on the particle size and EM is shown in SM Fig. 1. For G and XG, the hydrodynamic diameter decreased with increasing concentration (from 608 ± 70 nm to 298 ± 39 nm for G and from 435 ± 22 nm to 134 ± 11 nm for XG). For GM, the particle size increased from 415 ± 46 nm to 542 ± 27 nm with increasing concentration, whereas for X, the concentration did not have any

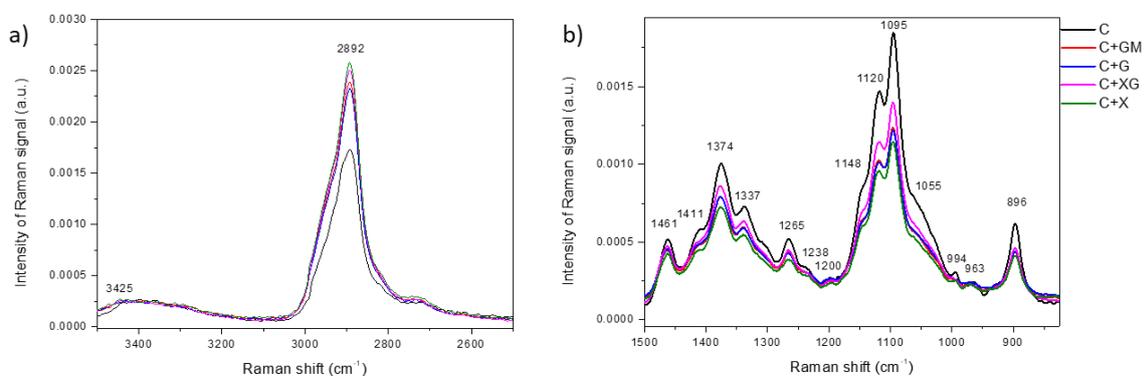
influence over the hydrodynamic diameter (the value was found to be at a level of 200 ± 14 nm). The dispersions of X were the most homogeneous in terms of particle size (PDI was 0.34 ± 0.04). For other H, the value of PDI was higher than 0.5 (0.69 ± 0.16 for GM, and 0.70 ± 0.13 for XG). In the case of G, the value of PDI increased with increasing concentration (from 0.60 ± 0.05 to 0.87 ± 0.13). The values of both EM and ZP were negative and an increase in the H concentration did not affect them significantly (one-way ANOVA). The absolute value of EM changed in the following order of H: XG ($0.31 \pm 0.05 \mu\text{mcm/Vs}$) \approx G ($0.42 \pm 0.16 \mu\text{mcm/Vs}$) \approx GM ($0.48 \pm 0.13 \mu\text{mcm/Vs}$) $<$ X ($0.83 \pm 0.11 \mu\text{mcm/Vs}$).



SM Fig.2. DSC curves of the cellulose-hemicellulose systems after adsorption.



SM Fig. 3. The FTIR spectra of the cellulose and cellulose-hemicellulose systems after adsorption in the range of $3800\text{--}2750\text{ cm}^{-1}$ (a) and $1250\text{--}850\text{ cm}^{-1}$ (b) within the highlighted regions of the most important bands.



SM Fig. 4. Raman spectra of the cellulose and cellulose-hemicellulose systems after adsorption in the range of $3600\text{--}2750\text{ cm}^{-1}$ (a) and $1500\text{--}825\text{ cm}^{-1}$ (b) within the highlighted region of the most important bands.

11. Bibliografia

Akkus, M., Ozkan, N., & Bakir, U. (2018). Efficient acetylation of xylans by exploiting the potassium acetate formed during the alkaline extraction. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(8), 3397-3403. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1221-8>

Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., & Staehelin, A. (2010). *Plant Cell Walls*. Garland Science. <https://doi.org/10.1201/9780203833476>

Albersheim, P., Neukom, H., & Deuel, H. (1960). Splitting of pectin chain molecules in neutral solutions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 90(1). [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(60\)90609-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(60)90609-3)

Aspinall, G. O. (1959). Structural Chemistry of the Hemicelluloses. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 14(C). [https://doi.org/10.1016/S0096-5332\(08\)60228-3](https://doi.org/10.1016/S0096-5332(08)60228-3)

Ayoub, A., Venditti, R. A., Pawlak, J. J., Sadeghifar, H., & Salam, A. (2013). Development of an acetylation reaction of switchgrass hemicellulose in ionic liquid without catalyst. *Industrial crops and Products*, 44, 306-314.

Bais, D., Trevisan, A., Lapasin, R., Partal, P., & Gallegos, C. (2005). Rheological characterization of polysaccharide–surfactant matrices for cosmetic O/W emulsions. *Journal of colloid and interface science*, 290(2), 546-556. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.04.044>

Barbacci, A., Lahaye, M., & Magnenet, V. (2013). Another Brick in the Cell Wall: Biosynthesis Dependent Growth Model. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074400>

Baruah, J., Nath, B. K., Sharma, R., Kumar, S., Deka, R. C., Baruah, D. C., & Kalita, E. (2018). Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. In *Frontiers in Energy Research* (Vol. 6, Issue DEC). <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>

Belmokaddem, F. Z., Pinel, C., Huber, P., Petit-Conil, M., & Da Silva Perez, D. (2011). Green synthesis of xylan hemicellulose esters. *Carbohydrate Research*, 346(18). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.10.012>

Berglund, J., Kishani, S., Morais de Carvalho, D., Lawoko, M., Wohler, J., Henriksson, G., ... & Vilaplana, F. (2020). Acetylation and sugar composition influence the (in) solubility of plant β -mannans and their interaction with cellulose surfaces. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(27), 10027-10040. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c01716>

