

Prof. dr hab. Małgorzata Nogala-Kałużka
Katedra Biochemii i Analizy Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani **mgr Karoliny Hasiewicz-Derkacz**

pt. " **Wzrost stabilności oleju lnianego przez zwiększenie puli antyoksydantów**".

wykonanej pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Jana Szopy-Skórkowskiego
oraz promotora pomocniczego Pani dr hab. Anny Kulmy
w Zakładzie Biochemii Genetycznej, Wydziału Biotechnologii
Uniwersytetu Wrocławskiego.

1. Znaczenie podjętych badań

Od wielu lat jednym z ważniejszych trendów badawczych jest poszukiwanie możliwości zwiększenia zawartości składników bioaktywnych w surowcach roślinnych, szczególnie tych zaliczanych do egzogennych dla ludzi i zwierząt.

Badania związków tłuszczowych dotyczą reaktywnych substancji tworzących się w trakcie szybko zachodzących przemian oksydacyjnych. Dynamika procesów utleniania lipidów jest złożona i zależy od wielu czynników fizycznych i chemicznych. Na przemiany triacylogliceroli związanych z utlenianiem ma wpływ ich struktura chemiczna - ilość wiązań podwójnych w cząsteczce kwasów polienowych, a także obecność w matrycy biologicznej substancji pozwalających na opóźnianie lub hamowanie procesu utleniania. Przeciwutleniacze w zależności od charakteru i właściwości mogą być inhibitorami procesów utleniania w fazie wodnej i tłuszczowej. W prowadzonych badaniach zwraca się uwagę zarówno na przeciwutleniacze hydrofilowe jak i lipofilowe, a oddziaływanie praktycznie związane jest nie tylko z przedłużaniem trwałości np. surowców i żywności ale również z wykorzystaniem ich właściwości w profilaktyce i/lub leczeniu np. chorób cywilizacyjnych związanych ze stresem oksydacyjnym.

Stosowane w laboratoriach techniki instrumentalne wykorzystujące najnowsze rozwiązania aparaturowe umożliwiają dokładne oznaczania jakościowe i ilościowe związków chemicznych, a także coraz częściej pozwalają na identyfikację tych jeszcze nierozpoznanych. Zachowanie homeostazy przeciw- i proutleniającej jest ważnym czynnikiem prawidłowego działania każdego organizmu żywego. W roślinach oleistych i ich nasionach występują cenne substancje bioaktywne - związki niskocząsteczkowe wpływające na przebieg procesów utleniania. Do nich zaliczamy hydrofilowe polifenole oraz hydrofobowe tokochromanole, karotenoidy i sterole występujące we frakcji nieglicerolowej.

Biorąc pod uwagę właściwości przeciwutleniające tych związków i ich oddziaływanie biologiczne, w szczególności związków fenolowych oraz substancji witamino-E aktywnych, karotenoidów i steroli podjęty temat pracy wraz z zakrojonymi na szeroką skalę badaniami eksperymentalnymi uważam za bardzo ważny, o dużym potencjale naukowym i poznawczym. Temat rozprawy jest zbieżny z projektem „Grant Plus” [POKL8.2.2], którego Doktorantka była wykonawcą.

1. Ocena pracy

Recenzowana dysertacja jest opracowaniem bardzo obszernym obejmującym 188 stron. Spis treści na początku zawiera spis rysunków (26), tabel (10) i wykresów (49), a następnie wykaz używanych skrótów. Streszczenia w języku polskim i angielskim otwierające część tekstową są wartościowym elementem informującym o tematyce i wynikach badań. Rozprawa podzielona jest na siedem głównych rozdziałów. Układ edytorski jest charakterystyczny dla doktoratu opartego na części eksperymentalnej, w którym kolejno przedstawiono: Wstęp z opracowaniem teoretycznym dotyczącym zagadnień związanych z realizowanymi badaniami, postawiony Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie oraz Spis literatury. Na ostatnich czterech stronach manuskryptu zostało umieszczone CV Doktorantki i Jej dorobek naukowy.

