

**Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

mgr Adam Kawiński

**Lipazy kiełkujących nasion roślin oleistych, ze
szczególnym uwzględnieniem nasion jojoba –
jedynej rośliny akumulującej woski**

**Lipases of germinating seeds of oilseed plants, in
particular seeds of jojoba – the only plant
accumulating wax esters**

Praca przedstawiona
Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie biotechnologia

Promotor: **prof. dr hab. Antoni Banaś**

Zakład Biochemii Roślin
GDAŃSK 2023

"Only those who care about you, can hear you when you are quiet"

Pragnę wyrazić moją wdzięczność mojemu promotorowi **prof. dr. hab. Antoniemu Banasiowi** za obdarzenie mnie ogromnym zaufaniem, za wsparcie oraz poświęcony mi czas i pomoc podczas pisania pracy.

Dziękuję serdecznie **dr Magdalenie Miklaszewskiej** za cenne wskazówki i pomoc w redagowaniu pracy.

Dziękuję **koleżankom i kolegom z Zakładu Biochemii Roślin** za stworzenie doskonałej atmosfery, w której powstawały wyniki do tej pracy.

Z serca dziękuję mojej **Ani**, za cierpliwość, zrozumienie, wsparcie oraz całe nasze Życie.

Dziękuję mojej rodzinie i garstce **Przyjaciół**, którzy we mnie nie zwątpili.

Pracę dedykuję mojemu Dziadkowi, którego największym marzeniem było, aby ona powstała.

Spis treści

Wykaz skrótów	5
Streszczenie	7
Summary.....	9
1 WSTĘP	11
1.1 Przemysłowe aspekty produkcji tłuszczów roślinnych	11
1.2 Rośliny oleiste	12
1.2.1 Jojoba	13
1.2.2 Crambe abyssinica.....	14
1.2.3 Camelina sativa	15
1.3 Nasiona	16
1.3.1 Powstawanie nasion	16
1.3.2 Budowa nasion	17
1.3.3 Materiały zapasowe nasion	19
1.3.4 Mobilizacja materiałów zapasowych nasion.....	32
2 WPROWADZENIE I CEL PRACY	39
3 MATERIAŁY I METODY	42
3.1 Stosowane odczynniki, bufony i roztwory.....	42
3.2 Zestaw do oznaczania stężenia białek	44
3.3 Zestaw do elektroforezy poliakrylamidowej oraz transferu białek	44
3.4 Zestaw do oznaczania specyficznych białek w żelu.....	45
3.5 Zestaw do oznaczania zawartości cukrów	45
3.6 Aparatura wykorzystywana w badaniach	45
3.7 Materiał roślinny	46
3.7.1 Jojoba	46
3.7.2 Katran abisyński	47
3.7.3 Lnianka.....	48
3.8 Ilościowe i jakościowe oznaczenie zawartości lipidów zapasowych badanych nasion	48
3.8.1 Ekstrakcja lipidów	48
3.8.2 Chromatografia cienkowarstwowa.....	49
3.8.3 Chromatografia gazowa	50
3.9 Określanie specyficzności substratowej lipaz frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion jojoba, lnianki i katranu	51
3.9.1 Izolacja frakcji mikrosomalnych.....	51
3.9.2 Ilościowe oznaczanie „zagęszczenia” wyizolowanych frakcji mikrosomalnych	52
3.9.3 Oznaczanie aktywności enzymów zawartych w frakcjach mikrosomalnych w warunkach in vitro	53
3.9.4 Przebieg reakcji in vitro określających aktywność i specyficzność badanych lipaz	56
3.9.5 Synteza wosków przeprowadzana przez enzymy zawarte we frakcjach mikrosomalnych z kiełkujących nasion badanych roślin oleistych.....	57

