

Prof. Tadeusz Rorat
Instytut Genetyki Roślin PAN
Strzeszyńska 34,
60-479 Poznań

Poznań, 11.10. 2017 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Hasiewicz-Derkacz, pt: **"Wzrost stabilności oleju lnianego przez zwiększenie puli antyoksydantów"**

Badania przeprowadzone przez Panią mgr Karolinę Hasiewicz-Derkacz w ramach pracy doktorskiej dotyczyły poznania biochemicznej podstawy stabilności oleju lnianego, a następnie, uzyskane wyniki stały się punktem wyjściowym dla otrzymania roślin o zwiększonej stabilności oleju lnianego na utlenianie poprzez wytworzenie transgenicznych genotypów lnu o zmodyfikowanym poziomie ekspresji genów, których białkowe produkty są związane z mechanizmami antyoksydacyjnymi. Badania Autorki wpisują się w problematykę badawczą Zakładu Biochemii Genetycznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego nad ulepszeniem jakości plonu lnu oleistego poprzez poprawę jakości jego włókna oraz stabilności oleju.

Olej z nasion lnu, w przeciwieństwie do oleju pozyskiwanego z innych gatunków roślin gromadzących olej w nasionach zawiera nienasycone kwasy tłuszczowe, takie jak linolowy ω -6 i α -linolenowy ω -3, zaliczane do rodziny Wielonienasyconych Niezbędnych Kwasów Tłuszczowych (WNKT), ponieważ nie są one syntetyzowane w organizmie ludzkim, i muszą być dostarczane wraz z pożywieniem. Kwas α -linolenowy (ALA) jest substratem do syntezy kwasów eikozapentaenowego (EPA) i dokozaheksaenowego (DHA), a linolowy ω -6 (LA) do syntezy kwasu arachidonowego (AA). Kwasy ω -3 mają fundamentalne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania całego organizmu. Stanowią bowiem strukturalną i funkcjonalną komponentę błon komórkowych organizmu ludzkiego powiązaną z regulacją wielu procesów życiowych, takich jak funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego, ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, przewodu pokarmowego, układu oddechowego oraz nerek i narządów rozrodczych. Niedobory skutkują upośledzeniem wielu czynności organów wewnętrznych, zwiększoną podatnością na infekcje, oraz chorobami skórnymi. Wielokrotnie wyższy stosunek kwasu α -linolenowego (ALA) do linolowego (LA) w oleju lnianym sprawia, że spożywanie oleju lnianego przekłada się na obniżenie niekorzystnego dla zdrowia wysokiego stosunku LA do ALA, co skutkuje uruchomieniem mechanizmów przeciwzapalnych.

Problem w tym, że wielonienasycone kwasy ω -3 są związkami bardzo nietrwałymi, i w obecności światła i wysokiej temperatury powstają bardzo szkodliwe rodniki nienasyconych kwasów tłuszczowych, a także inne pochodne, takie jak sprzężone dieny LA i trieny ALA, które prowadzą do zmiany właściwości strukturalnych i funkcjonalnych błon biologicznych, i zaburzeń funkcji komórek. Dlatego też, jednym z celów pracy doktorskiej Pani mgr Karoliny Hasiewicz-Derkacz było poznanie komponentów oleju lnianego, które byłyby odpowiedzialne za przeciwdziałanie oksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz stabilizację oleju.

Nasiona lnu są nie tylko cennym źródłem białka i wielonasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT), ale także różnego rodzaju antyoksydantów, które należą do szlaku fenylopropanoidowego i terpenoidowego, i mogą pełnić zarówno funkcje ochronne dla nienasyconych kwasów ω -6 i ω -3 przed utlenieniem, jak również funkcje prozdrowotne dla organizmu.