Bidhendi, A. J., & Geitmann, A. (2016). Relating the mechanics of the primary plant cell wall to morphogenesis. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 67, Issue 2). <https://doi.org/10.1093/jxb/erv535>

Bi, R., Berglund, J., Vilaplana, F., McKee, L. S., & Henriksson, G. (2016). The degree of acetylation affects the microbial degradability of mannans. *Polymer Degradation and Stability*, 133. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.07.009>

- Bonner, W. A. (1961). The Anomers of Tetra-O-acetyl-2-deoxy-d-glucose. *Journal of Organic Chemistry*, 26(3). <https://doi.org/10.1021/jo01062a065>
- Busse-Wicher, M., Gomes, T. C. F., Tryfona, T., Nikolovski, N., Stott, K., Grantham, N. J., Bolam, D. N., Skaf, M. S., & Dupree, P. (2014). The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 79(3). <https://doi.org/10.1111/tpj.12575>
- Cavalier, D. M., & Keegstra, K. (2006). Two xyloglucan xylosyltransferases catalyze the addition of multiple xylosyl residues to cellohexaose. *Journal of Biological Chemistry*, 281(45). <https://doi.org/10.1074/jbc.M606379200>
- Chen, G. G., Qi, X. M., Guan, Y., Peng, F., Yao, C. L., & Sun, R. C. (2016). High Strength Hemicellulose-Based Nanocomposite Film for Food Packaging Applications. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(4). <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01252>
- 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>
- Cosgrove, D. J. (1993). Wall extensibility: its nature, measurement and relationship to plant cell growth. *New Phytologist*, 124(1). <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03795.x>
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 6, Issue 11). <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Cosgrove, D. J., & Jarvis, M. C. (2012). Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 3, Issue AUG). <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00204>
- Costa, G., & Plazanet, I. (2016). Plant Cell Wall, a Challenge for Its Characterisation. *Advances in Biological Chemistry*, 06(03). <https://doi.org/10.4236/abc.2016.63008>
- Cybulska, J., Drobek, M., Panek, J., Cruz-Rubio, J. M., Kurzyna-Szklarek, M., Zdunek, A., & Fraç, 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>
- Brummell, D. A. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*, 33(2), 103-119. <https://doi.org/10.1071/FP05234>
- de Carvalho, D. M., Berglund, J., Marchand, C., Lindström, M. E., Vilaplana, F., & Sevastyanova, O. (2019). Improving the thermal stability of different types of xylan by acetylation. *Carbohydrate Polymers*, 220. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.063>
- Dervilly-Pinel, G., Tran, V., & Saulnier, L. (2004). Investigation of the distribution of arabinose residues on the xylan backbone of water-soluble arabinoxylans from wheat flour. *Carbohydrate Polymers*, 55(2). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.09.004>

- de Souza, A. P., Leite, D. C. C., Pattathil, S., Hahn, M. G., & Buckeridge, M. S. (2013). Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. *Bioenergy Research*, 6(2). <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9268-1>
- Doerflinger, F. C., Miller, W. B., Nock, J. F., & Watkins, C. B. (2015). Relationships between starch pattern indices and starch concentrations in four apple cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 110. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.012>
- 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). <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Eklund, F. S.; Ardá, A.; Eklund, P.; André, S.; Gabius, H.-J.; Jiménez-Barbero, J.; Leino, R. Studies Related to Norway Spruce Galactoglucomannans: Chemical Synthesis, Conformation Analysis, NMR Spectroscopic Characterization, and Molecular Recognition of Model Compounds. *Chem. - Eur. J.* 2012, 18 (45), 14392–14405. <https://doi.org/10.1002/chem.201200510>
- Farhat, W., Venditti, R., Quick, A., Taha, M., Mignard, N., Becquart, F., & Ayoub, A. (2017). Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. *Industrial Crops and Products*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.055>
- Fry, S. C. (1989). The structure and functions of xyloglucan. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 40, Issue 1). <https://doi.org/10.1093/jxb/40.1.1>
- Fundador, N. G. V., Enomoto-Rogers, Y., Takemura, A., & Iwata, T. (2012). Acetylation and characterization of xylan from hardwood kraft pulp. *Carbohydrate Polymers*, 87(1). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.034>
- Gautam, D., Kumari, S., Ram, B., Chauhan, G. S., & Chauhan, K. (2018). A new hemicellulose-based adsorbent for malachite green. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(4). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.05.029>
- Geitmann, A. (2010). Mechanical modeling and structural analysis of the primary plant cell wall. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 13, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.09.017>
- Gille, S., & Pauly, M. (2012). O-acetylation of plant cell wall polysaccharides. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 3, Issue JAN). <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00012>
- Gong, H., Li, W., Sun, J., Jia, L., Guan, Q., Guo, Y., & Wang, Y. (2022). A review on plant polysaccharide based on drug delivery system for construction and application, with emphasis on traditional Chinese medicine polysaccharide. *International journal of biological macromolecules*, 211, 711-728. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.087>
- Gordobil, O., Egüés, I., Urruzola, I., & Labidi, J. (2014). Xylan-cellulose films: Improvement of hydrophobicity, thermal and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.060>