3.10	Oznaczanie zawartości białek rozpuszczalnych.....	57
3.10.1	Izolacja białek rozpuszczalnych z nasion jojoba.....	57
3.10.2	Ilościowa analiza wyizolowanych białek rozpuszczalnych	58
3.10.3	Analiza oleozyn kiełkujących nasion jojoba oraz frakcji mikrosomalnych wyizolowanych z tych nasion metodą immunoblotingu.	59
3.11	Oznaczanie zawartości węglowodanów	60
3.11.1	Oznaczanie zawartości węglowodanów w kiełkujących nasionach jojoba	60
4	WYNIKI.....	64
4.1	Jojoba (<i>Simmondsia chinensis</i>)	64
4.1.1	Mobilizacja materiałów zapasowych nasion jojoba podczas kiełkowania	64
4.1.2	Aktywność lipaz we frakcjach mikrosomalnych z kiełkujących nasion jojoba..	73
4.1.3	Charakterystyka biochemiczna lipaz kiełkujących nasion jojoba.....	75
4.2	Katran abisyński (<i>Crambe abyssinica</i>) i lnicznik siewny (<i>Camelina sativa</i>).....	95
4.2.1	Mobilizacja tłuszczów zapasowych podczas kiełkowania nasion <i>C. abyssinica</i> i <i>C. sativa</i>	95
4.2.2	Charakterystyka biochemiczna lipaz kiełkujących nasion <i>C. abyssinica</i> i <i>C. sativa</i>	98
4.3	Mobilizacji lipidów zapasowych w kiełkujących nasionach <i>Camelina sativa</i> linii transgenicznych magazynujących woski.....	122
5	DYSKUSJA.....	127
6	WNIOSKI.....	142
7	SPIS LITERATURY	144
8	SUPLEMENT.....	150

Wykaz skrótów

10:0-OH	Alkohol kaprynowy
12:0-OH	Alkohol laurylowy
14:0-OH	Alkohol mirystylowy
16:0	Kwas palmitynowy
16:1-OH	Alkohol palmitoleinowy
18:1	Kwas oleinowy
18:1-OH	Alkohol oleinowy
18:2-OH	Alkohol linolowy
18:3-OH	Alkohol linolenowy
20:0-OH	Alkohol arachidowy
20:1	Kwas eikozenowy
20:1-OH	Alkohol eikozenowy
22:0-OH	Alkohol behenowy
22:1	Kwas erukowy
22:1-OH	Alkohol erukowy
24:1	Kwas nerwonowy
24:1-OH	Alkohol lignocerylowy
ATP	Adenozynotryfosforan
CoA	Koenzym A
DAG	Diacyloglicerol
DTNB	Reagent Ellmansa
ER	Retikulum endoplazmatyczne
FA	Kwas tłuszczowy
FAE	Elongaza kwasów tłuszczowych
FA-OH	Alkohol tłuszczowy
FAR	Reduktaza kwasów tłuszczowych
FAS	Syntaza kwasów tłuszczowych
GC	Chromatografia gazowa
GC-FID	Chromatograf gazowy z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym
ICON	<i>Industrial Crops producing added value Oils for Novel chemicals</i>
MAG	Monoacyloglicerol
NAD	Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NADH	Forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
PE	Fosfatydyloetanolamina

POL	Lipidy polarne
rpm	Obroty na minutę
SE	Estry steroli
TAG	Triacyloglicerol
TLC	Chromatografia cienkowarstwowa
U	Jednostki enzymatyczne
UDP	Difosforan urydyny
WE	Woski
WS	Syntaza wosków

Streszczenie

Badania przeprowadzono na trzech gatunkach roślin oleistych: *Simmondsia chinensis* (jojoba), *Crabe abyssinica* (katran abisyński) i *Camelina sativa* (Inicznik siewny). Jojoba jest jedyną rośliną, o której wiadomo, że magazynuje w swoich nasionach, jako materiał zapasowy woski (ang. *wax esters*) zamiast triacylogliceroli. Katran abisyński i Inicznik siewny to uprawne rośliny oleiste, które ze względu na stosunkowo niewielkie wykorzystanie ich olei w przemyśle spożywczym wytypowane zostały do potencjalnej produkcji wosków (po odpowiednich modyfikacjach genetycznych) w międzynarodowym projekcie ICON ("*Industrial Crops producing added value Oils for Novel chemicals*") finansowanego częściowo przez Unię Europejską), którego częścią były badania prezentowane w niniejszej pracy.