Już na wstępie badań, porównując odmiany lnu o zróżnicowanej zawartości kwasu α -linolenowego Autorka wykazała, że podatność oleju na utlenianie w wysokiej temperaturze, mierzona poziomem powstającego dialdehydu malonowego (MDA) jest dodatnio skorelowana z zawartością kwasu α -linolenowego w oleju nasion. Tę zależność Autorka dalej potwierdziła badając podatność na utlenianie oleju pochodzącego z odmiany Linola o niskiej zawartości kwasu α -linolenowego, który po uzupełnieniu wzrastającymi stężeniami egzogenego kwasu α -linolenowego, wykazywał wzrost zawartości MDA. Z drugiej strony, gdy Autorka porównała podatność oleju na oksydację u dwóch linii lnu o wysokiej zawartości kwasu α -linolenowego, ale różniących się zawartością ogólnej puli związków fenylopropanoidowych, olej linii W86 o wyższej zawartości fenylopropanoidów był mniej podatny na utlenianie. Dane te wyraźnie wskazywały, że w ochronie nienasyconych kwasów tłuszczowych przed utlenianiem biorą udział fenylopropanoidy. Dla zweryfikowania postawionej hipotezy, Autorka wykorzystwała odmianę Linola oraz wyprowadzone z niej linie transgeniczne, W92 niosącą geny *CHS/CHI/DFR* należące do szlaku flawonoidowego z *Petunia hybryda*, charakteryzującą się wyższą zawartością ogólnej puli związków fenylopropanoidowych w łodydze, linię W86 niosącą supresję genu *CHS* o wyższej zawartości związków fenolowych i tanin hydrolizowalnych w łodydze oraz linię GT nadeksprymującą gen *GT* (kumulująca glikozyłowe pochodne kwasów fenolowych). W wytłoczonym oleju z nasion w/w genotypów Autorka prześledziła zawartość związków fenylopropanoidowych i terpenoidowych, a następnie przeanalizowała zawartość nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych (ω -9, ω -6, ω -3), właściwości antyoksydacyjne olejów, ich podatność na utlenianie w wysokich temperaturach oraz stabilność oleju podczas przechowywania. Do przeprowadzenia badań Autorka zastosowała zestaw odpowiednio dobranych metod. Do analizy związków fenylopropanoidowych oraz terpenoidowych, Autorka zastosowała odpowiednio dopracowane metody ich ekstrakcji z oleju, a następnie rozdziła za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej z detektorem diodowym PDA (UPLC-PDA), dla wodo-rozpuszczalnych związków fenylopropanoidowych lub gazowej z detektorem jonizacji FID (GC-FID) dla lipo-rozpuszczalnych związków terpenoidowych. Identyfikację rozdzielonych związków fenylopropanoidowych lub terpenoidowych przeprowadziła w wyniku połączenia technik chromatograficznych z detektorem mas, tj. UPLC-PDA-MS lub GC-FID-MAS. Właściwości antyoksydacyjne olejów określiła za pomocą metody TBARS (Thiobarbituric Acid-Reactive Substances), wykrywającej dialdehyd malonowy (MDH), a stabilność oleju za pomocą różnicującej kalorymetrii skaningowej (DSC). Należy szczególnie podkreślić, że zarówno wodo-rozpuszczalne fenylopropanoidy, jak i lipo-rozpuszczalne związki terpenoidowe nie były dotychczas analizowane w oleju lnianym.

Jak Autorka wykazała, oleje pochodzące z linii W92 i W86 posiadały znacznie wyższe właściwości antyoksydacyjne oraz utleniały się znacznie później niż olej pochodzący z odmiany wyjściowej Linola. Analiza zawartości związków fenylopropanoidowych w nierafinowanym oleju wytłoczonym z analizowanych genotypów lnu wykazała statystycznie wyższą zawartość fenolokwasów, ferulowego, kumarowego, chlorogenowego i kawowego, aldehydów koniferylowego i syringowego oraz znaczne ilości waniliny u linii transgenicznym W86 i W92 niż u odmiany wyjściowej Linola. Co ciekawe, najwyższy poziom zidentyfikowanych fenylopropanoidów Autorka wykazała u wysoko-linolenowej linii W86. Z kolei, wśród lipidorozpuszczalnych terpenoidów Autorka zidentyfikowała w oleju głównie luteinę, plastochromanol-8 i γ -tokoferol. Ich zawartość była także najwyższa u wysoko linolenowej linii W86. Po suplementacji olei egzogennie podanymi zidentyfikowanymi kwasami fenolowymi, Autorka ustaliła, że kwas kawowy oraz ferulowy, a wśród terpenoidów γ -tokoferol najefektywniej chronią olej przed oksydacją. W przypadku waniliny, poziom hamowania utleniania oleju był znacznie niższy, a z kolei luteina wykazywała bardziej właściwości prooksydacyjne dla oleju niż stabilizujące. W ten sposób, Autorka uzyskała bezpośredni dowód, że stabilność oleju lnianego na utlenianie jest zależna od zawartości obecnych w nim określonych kwasów fenolowych i γ -tokoferolu, a także uzyskała dowód, że ich poziom w oleju można zwiększyć metodami inżynierii genetycznej.