- Gu, J., & Catchmark, J. M. (2013). The impact of cellulose structure on binding interactions with hemicellulose and pectin. *Cellulose*, 20(4). <https://doi.org/10.1007/s10570-013-9965-8>
- Hasan, M. U., Singh, Z., Shah, H. M. S., Kaur, J., & Woodward, A. (2024). Water loss: A postharvest quality marker in apple storage. *Food and Bioprocess Technology*, 17(8), 2155-2180. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03305-9>
- Hatfield, Ronald D. Cell wall polysaccharide interactions and degradability. *Forage cell wall structure and digestibility*, 1993, p. 285-313.
- Hayashi, T. (1989). Xyloglucans in the Primary Cell Wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.001035>
- Heinonen, E., Henriksson, G., Lindström, M. E., Vilaplana, F., & Wohler, J. (2022). Xylan adsorption on cellulose: Preferred alignment and local surface immobilizing effect. *Carbohydrate Polymers*, 285. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119221>
- Heredia, A., Jiménez, A., & Guillén, R. (1995). Composition of plant cell walls. In *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (Vol. 200, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/BF01192903>
- Huang, Z., Zong, M. H., & Lou, W. Y. (2022). Effect of acetylation modification on the emulsifying and antioxidant properties of polysaccharide from *Millettia speciosa* Champ. *Food Hydrocolloids*, 124. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107217>
- Imai, T., & Sugiyama, J. (1998). Nanodomains of I α and I β cellulose in algal microfibrils. *Macromolecules*, 31(18). <https://doi.org/10.1021/ma980664h>
- Jarczewski, A. (2007). *Materiały do ćwiczeń laboratoryjnych z chemii organicznej dla studentów biologii*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Jarvis, M. C. (2023). Hydrogen bonding and other non-covalent interactions at the surfaces of cellulose microfibrils. In *Cellulose* (Vol. 30, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s10570-022-04954-3>
- Johnson, R. L., & Schmidt-Rohr, K. (2014). Quantitative solid-state ¹³C NMR with signal enhancement by multiple cross polarization. *Journal of Magnetic Resonance*, 239, 44-49.
- Johnston, J. W., Hewett, E. W., & Hertog, M. L. (2002). Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: a review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 30(3), 145-160. <https://doi.org/10.1080/01140671.2002.9514210>
- Kačuráková, M., Belton, P. S., Wilson, R. H., Hirsch, J., & Ebringerová, A. (1998). Hydration properties of xylan-type structures: An FTIR study of xylooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(1). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199805\)77:1<38::AID-JSFA999>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199805)77:1<38::AID-JSFA999>3.0.CO;2-5)

- 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. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 278). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118909>
- Kim, J. S., Awano, T., Yoshinaga, A., & Takabe, K. (2010). Temporal and spatial immunolocalization of glucomannans in differentiating earlywood tracheid cell walls of *Cryptomeria japonica*. *Planta*, 232(2). <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1189-7>
- Kishani, S., Benselfelt, T., Wågberg, L., & Wohler, J. (2021). Entropy drives the adsorption of xyloglucan to cellulose surfaces – A molecular dynamics study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 588. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.12.113>
- Koller, A., & Neukom, H. (1964). Detection of oligogalacturonic acids by thin-layer chromatography. *BBA - Specialized Section on Mucoproteins and Mucopolysaccharides*, 83(3). [https://doi.org/10.1016/0926-6526\(64\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0926-6526(64)90020-5)
- Koroskenyi, B., & McCarthy, S. P. (2001). Synthesis of acetylated konjac glucomannan and effect of degree of acetylation on water absorbency. *Biomacromolecules*, 2(3). <https://doi.org/10.1021/bm010014c>
- Kundu, T., Smith, J. C., & Gupta, M. (2025). Effect of Acetylation Patterns of Xylan on Interactions with Cellulose. *Biomacromolecules*, 26(3), 1659-1671. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.4c01469>
- Levigne, S., Thomas, M., Ralet, M. C., Quémener, 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.
- Lee, C., Dazen, K., Kafle, K., Moore, A., Johnson, D. K., Park, S., & Kim, S. H. (2015). Correlations of apparent cellulose crystallinity determined by XRD, NMR, IR, Raman, and SFG methods. *Advances in Polymer Science*, 271. https://doi.org/10.1007/12_2015_320
- Li, J., Hu, X., Li, X., & Ma, Z. (2016). Effects of acetylation on the emulsifying properties of *Artemisia sphaerocephala* Krasch. polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 144. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.039>
- Li, Q., Wang, S., Jin, X., Huang, C., & Xiang, Z. (2020). The application of polysaccharides and their derivatives in pigment, barrier, and functional paper coatings. In *Polymers* (Vol. 12, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/POLYM12081837>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.004>
- Liu, J. Y., Wang, H. C., Yin, Y., Li, N., Cai, P. L., & Yang, S. L. (2012). Controlled acetylation of water-soluble glucomannan from *Bletilla striata*. *Carbohydrate polymers*, 89(1), 158-162. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.065>
- Macedo, J. V. C., Martins, J. R., Abe, M. M., Branciforti, M. C., & Brienzo, M. (2022). Hemicellulose Application for the Production of Bioplastics and Biomaterials. https://doi.org/10.1007/978-981-16-3682-0_8

Martins, J. R., Llanos, J. H. R., Botaro, V., Gonçalves, A. R., & Brienzo, M. (2024). Hemicellulose Biomass Degree of Acetylation (Natural Versus Chemical Acetylation) as a Strategy for Based Packaging Materials. *Bioenergy Research*. <https://doi.org/10.1007/s12155-024-10734-7>

McMurry J. *Chemia organiczna*. PWN Warszawa 2000

Melton, L. D., Smith, B. G., Ibrahim, R., & Schröder, R. (2009). Mannans in primary and secondary plant cell walls. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 39(1).

Mohammed, A. S. A., Naveed, M., & Jost, N. (2021). Polysaccharides; classification, chemical properties, and future perspective applications in fields of pharmacology and biological medicine (a review of current applications and upcoming potentialities). *Journal of Polymers and the Environment*, 29(8), 2359-2371. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02052-2>

Mohebbi, B. (2008). Application of ATR infrared spectroscopy in wood acetylation. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 10(3).