Woski nasion jojoba składają się z bardzo długołańcuchowych jednonienasyconych kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych i stanowią do 60% masy jej nasion. Podczas kiełkowania nasion jojoba, pierwszy etap mobilizacji wosków jest katalizowany przez lipazy. Lipazy katalizują również pierwszy etap mobilizacji triacylogliceroli podczas kiełkowania nasion innych roślin oleistych. Do tej pory żaden z genów kodujących lipazę/y jojoba nie został sklonowany, a lipazy kiełkujących nasion jojoba, tak samo jak i lipazy kiełkujących nasion innych roślin oleistych były stosunkowo słabo scharakteryzowane. Głównym celem niniejszej pracy była charakterystyka lipaz kiełkujących nasion trzech wymienionych powyżej gatunków roślin oleistych; szczególnie ich specyficzności w stosunku do wosków.

W badaniach wykorzystywano frakcje mikrosomalne z kiełkujących nasion wymienionych wyżej gatunków roślin. W pierwszym etapie badań wykazano, że aktywność lipaz występujących w frakcjach mikrosomalnych uzyskanych z kiełkujących nasion w różnym etapie ich kiełkowania była do pewnego stopnia skorelowana z intensywnością mobilizacji lipidów zapasowych tych nasion. Ponadto w badaniach przeprowadzonych na kiełkujących

nasionach jojoba wykazano, że w miarę postępów kiełkowania w badanych frakcjach mikrosomalnych wzrasta zawartość oleozyn, białek charakterystycznych dla ciałek olejowych. Wyciągnięto, więc wniosek, że lipazy badanych frakcji mikrosomalnych pochodzą z resztek membran degradowanych ciałek olejowych. W badaniach specyficzności substratowej lipaz kiełkujących nasion wszystkich trzech badanych gatunków (*S. chinensis*, *C. abyssinica* i *C. sativa*) wykazano, że nie ma większych różnic w zdolności tych lipaz do hydrolizy wosków. Wykazano ponadto, że lipazy wszystkich badanych gatunków wykazują wyższe powinowactwo do triacylogliceroli niż wosków (również te z kiełkujących nasion jojoba). Lipazy wszystkich trzech badanych gatunków wykazywały również zdolność do syntezy wosków w warunkach *in vitro*. Pod względem właściwości biochemicznych, lipazy kiełkujących nasion testowanych roślin oleistych wykazywały zarówno podobieństwa, jak i różnice. Wszystkie były najbardziej aktywne w środowisku reakcji o pH w granicach 7-8. Różnic można się było jednak doszukać w ich reakcji na niższe i wyższe pH. Wszystkie były też aktywowane przez jony Ca^{2+} ; jony Mg^{2+} stymulowały jednak tylko aktywność lipaz nasion jojoba. Lipazy kiełkujących nasion jojoba i *C. abyssinica* wykazywały najwyższą aktywność w temperaturze około 60 °C, zaś lipazy nasion *C. sativa* maksimum aktywności osiągały już w temperaturze 30 °C. Dodatkowe różnice występowały w ich reakcjach na temperatury niższe i wyższe od optymalnych. Podczas kiełkowania transgenicznych roślin *C. sativa* magazynujących woski wykazano, że woski te były mobilizowane, jednak ich mobilizacja była trochę przesunięta w czasie w porównaniu do mobilizacji triacylogliceroli tych nasion, które mobilizowane były szybciej i we wcześniejszych fazach kiełkowania.

Summary

The presented study was carried out on three species of oilseed plants: *Simmondsia chinensis* (jojoba), *Crabe abyssinica* (crambe) and *Camelina sativa* (false flax). Jojoba is the only plant known to store wax esters instead of triacylglycerols in its seeds. Crambe and false flax are cultivated oilseeds plants which, due to the relatively small use of their oils in the food industry, were selected in the "Industrial Crops producing added value Oils for Novel chemicals" (ICON) - an international research project partially founded by the European Union - for the potential production of wax esters (after appropriate genetic modifications). The study contributed to the ICON project research.

Jojoba seed wax esters are composed of very long-chain monounsaturated fatty acids and fatty alcohols and account for up to 60% of its seed weight. During the germination of jojoba seeds, the first stage of wax esters mobilisation is catalysed by lipases. Lipases also catalyse the first step in the mobilisation of triacylglycerols during the germination of seeds of other oilseeds plants. To date, none of the genes encoding jojoba lipase(s) have been cloned, and the lipases of germinating jojoba seeds, as well as lipases of germinating seeds of other oilseeds plants, have been relatively poorly characterised. The main aim of this work was to characterise the lipases of germinating seeds of the three oilseeds plants listed above; focusing especially on their specificity towards wax esters.