Na tej podstawie, Autorka mogła przyjąć założenie, że zwiększając zawartość związków fenylopropanoidowych w wyniku manipulacji genetycznej u odmiany lnu o wysokiej zawartości kwasu α -linolenowego, pozwoliłoby na zwiększenie właściwości antyoksydacyjnych oleju, a dalej jego stabilności podczas przechowywania, a tym samym na otrzymanie cennego źródła egzogennych kwasów tłuszczowych ω -3 w diecie, tak bardzo potrzebnych dla utrzymania dobrego stanu zdrowia. Dlatego też, dalszym celem badań Pani mgr Karoliny Hasiewicz-Derkacz było uzyskanie wysokolinolenowego lnu o stabilnym oleju w wyniku transformacji genetycznej. Do badań wybrała wysokolinolenową odmianę lnu Opal, którą transformowała, z jednej strony trójgenowym konstruktem złożonym z genów *CHS/CHI/DFR*, należących do szlaku flawonoidowego, wcześniej użytym do transformacji odmiany Linola, który przyczynił się do zwiększenia zawartości związków fenylopropanoidowych w oleju nasion. Otrzymane linie transgeniczne z konstruktem *CHS/CHI/DFR* Autorka nazwała umownie Fen. Ponadto, dla zwiększenia zawartości tokoferoli w oleju, Autorka przeprowadziła transformację odmiany Opal genem *HPT-1 (VTE-2)* kodującym fitylotransferazę homogentyzynianową, kluczowy enzym w szlaku biosyntezy tokoferoli, a otrzymane linie transgeniczne z tym konstruktem nazwała umownie Hom. Ponieważ obydwa typy transgenów, tj. trójgenowy *CHS/CHI/DFR* (Fen) i *VTE-2* (Hom) zostały wprowadzone do lnu pod promotorem wirusa *CaMV 35S*, który zapewnia konstytutywną regulację ekspresji transgenów we wszystkich tkankach rośliny, Autorka mogła spodziewać się zwiększonego poziomu fenylopropanoidów w grupie roślin transgenicznym Fen, a w grupie Hom antyoksydantów lipido-rozpuszczalnych należących do terpenoidów. Na wstępie, w otrzymanych roślinach *in vitro* typu Fen, Autorka prześledziła ogólną zawartość fenylopropanoidów, a u typu Hom związków terpenoidowych, i na tej podstawie, do dalszych badań wybrała po trzy formy Fen (10, 42 i 56) charakteryzujące się

najwyższą zawartością związków fenylopropanoidowych w tkankach zielonych oraz trzy formy Hom (41, 151 i 165) o najwyższej zawartości związków terpenoidowych.