W rozprawie wykorzystano łącznie 298 pozycji literaturowych, przy czym w spisie zostało ujętych tylko 286 (brak 12 pozycji). Z ostatniego dziesięciolecia są cytowane 163 publikacje. Obszerne studia literaturowe, które Autorka przedstawiła w opracowaniu teoretycznym, wykorzystane metodyki w części doświadczalnej oraz odniesienia do wybranych pozycji w Wynikach i Dyskusji mówią o znakomitym rozeznaniu tematycznym i umiejętnościach mgr Karoliny Hasiewicz-Derkacz w

korzystaniu z różnego rodzaju źródeł najnowszej literatury naukowej, a zdobyta wiedza w pracy nad dysertacją może być również wysoce przydatna w dalszej pracy badawczej.

Doktorantka we **Wstępie** obejmującym 26 stron zawiera wprowadzenie do zagadnień związanych z tematyką rozprawy. Opisała i scharakteryzowała len jako materiał wybrany do badań, następnie szczegółowo skupiła się na przedstawieniu substancji o właściwościach przeciwutleniających – hydrofobowych i hydrofilowych, których obecność w nasionach lnu jest ważna w wielu aspektach. Rozdziały te poświęcone antyoksydantom przedstawiają szlaki ich syntezy, budowę i właściwości. W pierwszej kolejności zostały omówione tokochromanole, sterole, karotenoidy, a następnie w podobny sposób grupa związków fenolowych. Autorka w przeglądzie literatury zwróciła również uwagę na patogeny lnu, które w znaczący sposób wpływają na obniżenie jakości włókna i nasion - surowców uzyskiwanych w wyniku jego hodowli, a także plonowania roślin. Rozważania literaturowe zamykają dwa rozdziały, w których Autorka przedstawiła prace związane z polepszaniem właściwości nasion lnu poprzez różnego rodzaju modyfikacje z wykorzystaniem narzędzi inżynierii genetycznej, nad którymi pracował zespół naukowy w rodzimym Zakładzie Biochemii Genetycznej pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Jana Szopy-Skórkowskiego. Biotechnologiczne prace nad modyfikacją lnu i innych roślin oleistych w niezbędne dla naszego organizmu biokomponenty o szerokim spektrum prozdrowotnego działania to kierunki prowadzonych i przyszłościowych badań w wielu pracowniach naukowych w Polsce i na świecie. Przedstawione przez Doktorantkę opracowanie literaturowe oceniam bardzo wysoko.

Za główny **Cel** badań w dysertacji Autorka postawiła sobie przeprowadzenie modyfikacji lnu na drodze inżynierii genetycznej, w taki sposób by uzyskane nasiona były zasobne w związki o właściwościach przeciwutleniających. Cel realizowano poprzez zadania szczegółowe, w których m.in. identyfikowano związki lipofilne i hydrofilne w oleju lnianym; wyznaczano korelację pomiędzy stężeniem tych substancji i podatnością na utlenianie oleju; badano stabilność oleju uzyskanego z nasion z większą zawartością przeciwutleniaczy hydrofilowych i hydrofobowych. Dodatkowym aspektem badań była ocena plonowania roślin GM i ich podatności na najczęściej występujące choroby grzybowe.

Postawiony **Cel pracy** jest ambitny i trudny, a zaplanowane przez Doktorantkę badania bardzo szerokie, kompleksowe, z zastosowaniem najnowszych, nowoczesnych metod biologii molekularnej i analityki instrumentalnej.

Część doświadczalną pt. **Materiały i metody** opisano na 25 stronach. Autorka szczegółowo wymieniła stosowane materiały i odczynniki, użyte media i szczepy oraz wektory plazmidowe. Na końcu przedstawiła odmiany i typy roślin wykorzystane w doświadczeniach. Część opisująca badania to: zbiór wszystkich metod użytych do przeprowadzenia transformacji genetycznych, analityka związana z przygotowaniem prób i uzyskaniem ekstraktów oraz metody dotyczące oznaczania składu chemicznego i stabilności oksydacyjnej uzyskanych związków frakcji hydrofilowej i hydrofobowej. Tę część zamykają dwie metody mikrobiologiczne dotyczące określenia odporności roślin lnu na infekcje grzybowe z rodzaju *Fusarium*. W realizacji badań Autorka wykorzystwała również oprócz narzędzi genetycznych, wiele technik i metod pomiarowych m. in. chromatografię gazową połączoną ze spektrometrią masową (GC-FID-MS), ultrasprawną chromatografię cieczową (UPLC-PDA-MS), testy do określenia aktywności przeciwutleniającej (DPPH*, FRAP) i różnicową kalorymetrię skaningową (DSC).