Mugwagwa, L. R., & Chimphango, A. F. A. (2020). Enhancing the functional properties of acetylated hemicellulose films for active food packaging using acetylated nanocellulose reinforcement and polycaprolactone coating. *Food Packaging and Shelf Life*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100481>

Myśliwiec, D., Chylińska, M., Szymańska-Chargot, M., Chibowski, S., & Zdunek, A. (2016). Revision of adsorption models of xyloglucan on microcrystalline cellulose. *Cellulose*, 23(5). <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0995-x>

Oehme, D. P., Doblin, M. S., Wagner, J., Bacic, A., Downton, M. T., & Gidley, M. J. (2015). Gaining insight into cell wall cellulose microfibril organisation by simulating microfibril adsorption. *Cellulose*, 22(6). <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0778-9>

Park, Y. B., & Cosgrove, D. J. (2015). Xyloglucan and its interactions with other components of the growing cell wall. In *Plant and Cell Physiology* (Vol. 56, Issue 2). <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu204>

Pauly, M., & Keegstra, K. (2016). Biosynthesis of the Plant Cell Wall Matrix Polysaccharide Xyloglucan*. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 67). <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112222>

Pauly, M., & Ramírez, V. (2018). New insights into wall polysaccharide o-acetylation. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01210>

Peirs, A., Scheerlinck, N., Perez, A. B., Jancsó, P., & Nicolai, B. M. (2002). Uncertainty analysis and modelling of the starch index during apple fruit maturation. *Postharvest Biology and Technology*, 26(2). [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00038-8)

Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., & Zdunek, A. (2023). Interactions between non-cellulosic plant cell wall polysaccharides and cellulose emerging from adsorption studies. *Cellulose*, 30(15), 9221-9239.

- Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Cybulska, J., Zdunek, A. (2025a). Monosaccharide composition and degree of acetylation of non-cellulosic cell wall polysaccharides and their relationship to apple firmness. *Food Chemistry*, 470, 142639.
- Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A. (2025b). Acetylated hemicelluloses and esterified pectin alterations in apple cell walls during the development of two apple cultivars: Insights from FT-IR, Raman spectroscopy, and imaging. *Food Chemistry*, 146129
- Rao, J., Lv, Z., Chen, G., & Peng, F. (2023). Hemicellulose: Structure, chemical modification, and application. In *Progress in Polymer Science* (Vol. 140). <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2023.101675>
- Ray, S., Vigouroux, J., Quémener, B., Bonnin, E., & Lahaye, M. (2014). Novel and diverse fine structures in LiCl-DMSO extracted apple hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 108(1). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.017>
- Redgwell R.J., Curti D., Gehin-Delval C., Physicochemical properties of cell wall materials from apple, kiwifruit and tomato, *European Food Research and Technology*, 2008, 227:607-618.
- Ren, J. L., Sun, R. C., Liu, C. F., Cao, Z. N., & Luo, W. (2007). Acetylation of wheat straw hemicelluloses in ionic liquid using iodine as a catalyst. *Carbohydrate Polymers*, 70(4), 406-414. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.04.022>
- Roland, J. C., & Vian, B. (1979). The Wall of the Growing Plant Cell: Its Three-Dimensional Organization. *International Review of Cytology*, 61(C). [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61997-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61997-X)
- Saxena, I. M., & Brown, R. M. (2005). Cellulose biosynthesis: Current views and evolving concepts. In *Annals of Botany* (Vol. 96, Issue 1). <https://doi.org/10.1093/aob/mci155>
- SCAN-CM. (2006). Total acidic group content.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Segal, L. G. J. M. A., Creely, J. J., Martin Jr, A. E., & Conrad, C. M. (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile research journal*, 29(10), 786-794. <https://doi.org/10.1177/0040517559029010>
- Showalter, A. M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. In *Plant Cell* (Vol. 5, Issue 1). <https://doi.org/10.1105/tpc.5.1.9>
- Simmons, T. J., Mortimer, J. C., Bernardinelli, O. D., Pöppler, A. C., Brown, S. P., DeAzevedo, E. R., Dupree, R., & Dupree, P. (2016). Folding of xylan onto cellulose fibrils in plant cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13902>

- Spiller, G. A., Amen, R. J., & Kritchevsky, D. (1975). Dietary fiber in human nutrition. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 7(1), 39-70. <https://doi.org/10.1080/10408397509527201>
- Stepan, A. M., King, A. W. T., Kakko, T., Toriz, G., Kilpeläinen, I., & Gatenholm, P. (2013). Fast and highly efficient acetylation of xylans in ionic liquid systems. *Cellulose*, 20(6). <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0028-y>
- Šturcova, A., His, I., Apperley, D. C., Sugiyama, J., & Jarvis, M. C. (2004). Structural details of crystalline cellulose from higher plants. *Biomacromolecules*, 5(4). <https://doi.org/10.1021/bm034517p>
- Szymanska-Chargot, M., Adamiak, A., & Zdunek, A. (2012). Pre-harvest monitoring of apple fruits development with the use of biospeckle method. *Scientia Horticulturae*, 145. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.07.024>
- Szymanska-Chargot, M., Chylinska, M., Kruk, B., & Zdunek, A. (2015). Combining FT-IR spectroscopy and multivariate analysis for qualitative and quantitative analysis of the cell wall composition changes during apples development. *Carbohydrate Polymers*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.039>
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Pieczywek, P. M., & Zdunek, A. (2019). Tailored nanocellulose structure depending on the origin. Example of apple parenchyma and carrot root celluloses. *Carbohydrate Polymers*, 210. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.070>
- Tenhaken, R. (2015). Cell wall remodeling under abiotic stress. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 5, Issue JAN). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00771>
- Tang, N., Cai, Y., Ma, J. L., Ye, H., & Xiang, Z. Y. (2023). Structural elucidation of hemicelluloses from oil-tea camellia fruit shell. *International Journal of Biological Macromolecules*, 246, 125643. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125643>
- Trejo-Cáceres, M., Sánchez, M. C., & Martín-Alfonso, J. E. (2024). Assessment of the acetylation process of wheat straw pulp as sustainable rheological modifier for non-polar fluids. *Cellulose*, 31(4). <https://doi.org/10.1007/s10570-024-05750-x>
- Van Soest, P. V., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*, 74(10), 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Wohlert, M., Benselfelt, T., Wågberg, L., Furó, I., Berglund, L. A., & Wohlert, J. (2022). Cellulose and the role of hydrogen bonds: not in charge of everything. In *Cellulose* (Vol. 29, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04325-4>
- Xie, J. H., Zhang, F., Wang, Z. J., Shen, M. Y., Nie, S. P., & Xie, M. Y. (2015). Preparation, characterization and antioxidant activities of acetylated polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* leaves. *Carbohydrate Polymers*, 133. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.031>