Microsomal fractions from germinating seeds of the above-mentioned plant species were used in the study. In the first stage of the research, it was shown that the activity of lipases present in microsomal fractions obtained from germinating seeds at various stages of their germination was to some extent correlated with the intensity of mobilisation of storage lipids of these seeds. In addition, studies conducted on germinated jojoba seeds have shown that as germination progresses, the content of oleosins, proteins characteristic of oil bodies, increases in the tested microsomal fractions. Therefore, we have concluded that the lipases of the studied microsomal

fractions originate from membrane remnants of degraded oil bodies. The study on the substrate specificity of lipases of germinating seeds of all three species (*S. chinensis*, *C. abyssinica* and *C. sativa*) showed that there are no major differences in the ability of these lipases to hydrolyse wax esters. Moreover, lipases of all the tested species display a higher affinity to triacylglycerols than to wax esters (including those from germinating jojoba seeds). Lipases of all three tested species were also able to synthesise wax esters *in vitro*. In terms of biochemical properties, the lipases of the germinating seeds of the tested oilseeds plants showed both similarities and differences. All of them were most active in the reaction medium with a pH of 7-8. However, differences could be found in their response to a lower or a higher pH. All of them were also activated by Ca^{2+} ions; however, Mg^{2+} ions stimulated only the lipase activity of jojoba seeds. Lipases of germinating jojoba and *C. abyssinica* seeds showed the highest activity at a temperature of about 60 °C, while lipases of *C. sativa* seeds reached their maximum activity already at a temperature of 30 °C. Additional differences were noted in their responses to sub- and above-optimal temperatures. During seeds germination of transgenic *C. sativa* plants storing wax esters, it was shown that these wax esters were mobilised, but their mobilisation was slightly delayed compared to the mobilisation of triacylglycerols of those seeds that were mobilised faster and in earlier stages of germination.

1 WSTĘP

1.1 Przemysłowe aspekty produkcji tłuszczów roślinnych

Przez ostatnie 100 lat ropa naftowa była najtańszym surowcem do produkcji energii i chemikaliów. Znaczna część materiałów i infrastruktury współczesnego społeczeństwa została zbudowana na dostępności tego taniego źródła energii. Sytuacja ta obecnie drastycznie i szybko się zmienia z powodu kurczących się rezerw ropy naftowej w połączeniu z rosnącym popytem, oraz około 20-krotnym wzrostem ceny w stosunku do tej sprzed 25 lat. Co więcej, globalny wzrost liczby ludności, choć przewiduje się, że wyhamuje w drugiej połowie tego stulecia, nadal doprowadzi do ok 34% wzrostu populacji w ciągu najbliższych 30 lat. W związku z tym, nawet jeśli uda się wdrożyć istotne środki w zakresie efektywności energetycznej, nadal trzeba będzie znaleźć alternatywne źródła energii i materiałów, aby zaspokoić przyszłe poziomy popytu, które mogą osiągnąć dwukrotnie wyższy poziom niż obecne zużycie ropy naftowej, jeżeli dynamika globalnego rozwoju i standard życia mają pozostać na niezmiennym poziomie.

Ropa naftowa i węgiel pochodzą ze starożytnego materiału biologicznego (głównie ze źródeł roślinnych, w tym glonów) i stanowią wysoce zredukowaną formę tego samego materiału biologicznego, który jest obecnie produkowany na planecie. Logiczne jest zatem rozważenie nowo wyprodukowanego materiału biologicznego jako źródła energii i węgla.