W przypadku roślin Fen, dalsze badania Autorka przeprowadziła na roślinach uprawianych w szklarni oraz w polu. U roślin rosnących w szklarni Autorka zaobserwowała wyraźne zmiany fenotypowe dotyczące wysokości łodygi i koloru nasion. Rośliny typu Fen 10, 42 i 56 były znacznie (statystycznie) wyższe niż nietransgeniczna linia kontrolna Opal oraz posiadały jaśniejszą okrywę nasion. W słomie odmiany Opal oraz linii Fen Autorka zidentyfikowała różne związki fenolowe wolne oraz związane estrowo ze ścianą komórkową, przy czym, tylko w przypadku związków wolnych Autorka wykazała dla większości z nich statystyczny wzrost zawartości. Z kolei, w nasionach odmiany Opal i badanych linii Fen (uprawianych w szklarni), Autorka zidentyfikowała dziewięć związków fenylopropanoidowych, takich jak kwas ferulowy, kawowy i kumarowy, dwie pochodne (I i II) kwasu kawowego oraz glukozidy kwasów kumarowego, kawowego i ferulowego. Ponadto, wykryła obecność diglukozydu sekoizolaricirezinolu (SDG), który występował w największej ilości w nasionach. W przypadku kwasów fenolowych, zmiany statystycznie istotne występowały tylko w przypadku zawartości kwasu ferulowego, i tylko u linii 56, natomiast w przypadku glukozydów, których zawartość była znacznie wyższa niż ich kwasowych pochodnych, statystycznie istotne zmiany występowały w przypadku glukozydu kwasu kumarowego u linii 56, i kwasu ferulowego u linii 10 i 56. Także w przypadku pochodnych kwasu kawowego I i II statystyczne zmiany występowały u linii 10 i 42, natomiast zmiany w zawartości SDG u linii Fen były statystycznie nieistotne. Z kolei, w składzie kwasów tłuszczowych oznaczonych w nasionach za pomocą chromatografii gazowej wyposażonej w detektor jonizacji, Autorka wykazała zmiany u linii Fen w porównaniu do odmiany kontrolnej Opal w zawartości kwasu oleinowego, linolowego i linolenowego, zwłaszcza w zawartości kwasu linolenowego u linii 56, przy czym zmiany te nie były statystycznie istotne, i nie przekładały się na zmianę całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych. Także zmiany wśród dziewięciu zidentyfikowanych steroli nie były statystycznie istotne. Szkoda, że Autorka nie analizowała związków fenylopropanoidowych, ani zawartości kwasów tłuszczowych w oleju wytłoczonym z nasion pochodzących z roślin uprawianych w szklarni.

Przeprowadziła natomiast analizę zawartości kwasów tłuszczowych w oleju wytłoczonym z nasion odmiany Opal oraz linii Fen 10 i 42 uprawianych w polu. Co ciekawe, inaczej niż u roślin uprawianych w szklarni, w oleju linii 10 i 42 nastąpił statystycznie istotny wzrost zawartości kwasu α -linolenowego oraz nasyconego kwasu palmitynowego, a spadek zawartości kwasów linolowego i oleinowego w porównaniu do ich zawartości w oleju odmiany Opal. Porównując zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w 100 g oleju u odmiany Opal oraz linii Fen w nasionach roślin uprawianych w szklarni oraz w oleju roślin uprawianych w polu, widać, że u roślin uprawianych w szklarni jest ona przeciętnie dwa niższa niż u oleju roślin uprawianych w polu. Te dane, chociaż Autorka ich nie komentuje mogą wskazywać na udział tkanek okrywających w masie nasion na obniżenie zawartości kwasów tłuszczowych w nasionach, co może maskować różnice występujące w zawartości poszczególnych kwasów w oleju, lub też warunki uprawy roślin mają wpływ na zawartość kwasów tłuszczowych w oleju. Dalej, Autorka określiła podatność oleju roślin Fen na

utlenianie w temperaturze 140°C metodą TBARS, oznaczając zawartość MDA. Jak wykazała, ilość wytworzonego MDA była niższa u roślin transgenicznych niż u odmiany Opal, co wskazywałoby na jego wyższą odporność na utlenianie, jednak obserwowane zmiany nie były statystycznie istotne. Z drugiej strony, stabilność oleju pochodzącego z roślin Fen, określona metodą DSC, a wyrażona czasem potrzebnym do zapoczątkowania reakcji utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych w wyższych temperaturach była znacznie wyższa u linii Fen niż u kontroli Opal, a w przypadku linii 10 nawet dwukrotnie wyższa. Ten wynik jest pozytywnym efektem zrealizowania postawionego przez Autorkę celu badań, a mianowicie, uzyskania form lnu o wysokiej zawartości kwasu ω -3 wraz z wyższą stabilnością oleju na utlenianie. W przypadku linii 42 stabilność oleju została przedłużona z 22 aż do 99 dni.