- Xu, F., Sun, R. C., Sun, X. F., Geng, Z. C., Xiao, B., & Sun, J. X. (2004). Analysis and characterization of acetylated sugarcane bagasse hemicelluloses. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 9(4). <https://doi.org/10.1080/10236660490920228>
- Yang, H., Watts, H. D., Gibilterra, V., Weiss, T. B., Petridis, L., Cosgrove, D. J., & Kubicki, J. D. (2019). Quantum Calculations on Plant Cell Wall Component Interactions. *Interdisciplinary Sciences – Computational Life Sciences*, 11(3). <https://doi.org/10.1007/s12539-018-0293-4>
- Yao, M., Liang, C., Yao, S., Liu, Y., Zhao, H., & Qin, C. (2021). Kinetics and Thermodynamics of Hemicellulose Adsorption onto Nanofibril Cellulose Surfaces by QCM-D. *ACS Omega*, 6(45). <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04391>
- Zdunek, A., Konopacka, D., & Jesionkowska, K. (2010). Crispness and crunchiness judgment of apples based on contact acoustic emission. *Journal of texture studies*, 41(1), 75-91.
- 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>
- 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.
- Zhao, G. (2011). Sorption of Heavy Metal Ions from Aqueous Solutions: A Review. *The Open Colloid Science Journal*, 4(1). <https://doi.org/10.2174/1876530001104010019>
- Zhong, R., Cui, D., & Ye, Z. H. (2019). Secondary cell wall biosynthesis. In *New Phytologist* (Vol. 221, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/nph.15537>
- Zhong, R., & Ye, Z. H. (2007). Regulation of cell wall biosynthesis. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 10, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.09.001>
- Zugenmaier, P. (2008). *Crystalline cellulose and derivatives: characterization and structures*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

12. Oświadczenia współautorów



Lublin, 27.08.2025 r.

Mgr Patrycja Karolina Pękala
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:

P1: Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A. (2023) Interactions between non-cellulosic plant cell wall polysaccharides and cellulose emerging from adsorption studies – a review. *Cellulose* 30, 9221–9239 DOI.ORG/10.1007/S10570-023-05442-Y

P2: Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2025). Monosaccharide composition and degree of acetylation of non-cellulosic cell wall polysaccharides and their relationship to apple firmness. *Food Chemistry*, 470, 142639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.142639>,

P3: Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A. (2025) Acetylated hemicelluloses and esterified pectin alterations in apple cell walls during the development of two apple cultivars: Insights from FT-IR, Raman spectroscopy, and imaging. *Food Chemistry*, 146129 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.146129>

P4: Szymańska-Chargot, M., Pękala, P., Myśliwiec, D., Cieśla, J., Pieczywek, P. M., Siemińska-Kuczer, A., Zdunek, A. (2024). A study of the properties of hemicelluloses adsorbed onto microfibrillar cellulose isolated from apple parenchyma. *Food Chemistry*, 430, 137116.

DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.137116

Mój wkład w powyższe prace obejmował:

- Analiza danych literaturowych
- współdziałanie w opracowaniu koncepcji, metodyki i zakresu badań,
- przeprowadzenie badań laboratoryjnych
- analiza i interpretacja wyników badań,
- wiodący udział w procesie przygotowania, edycji i korekcie wymienionych manuskryptów,
- statystyczne i graficzne opracowanie danych

Podpis

Patrycja Pękala
.....

Lublin, 27 .08.2025 r.

dr hab. Monika Szymańska-Chargot
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniżej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Patrycji Karoliny Pękali:

P1: Pękala, P., **Szymańska-Chargot, M.**, Zdunek, A. (2023) Interactions between non-cellulosic plant cell wall polysaccharides and cellulose emerging from adsorption studies – a review. *Cellulose* 30, 9221–9239 DOI.ORG/10.1007/S10570-023-05442-Y

P2: Pękala, P., **Szymańska-Chargot, M.**, Cybulska, J., & Zdunek, A. (2024). Monosaccharide composition and degree of acetylation of non-cellulosic cell wall polysaccharides and their relationship to apple firmness. *Food Chemistry*, 470, 142639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.142639>,

P3: Pękala, P., **Szymańska-Chargot, M.**, Zdunek, A. (2025) Acetylated hemicelluloses and esterified pectin alterations in apple cell walls during the development of two apple cultivars: Insights from FT-IR, Raman spectroscopy, and imaging. *Food Chemistry*, 146129 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.146129>

P4: **Szymańska-Chargot, M.**, Pękala, P., Myśliwiec, D., Cieśla, J., Pieczywek, P. M., Siemińska-Kuczer, A., Zdunek, A. (2024). A study of the properties of hemicelluloses adsorbed onto microfibrillar cellulose isolated from apple parenchyma. *Food Chemistry*, 430, 137116. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.137116

Mój wkład w powyższe prace obejmował:

- pełnienie funkcji kierownika projektu, w ramach którego realizowano badania,
- współdziałanie w opracowaniu koncepcji, metodyki i zakresu badań,
- udział w analizie i interpretacji wyników badań,
- nadzorowanie i współdziałanie w procesie przygotowania, edycji i korekcie wymienionych manuskryptów,
- pełnienie funkcji autora korespondencyjnego

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Patrycji Karoliny Pękali.