Większość przedstawionych opisów jest wystarczająco dokładna choć nie zawsze podawano np. naważki próbek, które potem dalej analizowano, a także korzystniej byłoby podać:

- Jaką masę nasion lnu poddano tłoczeniu i jak długo próby uzyskanego oleju były przechowywane do czasu analiz (podana temp. 4°C, to temperatura chłodnicza, w której zachodzą procesy utleniania, ale znacznie wolniej).
- Z punktu widzenia technologii tłuszczów - olejów roślinnych ważna jest pełna charakterystyka składu chemicznego uzyskanych nasion lnu jak również prób, które w tych doświadczeniach były traktowane jako odniesienia – głównie powinna być oznaczona zawartość i skład chemiczny frakcji tłuszczowej w nasionach.
- Czytelność części doświadczalnej byłaby jeszcze lepsza, gdyby zamieszczono schemat pokazujący kolejność przeprowadzonych po sobie działań badawczych i toku analitycznego na każdym z etapów pracy.

Podsumowując tę część rozprawy doktorskiej uważam, że Doktorantka przy jej realizacji zaprezentowała doskonałe przygotowanie zarówno od strony teoretycznej

jak i umiejętności analitycznych. Do wykonania zamierzonych badań zostały wybrane najnowocześniejsze metody, wykorzystano bogaty zestaw aparatury pozwalający na oznaczenia i identyfikację związków występujących w minimalnych ilościach, co pozwoliło na osiągnięcie zamierzonych efektów wyartykułowanych w celu pracy. Należy tu podkreślić biegłość analityczną Doktorantki i znakomitą organizację pracy w realizacji tak wielu różnych i odmiennych zadań badawczych.

Wyniki uzyskane w pracy to kolejny rozdział zajmujący 77 stron. Jest on zilustrowany 19 rysunkami, 49 wykresami, a dane liczbowe zestawiono w 10 tabelach. Rezultaty uzyskane przez Doktorantkę są obszernie omówione. Ten rozdział można podzielić na cztery części zgodnie z planem postawionym w celu pracy.

Do najważniejszych osiągnięć związanych z realizacją badań przez mgr Karolinę Hasiewicz-Derkacz należy zaliczyć:

- Określenie, które z natywnie występujących substancji o charakterze przeciwutleniającym mają znaczący wpływ na stabilność oleju lnianego o różnym stopniu nienasylenia kwasów tłuszczowych.
- Wykorzystanie genów syntezy flawonoidów do transformacji skutkującej zwiększeniem fenylopropanoidów w liniach transgenicznym Inu oraz identyfikacja jakościowa i ilościowa związków fenolowych w uzyskanych liniach transgenicznym, dotąd nie zidentyfikowanych (analizowano również części zielone rośliny Inu i słomę).
- Wykorzystanie konstruktów genetycznych zawierającego gen syntezy tokoferoli i wykazanie wzrostu ekspresji wprowadzonego kluczowego genu -VTE-2 oraz badania nad stabilnością oleju uzyskanego z wybranych linii transgenicznym Inu.

Do uzyskanych efektów w pracy należy dołączyć eksperymenty, które wykonała Doktorantka znacznie poszerzając plan badań, a związane były m.in. ze stresem biotycznym modyfikowanych genetycznie linii Inu oraz morfologią i wegetacją roślin.

Przeprowadzone badania dotyczące właściwości przeciwutleniających w próbach oleju uzyskanego z nasion modyfikowanych transgenicznie roślin oparto o metody pozwalające na pomiary zdolności antyoksydacyjnej wykorzystujące mechanizm typu SET (DPPH* i FRAP), parametry termodynamiczne związane z kinetyką utleniania olejów - kalorymetrię skaningową (DSC) oraz oznaczenie dialdehydu malonowego jako produktu wtórnego powstającego w czasie procesu autooksydacji

tłuszczu. Dobierając odpowiedni test z uwagi na różnorodny mechanizm działania tych związków i w zależności od środowiska, w którym natywnie występują jesteśmy w stanie przebadać i określić ich właściwości przeciwutleniające.