Oleje roślinne są bardzo podobne do struktur chemicznych oleju kopalnego i mogą być przetwarzane w celu zastąpienia go w praktycznie każdym zastosowaniu. W zastosowaniach, w których oleje roślinne są obecnie preferowane w stosunku do olejów kopalnych w przemyśle chemicznym, ich przewaga wynika z niskich kosztów przetwarzania do produktu końcowego. Największym rynkiem dla roślinnych olejów przemysłowych (głównie tych zawierających kwas laurynowy) są dziś detergenty, głównie mydła, czyli sole sodowe kwasów tłuszczowych, które łatwo uzyskać poprzez podgrzanie oleju w obecności wodorotlenku sodu. Innym

znaczącym rynkiem dla olejów roślinnych jest produkcja erukamidu, środka poślizgowego do toreb plastikowych, wytwarzanego z kwasu erukowego (22:1^Δ13). Zarówno kwas laurynowy, jak i erukowy pochodzą z olejów roślinnych (np. kokosowego i wysokoerukowego rzepaku), które są zdominowane przez te kwasy (45–70% wszystkich kwasów tłuszczowych).

Aby oleje roślinne stały się bardziej konkurencyjne w przemyśle chemicznym, konieczna jest optymalizacja ich składu *in planta*. W przypadku niektórych właściwości oleju u niektórych roślin oleistych można to zrobić za pomocą tradycyjnych technologii selekcji mutantów. Jednak w większości przypadków wymaga to zastosowania inżynierii genetycznej. Głównym celem takiego podejścia jest uzyskanie jak największej proporcji pożądanego kwasu tłuszczowego w oleju. Ten kwas tłuszczowy może być kwasem tłuszczowym, który już istnieje w oleju lub może to być kwas tłuszczowy, który jest nowy dla gatunku. W obu przypadkach przerwanie naturalnego procesu syntezy kwasów tłuszczowych często prowadzi do dysfunkcyjnego procesu kiełkowania nasion. Dlatego badania nad dynamiką mobilizacji materiałów zapasowych, a także właściwościami enzymów nasiennych uczestniczących w tym procesie są niezbędne do osiągnięcia sukcesu (Carlsson, 2009).

1.2 Rośliny oleiste

Rośliny oleiste uprawiane są ze względu na wysoką zawartość tłuszczu (Szweykowska i in., 2003). Stanowi on u roślin oleistych ponad 15% suchej masy nasion, a czasami również owoców. Surowiec pozyskany z roślin przed dalszą obróbką określany jest mianem tłuszczu naturalnego, surowego. Tłuszcze roślinne po obróbce mogą mieć konsystencję stałą lub płynną i te ostatnie nazywane są olejami roślinnymi. Główne gałęzie przemysłu, które wykorzystują tłuszcz naturalny do późniejszych procesów przetwórczych to: przemysł spożywczy (cukierniczy, konserwowy i rybny), chemiczny (w produkcji farb i lakierów, środków ochrony

roślin, gum oraz smarów) oraz kosmetyczny i farmaceutyczny (produkcja maści oraz składników kosmetyków i leków) (Byczewski i in., 1973).

W skali świata kluczową rolę odgrywa kilkanaście gatunków roślin oleistych, jednak lokalnie wykorzystywanych jest jako źródło tłuszczów roślinnych w sumie ponad 200 gatunków roślin reprezentujących różne rodziny (Vaughan i in., 2003). W europejskiej strukturze produkcji rolniczej, wśród roślin oleistych główną pozycję zajmują słonecznik (40%) i rzepak (29%), a w krajach unijnych zdecydowanie dominuje (47%) rzepak (Jankowski i in., 2020).

1.2.1 Jojoba

Jojoba (*Simmondsia chinensis* Link, Buxaceae) to wieloletni krzew, który rośnie naturalnie na pustyniach południowo-zachodniej Ameryki Północnej. Jest to jedyny znany gatunek rośliny, który zamiast triacylogliceroli gromadzi w nasionach woski (estry kwasów tłuszczowych i długołańcuchowych alkoholi) jako rezerwy energetyczne. Woski nasion jojoba stanowią do 60% ich świeżej masy i składają się z bardzo długołańcuchowych jednonienasyconych kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych, takich jak kwas eikozenowy (20:1), kwas erukowy (22:1), alkohol eikozenowy (20:1-OH) i alkohol erukowy (22:1-OH) (Iven i in., 2013; Miwa, 1971). Oprócz lipidów, nasiona jojoba zawierają białka (15% świeżej masy), węglowodany (10% świeżej masy) i wodę (5-10 % świeżej masy); ich otoczka/łupina stanowi zaś 5-10% świeżej masy (Benzioni i in., 2007; Moreau i Huang, 1977). Woski są przechowywane w sferycznych organellach o średnicy od 1 do 1,5 μm , zwanych ciałami woskowymi, które wykazują morfologiczne podobieństwo do kropeł lipidowych innych roślin (Moreau i Huang, 1981; Rost i Paterson, 1978). Woski jojoba są cennymi związkami o wielu istotnych zastosowaniach komercyjnych w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym, przy czym są trudne do uzyskania w drodze syntezy chemicznej. *S. chinensis* jest obecnie uprawiana dla pozyskania oleju między innymi w USA, Meksyku, Chile, Argentynie, Indiach, Australii i Egipcie (Al-Obaidi i in., 2017). Ponieważ uprawa jojoba