Podpis



Lublin, 02.09.2025 r.

Prof. dr hab. Artur Zdunek
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniżej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Patrycji Karoliny Pękali:

P1: Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., **Zdunek, A.** (2023) Interactions between non-cellulosic plant cell wall polysaccharides and cellulose emerging from adsorption studies – a review. *Cellulose* 30, 9221–9239 DOI.ORG/10.1007/S10570-023-05442-Y

P2: Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Cybulska, J., & **Zdunek, A.** (2025). Monosaccharide composition and degree of acetylation of non-cellulosic cell wall polysaccharides and their relationship to apple firmness. *Food Chemistry*, 470, 142639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.142639>,

P3: Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., **Zdunek, A.** (2025) Acetylated hemicelluloses and esterified pectin alterations in apple cell walls during the development of two apple cultivars: Insights from FT-IR, Raman spectroscopy, and imaging. *Food Chemistry*, 146129 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.146129>

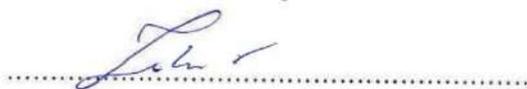
P4: Szymańska-Chargot, M., Pękala, P., Myśliwiec, D., Cieśla, J., Pieczywek, P. M., Siemińska-Kuczer, A., **Zdunek, A.** (2024). A study of the properties of hemicelluloses adsorbed onto microfibrillar cellulose isolated from apple parenchyma. *Food Chemistry*, 430, 137116. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.137116

Mój wkład w powyższe prace obejmował:

- współudział w omówieniu wyników badań,
- współudział w procesie przygotowania i edycji wymienionych manuskryptów

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Patrycji Karoliny Pękali.

Podpis



Lublin, 02.09.2025 r.

Prof. dr hab. inż. Justyna Cybulska
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 Patrycji Karoliny Pękali:

P2: Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., **Cybulska, J.**, & Zdunek, A. (2024). Monosaccharide composition and degree of acetylation of non-cellulosic cell wall polysaccharides and their relationship to apple firmness. Food Chemistry, 142639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.142639>,

Mój wkład w powyższej pracy obejmował:

- współudział w opracowaniu metodyki wykorzystanej w badaniach,
- wykonaniu oznaczeń zawartości monosacharydów,
- udziale w analizie i interpretacji wyników badań,

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Patrycji Karoliny Pękali.

Podpis



.....

Lublin, 02.09.2025 r.

Dr hab. Jolanta Cieśla
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 Patrycji Karoliny Pękali:

P4: Szymańska-Chargot, M., Pękala, P., Myśliwiec, D., **Cieśla, J.**, Pieczywek, P. M., Siemińska-Kuczer, A., Zdunek, A. (2024). A study of the properties of hemicelluloses adsorbed onto microfibrillar cellulose isolated from apple parenchyma. *Food Chemistry*, 430, 137116.

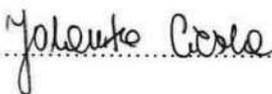
DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.137116

Mój wkład w powyższej pracy obejmował:

- współudział w opracowaniu metodyki wykorzystanej w badaniach,
- wykonaniu analizy właściwości elektrokinetycznych i pomiaru wielkości,
- udziale w analizie i interpretacji wyników badań,

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Patrycji Karoliny Pękali.

Podpis


.....

Lublin, 20.08.2025 r.

Dr Anna Siemińska-Kuczer
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 Patrycji Karoliny Pękali:

P4: Szymańska-Chargot, M., Pękala, P., Myśliwiec, D., Cieśla, J., Pieczywek, P. M., **Siemińska-Kuczer, A.**, Zdunek, A. (2024). A study of the properties of hemicelluloses adsorbed onto microfibrillar cellulose isolated from apple parenchyma. *Food Chemistry*, 430, 137116.

DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.137116

Mój wkład w powyższej pracy obejmował:

- współudział w opracowaniu metodyki wykorzystanej w badaniach,
- wykonanie badań zawartości monosacharydów,
- udziale w analizie wyników badań,

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Patrycji Karoliny Pękali.

Podpis

Anna Siemińska-Kuczer

Lublin, 20.08.2025 r.

Dr hab. inż. Piotr M. Pieczywek
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniżej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Patrycji Karoliny Pękali:

P4: Szymańska-Chargot, M., Pękala, P., Myśliwiec, D., Cieśla, J., **Pieczywek, P. M.**, Siemińska-Kuczer, A., Zdunek, A. (2024). A study of the properties of hemicelluloses adsorbed onto microfibrillar cellulose isolated from apple parenchyma. *Food Chemistry*, 430, 137116.

DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.137116

Mój wkład w poniższe prace obejmował:

- współdziałanie w opracowaniu metodyki wykorzystanej w badaniach,
- wykonaniu badań mechanicznych kompozytów,
- udziale w analizie i interpretacji wyników badań,

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Patrycji Karoliny Pękali.