Dalej Autorka wyprowadziła czyste linie homozygotyczne dla genotypów 10, 42 i 56 w dalszych pokoleniach wsobnych, a w pokoleniu T2 określiła zawartość związków fenylopropanoidowych w słomie.

Z kolei, w przypadku roślin transgenicznych z nadekspresją genu *VTE-2* (Hom) Autorka przedstawiła jedynie wstępne wyniki analizy roślin uprawianych tylko w warunkach *in vitro*, w których wykazała zwiększoną zawartość wielu związków terpenoidowych, w tym α -tokoferolu, luteiny, neoksantyny, wiolaksantyny, β -karoteun i chlorofilu a i b. Ekstrakty metanolowe z roślin Hom 41, 151 i 165, po dodaniu do oleju podnosiły jego właściwości antyoksydacyjne.

W sumie, Pani mgr Karolina Hasiewicz-Derkacz wykonała gigantyczną pracę dla zrealizowania celu badań rozprawy doktorskiej. Ostatecznym wynikiem badań było uzyskanie transgenicznych form lnu charakteryzujących się zarówno wysoką zawartością kwasu α -linolenowego w oleju nasion, jak i jego zwiększoną stabilnością oleju na utlenianie. Dla zrealizowania badań Autorka musiała dokonać ogromnej liczby oznaczeń, najpierw zawartości i składu kwasów tłuszczowych, właściwości antyoksydacyjnych otrzymanych olei i ich podatności na utlenianie, następnie zawartości związków fenylopropanoidowych i terpenoidowych w różnych organach, tj. łodydze, nasionach, a także w oleju u dwóch odmian lnu Linola i Opal, a dalej w otrzymanych z nich liniach transgenicznych pochodzących z odmiany Linola: GT, W92 i W86 oraz u dwóch grup Fen i Hom pochodzących z odmiany Opal, tj. 10, 42 i 56 (Fen) oraz 42 151 i 156 (Hom). Należy też zaznaczyć, że Autorka musiała przygotować dwa typy roślin transgenicznych. Ponadto, analizy zostały przeprowadzone na roślinach uprawianych w szklarni oraz w polu. Zmiany w zawartości analizowanych związków Autorka analizowała statystycznie, co bardzo uwiarygadnia uzyskane wyniki oraz ich interpretację. Chciałbym zaznaczyć, że zastosowanie tak szerokiego zakresu technik do izolacji, rozdziału oraz identyfikacji związków fenylopropanoidowych i terpenoidowych oraz do izolacji i identyfikacji kwasów tłuszczowych, analizy podatności oleju na utlenianie, nie tylko budzą podziw czytelnika dla Autora, ale mogły zostać przeprowadzone tylko w znakomicie przygotowanym do tego typu badań zespole badawczym.

W opisie rozprawy doktorskiej Pani mgr Karolina Hasiewicz-Derkacz przedstawiła bardzo obszerny i wieloaspektowy Wstęp do badań, dokładny opis stosowanych metod badawczych, w tym sposobu uzyskania i weryfikacji roślin transgenicznych pod kątem

wprowadzonego transgenu, bardzo dobrze udokumentowane Wyniki badań oraz ciekawą Dyskusję wyników.

Biorąc pod uwagę rozległy zakres przeprowadzonych badań, wysoką jakość uzyskanych wyników, a także bardzo dobre ich udokumentowanie oraz wiedzę, której Pani mgr Karolina Hasiewicz-Derkacz nabyła podczas wykonywania niniejszej pracy, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że Pani mgr Karolina Hasiewicz-Derkacz spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego też, wnoszę wniosek do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Hasiewicz-Derkacz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