Wybrane metody jednak przy bardzo małej ilości uzyskanego oleju z nasion modyfikowanego lnu, mogą w pełni nie oddawać przebiegu mechanizmu zachodzącego procesu utleniania układów, które badała Doktorantka. Badania technologiczne dotyczące tłuszczów wykonuje się w próbkach o znacznie większej masie, grubszej warstwie, dostępie światła i zmiennej temperaturze. Czynniki fizyczne mają bardzo istotny wpływ na przebieg reakcji w procesie utleniania. Dotyczy to m.in. metody, w której utleniano próby w temp. 140°C oraz oznaczania TBARS. Trudno na podstawie tych wyników jednoznacznie prognozować stabilność olejów w temp. pokojowej. Stąd pytanie do Doktorantki, o które z metod dotyczące trwałości frakcji tłuszczowej powinny być w przyszłości rozszerzone badania dotyczące oleju z modyfikowanych nasion lnu.

W **Dyskusji** obejmującej 23 strony Doktorantka dokładnie analizuje rezultaty uzyskane w swoich badaniach. Umiejętnie odnosi je i porównuje do najnowszych danych z literatury światowej oraz wcześniejszych rezultatów zespołu naukowego, w którym realizowała swoje badania. Tu na podkreślenie zasługują Jej naukowe kompetencje i doskonały, wysoki poziom przeprowadzonych badań. Całość zostaje zamknięta **Podsumowaniem** efektów uzyskanych w badaniach biochemicznych, genetycznych i chemicznych.

Oceniając poszczególne etapy przeprowadzonych badań w pracy doktorskiej mogę stwierdzić, że założony plan został przez Doktorantkę w pełni zrealizowany. Trudno mi się odnieść w pełni do przeprowadzonych modyfikacji genetycznych ponieważ nie leżą one w kręgu moich bezpośrednich zainteresowań naukowych i realizowanych prac badawczych. Jednak wykazane pozytywne rezultaty tych zabiegów potwierdzone uzyskaniem zwiększonej biosyntezy w roślinach lnu przeciwutleniaczy lipofilnych i hydrofilnych są najlepszym dowodem na to, że Doktorantka wybrała właściwą drogę do zrealizowania założonych celów badawczych.

Wprowadzenie transformacji genetycznych w roślinach lnu i oznaczenie substancji o właściwościach przeciwutleniających łącznie z ich identyfikacją, szczególnie w obszarze związków fenolowych, ma duże znaczenie poznawcze.

Oddziaływanie substancji hydrofilowych i hydrofobowych w matrycy biologicznej rośliny a następnie w uzyskanej frakcji tłuszczowej ciągle nie jest jednoznacznie zdefiniowane. Nie możemy jednak przewidzieć jak zwiększona zawartość tych związków może wpłynąć na zmiany ilościowe innych ważnych substancji bioaktywnych (np. kwasów tłuszczowych polienowych) co również stwierdzono w tej pracy. Oddziaływanie obu rodzajów przeciwutleniaczy w układach biologicznych może być synergistyczne lub antagonistyczne, mogą one wchodzić również w interakcje z innymi substancjami występującymi w matrycy biologicznej. Dla uzyskania pełnych danych dotyczących stabilności oleju lnianego z nasion genetycznie modyfikowanych powinny być przeprowadzone badania w szerszym spektrum metod np. HET i analizujących paradoks polarności substancji przeciwutleniających.

Dyskusyjne są stwierdzenia w trzeciej części **Podsumowania**, że rośliny lnu GM charakteryzują się podwyższonym potencjałem przeciwutleniającym, jest to duży skrót myślowy, a cały ten akapit powinien być inaczej sformułowany. Możliwość zwiększonej biosyntezy związków hydrofilnych i lipofilnych o właściwościach antyoksydacyjnych może w efekcie wpływać na kształtowanie większej odporności na stres biotyczny i abiotyczny roślin lub związki te obecne w nasionach lnu wpływają na zmiany dynamiki reakcji rodnikowych, zakładając ich pozytywne działanie tylko w pewnych granicach stężeń. Przeprowadzone badania są bardzo ważne, są istotnym rozpoznaniem i potwierdzeniem mówiącym o możliwościach przyszłościowych modyfikacji transgenicznych lnu pozwalających na zwiększoną syntezę biokomponentów o właściwościach przeciwutleniających. Stąd kontynuacja rozpoczętych badań w szerszym aspekcie, które Autorka sugeruje w **Dyskusji** wydaje się być konieczna.