Podpis
Elektronicznie
podpisany przez
Piotr Pieczywek
Data: 2025.08.20
12:57:11 +02'00'

Lublin, 09.09.2025 r.

Dr Dawid Myśliwiec
UNB
Al. Gen. W. Sikorskiego 3,
20-814 Lublin, Poland

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Patrycji Karoliny Pękali:

P4: Szymańska-Chargot, M., Pękala, P., **Myśliwiec, D.**, Cieśla, J., Pieczywek, P. M., Siemińska-Kuczer, A., Zdunek, A. (2024). A study of the properties of hemicelluloses adsorbed onto microfibrillar cellulose isolated from apple parenchyma. *Food Chemistry*, 430, 137116.

DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.137116

Mój wkład w powyższej pracy obejmował:

- współdziałanie w opracowaniu metodyki wykorzystanej w badaniach,
- wykonaniu analizy modeli adsorpcyjnych,
- udziale w analizie i interpretacji wyników badań,

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Patrycji Karoliny Pękali.

Podpis

.....

13. Życiorys naukowy

Mgr Patrycja Karolina Pękala

ŻYCIORYS NAUKOWY

Imię i nazwisko: Patrycja Karolina Pękala

Miejsce pracy: Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin
Telefon: (81) 744 50 61 w. 231
E-mail: p.pekala@ipan.lublin.pl

WYKSZTAŁCENIE

2021-2025 Doktorantka w Interdyscyplinarnej Szkole Doktorskiej Nauk Rolniczych w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN,
Dziedzina: nauki rolnicze
Dyscyplina: rolnictwo i ogrodnictwo
Tytuł pracy: „Zmiany stopnia O-acetylacji niecelulozowych polisacharydów podczas rozwoju i dojrzewania owoców i ich wpływ na właściwości mechaniczne i mikrostrukturę tkanki roślinnej”

2018 Mgr chemii, Uniwersytet Marii Curie – Skłodowskiej w Lublinie
Kierunek: chemia
Specjalność: analityka chemiczna
Tytuł pracy: „Badania adsorpcji kwasu jabłkowego na granicy faz hydroksyapatyt/roztwór elektrolitu”

DOŚWIADCZENIE ZAWODOWE

2019 - obecnie Pracownik Inżynierski w Zakładzie Biospektroskopii i Mechaniki Biomateriałów w Instytucie Agrofizyki PAN im. Bohdana Dobrzańskiego w Lublinie

2019-2019 Starszy Laborant Kontroli Jakości w Laboratorium Kosmetycznym Dr Ireny Eris w Piasecznie

STAŻE

01.09 – 02.12.2025 Staż w BIA INRAE w Nantes, Francja.
W ramach projektu NAWA Preludium Bis2

02.07- 19.10.2018 Staż w Kontroli Jakości w Laboratorium Kosmetycznym Dr Ireny Eris w Piasecznie

ZAINTERESOWANIA NAUKOWE

- Polisacharydy roślinnej ściany komórkowej
- Oddziaływania pomiędzy polisacharydami ściany komórkowej
- Właściwości fizykochemiczne acetylowanych hemiceluloz
- Badania adsorpcyjne
- Metody spektroskopowe w badaniach polisacharydów

WYKAZ OSIĄGNIĘĆ W PRACY NAUKOWO-BADAWCZEJ

PUBLIKACJE

Lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

Pękała, P., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A. (2025b). Acetylated hemicelluloses and esterified pectin alterations in apple cell walls during the development of two apple cultivars: Insights from FT-IR, Raman spectroscopy, and imaging. *Food Chemistry*, 146129

Pękała, P., Szymańska-Chargot, M., Cybulska, J., Zdunek, A. (2025a). Monosaccharide composition and degree of acetylation of non-cellulosic cell wall polysaccharides and their relationship to apple firmness. *Food Chemistry*, 470, 142639.

Szymańska-Chargot, M., Pękała, P., Myśliwiec, D., Cieśla, J., Pieczywek, P. M., Siemińska-Kuczer, A., & Zdunek, A. (2024). A study of the properties of hemicelluloses adsorbed onto microfibrillar cellulose isolated from apple parenchyma. *Food Chemistry*, 430, 137116.

Pękała, P., Szymańska-Chargot, M., & Zdunek, A. (2023). Interactions between non-cellulosic plant cell wall polysaccharides and cellulose emerging from adsorption studies. *Cellulose*, 30(15), 9221-9239.

Pozostałe publikacje

Szymańska-Chargot, M., Pękała, P., Siemińska-Kuczer, A., & Zdunek, A. (2024). A determination of the composition and structure of the polysaccharides fractions isolated from apple cell wall based on FT-IR and FT-Raman spectra supported by PCA analysis. *Food Hydrocolloids*, 150, 109688.

Szymańska-Chargot, M., Cieśla, J., Pękała, P., Pieczywek, P. M., Oleszek, W., Żyła, M., Zdunek, A. (2022). The Influence of High-Intensity Ultrasonication on Properties of Cellulose Produced from the Hop Stems, the Byproduct of the Hop Cones Production. *Molecules*, 27(9), 2624.