jest zarówno stosunkowo trudna, jak i mało wydajna, w ostatnich latach opracowano technikę syntezy wosków podobnych do jojoba w bakteriach (Kalscheuer i in., 2006), drożdżach (Wenning i in., 2019, 2017) i roślinach oleistych, takich jak *Camelina sativa* i *Crambe abyssinica*. Jednak zauważono, że rośliny transgeniczne ze zwiększoną zawartością wosków w nasionach charakteryzowały się zmniejszoną częstotliwością kiełkowania nasion i zaburzonym wczesnym wzrostem sadzonek (Li i in., 2019; Ruiz-Lopez i in., 2017; Zhu i in., 2016). Te obserwacje doprowadziły do powstania hipotezy mówiącej, że upośledzona mobilizacja wosków może być główną przyczyną zmniejszonej żywotności nasion pochodzących z roślin transgenicznych gromadzących woski.

1.2.2 *Crambe abyssinica*

Katran abisyński (*Crambe abyssinica*) to roślina jednoroczna, która osiąga wysokość od 0,5 do 1,5 m. Końcowa wysokość rośliny uzależniona jest od gęstości siewu oraz jego pory. Łodyga katranu abisyńskiego (nazywanego w dalszej części katranem) jest mocno rozgałęziona, co przekłada się negatywnie na wydajność mechanicznego zbierania plonu (IENICA 2005, Budzyński i Zajac 2010). Katran jest rośliną stosunkowo łatwą w uprawie. Kiełkuje i owocuje na większości rodzajów gleb (z wyłączeniem gleb płytkich i kamienistych). Optimum wzrostu katranu obserwuje się w strefie klimatycznej o średniej rocznej temperaturze od 5,7 do 16 °C. Katran jest odporny na susze i krótkotrwałe przymrozki do -6 °C (Falasca i in., 2010). W zależności od pogody w sezonie, długość okresu od wysiewu nasion do zbioru plonu waha się od 83 do 130 dni (Budzyński i Zajac 2010). Najcenniejszą częścią plonu są owoce katranu. Są to kuliste łuszczyнки w kolorze piaskowym, posiadające jedno, bardzo rzadko dwa kuliste nasiona koloru oliwkowego, brązowo-zielonego bądź brązowego. Średnica nasion katranu zawiera się w przedziale od 0,8 do 2,6 mm (IENICA 2005, Budzyński i Zajac 2010, Falasca i in., 2010). Owocoplón na jednej roślinie waha się w przedziale od 530 do 1840 owoców (Lalas i in., 2012).

Pod względem wydajności produkcji oleju z jednostki powierzchni uprawnej, katroń zaliczany jest do jarych roślin oleistych z najwyższym plonem (Budzyński i Zająć 2010). Nasiona pozbawione łupiny nasiennej zawierają do 60% oleju, owoce zaś do 35% w przeliczeniu na suchą masę (Carlsson 2009). Olej katroń charakteryzuje się wysoką (około 55%) zawartością kwasu erukowego. Tak wysoka zawartość tej kardiotoksyny, hamującej wzrost mięśnia sercowego oraz jego odtłuszczenie, uniemożliwia zastosowania oleju katroń w przemyśle spożywczo-paszowym (Furmanek i Banaś 2011, Kopcewicz i Lewak 2002). Dla przemysłowego zastosowania, olej katrońowy jest natomiast doskonałą alternatywą dla olejów mineralnych. Posiada on wysoką odporność na utlenianie, posiada wysoki punkt zapłonu oraz łatwo ulega biodegradacji (Jankowski i Budzyński 2004, Budzyński i Zająć 2010).