Oceniana dysertacja została zredagowana bardzo starannie pod względem edytorskim. Zamieszczone liczne rysunki i wykresy dobrze ilustrują uzyskane dane, a tabele i wykresy w części wynikowej pozwalają na ich właściwą interpretację. Jednak Autorka przy tak obszernym opracowaniu nie uchroniła się od kilku błędów. Znaleziono usterki w pracy dotyczą stylistyki, gramatyki i brakujących liter, a także stosowania fachowego słownictwa, które czasami niefortunnie zastępowano niewłaściwymi nazwami, określeniami i sformułowaniami.

Dotyczy to m. in. "izoformy" - tokochromanole to homologi, różniące się ilością podstawionych grup CH₃, stąd greckie litery dla kolejnych homologów α-T, β-T itd., wielokrotnie powinna być użyta l. mnoga, bo występują zawsze razem,

- kwasy wielonienasycone to kwasy polienowe, pojęcie standard jest zawsze jednoznaczne i nie używamy przymiotnika „autentyczny”(str.106,109), „czysty” (str. 74,139),

- praktycznie nie stosuje się spolszczenia - antyoksydanty wodorozpuszczalne i lipidorozpuszczalne, związki hydrofilne, lipofilne, hydrofobowe itd., to najczęściej używane określenia w chemii i technologii tłuszczów (zresztą Doktorantka również je stosuje w pracy),

- w tekście zabrakło symbolu rodnika przy DPPH*, który jest względnie trwałym rodnikiem 1.1-difenylopi krylohydrazylu, a glin to aluminium (str. 43),

- olej był tłoczony przy pomocy prasy śrubowej z nasion lnu, jak opisano w części metodycznej, a nie „wyciskany” (str. 81, 161). Rozdział 4.1.5. jako taki wydaje się być zbędny i powinien być połączony z rozdziałem 3.7.23. Inaczej powinno brzmieć zdanie „Oleje zaczynały utlenianie...”(str. 83),

- podczas przeprowadzonych analiz związki chemiczne były identyfikowane, wykrywane, oznaczane, a nie „odnajdowane” (np. str. 104, 150),

- związki ulegają konwersji, transformacji lub przechodzą w formę itd., ale nie „przemieniają się” (str. 36, 161),

- co Autorka miała na myśli pisząc o testach podwyższonego utleniania?

- skróty w opisie wyników prezentowanych na wykresach FW/DW powinny być polskie a więc świeża lub sucha masa (ś.m./s.m.),

- w tytułach rozdziałów, w spisie **Literatury** i tytułach zamieszczonych publikacji nazwy łacińskie powinny być pisane kursywą.

Pozostałe znalezione niedoskonałości zaznaczono w ocenianym manuskrypcie m.in. na str. 22, 27, 32, 36, 47, 48, 71,73, 74, 78, 83, 92,101,142, 147, 150, 153.

Wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Hasiewicz-Derkacz, mimo przedstawionych uwag oceniam bardzo wysoko. Autorka szeroko i wyczerpująco potraktowała rozdział **Dyskusja**, a całość dysertacji jest wzajemnie powiązana z zachowaniem odpowiednich proporcji. Doktorantka w swoje badania włożyła ogrom pracy, wykazała się inwencją naukową i biegłością analityczną. Do realizacji zaplanowała szerokie i wielokierunkowe badania, a ich wyniki umiejętnie zintegrowała i skomentowała. W osiągnięciu celu pracy Autorka połączyła badania z wielu dziedzin - genetyki, hodowli, technologii, a w przyszłości uzyskane rezultaty będą mogły być efektywnie wykorzystane w dietetyce, farmacji i medycynie.

2. Wniosek końcowy

Reasumując moje spostrzeżenia, wyrażam opinię, że rozprawa doktorska Pani mgr **Karoliny Hasiewicz-Derkacz**

pt." **Wzrost stabilności oleju lnianego przez zwiększenie puli antyoksydantów**" spełnia wymogi stawiane dysertacjom (Art. 13. Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i późniejszymi zmianami Dz. U. 2014. 1852) i przedkładam wniosek Radzie Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszego etapu przewodu doktorskiego.

Margareta Nagda-Kokola

Poznań 25. września 2017r.