UDZIAŁ W KONFERENCJACH NAUKOWYCH

KONFERENCJE KRAJOWE

Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Kurzyna-Szklarek, M., Cybulska, J., Zdunek, A., 2024, Stopień O-acetylacji polisacharydów niecelulozowych podczas dojrzewania i pozbiornego przechowywania jabłek, „Cztery Żywioty – Współczesne Problemy W Naukach O Życiu”, 11.12.2024, Warszawa. Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 27

Pękala P., Szymańska-Chargot M., Zdunek A., 2023, Badania spektroskopowe polisacharydów niecelulozowych ściany komórkowej jabłek. VI Konferencja Doktorantów „Cztery Żywioty – Współczesne Problemy W Naukach O Życiu”, 14.12.2023, Lublin. Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 41

Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Kurzyna-Szklarek, M., Cybulska, J., Zdunek, A., 2023, Zmiany stopnia O-acetylacji polisacharydów niecelulozowych podczas rozwoju i dojrzewania jabłek, „Warsztaty dla Młodych Badaczy”, 30.11-01.12.2023, Lublin. Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 14

Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A., 2022, Badania adsorpcji wybranych hemiceluloz i pektyn na celulozie mikrofibrylarnej, „Warsztaty dla Młodych Badaczy”, 28-29.11.2022, Lublin. Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 22

Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Myśliwiec, D., Zdunek, A., 2021, Badania adsorpcji polisacharydów niecelulozowych na celulozie mikrofibrylarnej, jako przykład oddziaływań międzyfazowych występujących w roślinnej ścianie komórkowej, „Cztery Żywioty – Współczesne Problemy W Naukach O Życiu”, 14.12.2021, Lublin. Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 26

KONFERENCJE MIĘDZYNARODOWE

Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A., 2025, Adsorption studies of acetylated hemicelluloses on microfibrillar cellulose. BioPhys Spring 2025, 29-30.05.2025, Praga, Czechy. Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 136

Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Kurzyna-Szklarek, M., Cybulska, J., Zdunek, A., 2024, Degree of acetylation of plant cell wall polysaccharides during apple ripening and storage, 23rd International Workshop for Young Scientists „BioPhys Spring 2024”, 23rd-24th May 2024, Lublin, Poland. Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 117

Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A., 2023, Spectroscopic studies of cell wall polysaccharides of apple at different stages of development. 22nd International Workshop for Young Scientists "BioPhys Spring 2023", 15-16.06.2023, Gödöllő, Hungary. Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 56

Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A., 2023, Structure of cell wall polysaccharides in relation to apple development. XVI Plant Cell Wall Meeting, 18-22.06.2023, Malaga, Spain. Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 220

Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A., 2023, Spectroscopic studies of the structure and distribution of apple cell wall polysaccharides at different developmental stages. 14th International Conference on Agrophysics, 11-13 September 2023, Lublin, Poland. Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 39

Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Myśliwiec, D., Zdunek, A., 2022, Model studies of adsorption of non-cellulosic polysaccharides on microfibrillar cellulose, IPSC 2022 - INTERNATIONAL PLANT SPECTROSCOPY CONFERENCE, 12 - 15TH SEPTEMBER 2022, Nantes, France. Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 95

Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Myśliwiec, D., Zdunek, A., 2022, Adsorption in investigation of cellulose interaction with other polysaccharides, 21th International Workshop for Young Scientists „BioPhys Spring 2022”, 30th – 31st May 2022, Nitra, Slovakia. Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 83

Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Cieśla, J., Zdunek, A., 2021, Interactions between non-cellulosic polysaccharides and microfibrillar cellulose in the plant cell wall, ICA 2021- 13th International Conference on Agrophysics: Agriculture in changing climate 15-16 November 2021, Lublin, Poland. Abstrakt został opublikowany w materiałach konferencyjnych na str. 168

POPULARYZACJA NAUKI

Cieśla, J., Szymańska-Chargot, M., Pękala, P., Krysa, M., Piotrowicz, R., Zdunek, A., Inteligentne opakowania z ogrodu, XVIII Lubelski Festiwal Nauki, 10-16 września 2022 r., Lublin

Szymańska-Chargot, M., Cieśla, J., Krysa, M., Pękala, P., Siemińska-Kuczer, A., Kolorowe czary-mary, XVII Lubelski Festiwal Nauki, 18-24 września 2021 r., Lublin

Cieśla, J., Szymańska-Chargot, M., Siemińska-Kuczer, A., Pękala, P., Krysa, M., Rudnik, B. , Wybrane właściwości optyczne roztworów, koloidów i zawiesin, XVII Lubelski Festiwal Nauki, 18-24 września 2021 r., Lublin

WYRÓŻNIENIA

Wyróżnienie Komitetu Naukowego VII Konferencja Doktorantów „Cztery Żywioty – Współczesne Problemy W Naukach O Życiu”, Warszawa 2024 r. za wystąpienie: Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Kurzyna-Szklarek, M., Cybulska, J., Zdunek, A. „Stopień O-acetylacji polisacharydów niecelulozowych podczas dojrzewania i pozbiornego przechowywania jabłek”.

Wyróżnienie Komitetu Naukowego VI Konferencja Doktorantów „Cztery Żywioty – Współczesne Problemy W Naukach O Życiu”, Lublin 2023 r. za wystąpienie: Pękala, P., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A., „Badania spektroskopowe polisacharydów niecelulozowych ściany komórkowej jabłek”.

WYKAZ REALIZOWANYCH PROJEKTÓW BADAWCZYCH FINANSOWANYCH ZE ŹRÓDEŁ ZEWNĘTRZNYCH

2019-2023	Wykonawca w projekcie pt. Badania in vitro oddziaływań polisacharydów w celu zrewidowania istniejących modeli budowy roślinnej ściany komórkowej, 2018/29/B/NZ9/00141, OPUS 15, finansowany przez NCN
2021-2025	Stypendysta w projekcie pt. Zmiany stopnia acetylacji niecelulozowych polisacharydów podczas rozwoju i dojrzewania owoców i ich wpływ na właściwości mechaniczne i mikrostrukturę tkanki roślinnej, 2020/39/O/NZ9/00241, PRELUDIUM BIS 2, finansowany przez NCN