Pozostała biomasa po produkcji oleju katrońowego również znalazła szerokie zastosowanie w przemyśle. Odtłuszczona śruta, stanowiąca produkt uboczny w produkcji oleju, jest produktem wysokobiałkowym (do 60% suchej masy), stosowanym w biologicznej ochronie roślin, jako inhibitor rozwoju chwastów i patogenów. Uwalniana z niej fitotoksyna ulega szybkiemu rozkładowi w środowisku oraz nie wykazuje wysokiej toksyczności w stosunku do człowieka. Śruta znajduje także zastosowanie w produkcji bioplastików oraz energii cieplnej (Jankowski i Budzyński 2004, Budzyński i Zająć 2010).

1.2.3 *Camelina sativa*

Lnianka siewna (*Camelina sativa* L. Crantz.) należy do rodziny *Brassicaceae*. Jest rośliną jednoroczną, głównie jarą, rzadziej ozimą. Długość okresu wegetacji form jarych wynosi około 115 dni a form ozimych ok. 290 dni. Wysokość form jarych waha się od 90 do 130 cm, a form ozimych od 80-120 cm. Kwiaty lnianki osiągają średnice ok. 7 mm i są samopylne. Owoc stanowi łuszczynka zawierająca do 15 bardzo małych nasion, o długości do 2 mm, których masa wynosi średnio (dla tysiąca nasion) od 0,8 do 1,8 g (Kurasiak-Popowska i in, 2018).

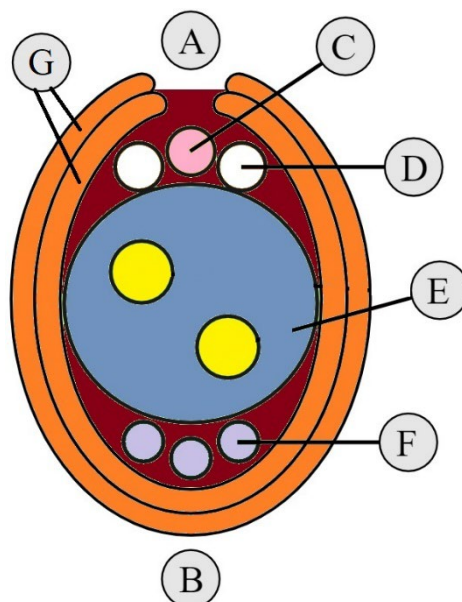
Aktualnie najwięcej lniarki uprawia się w Kanadzie oraz w Stanach Zjednoczonych (Hunsaker i in. 2011, Kakani i in. 2012). Popularność jej związana jest z odpornością na szkodniki oraz choroby, jak również na niekorzystne warunki klimatyczne oraz glebowe (Henderson i in. 2004, Sharma i in. 2002). Nie bez znaczenia jest również niska cena uprawy oraz potencjał, jaki lniarka wykazuje w produkcji biopaliw. (Lu i in. 2011).

1.3 Nasiona

Nasiona stanowią najbardziej rozwiniętą formę (wykształconą w procesie ewolucji) przystosowania organizmu roślinnego do reprodukcji. Są zbudowane w sposób, który umożliwia ochronę zarodka oraz ułatwia rozprzestrzenianie się organizmów potomnych. Zgromadzone są w nich również materiały zapasowe wykorzystywane przez zarodek, a później siewkę podczas kiełkowania.

1.3.1 Powstawanie nasion

Budowa anatomiczna nasion roślin okrytonasiennych różni się od budowy nasion roślin nagonasiennych. Ta różnica wynika z odmiennych cykli rozwojowych obu grup organizmów (Jardinaud i in., 2003). Nasiona roślin okrytonasiennych powstają na drodze podwójnego zapłodnienia. Jest to proces, w którym dwie komórki plemnikowe, które wprowadzone są przez łagiewkę pyłkową i okienko zalążka (**Rycina 1A**) do wnętrza wreczka zalążkowego, łączą się z komórką jajową (**Rycina 1C**), powstałą na drodze mejozy z jednej z komórek ośrodka zalążka, oraz z diploidalną komórką centralną wreczka zalążkowego (**Rycina 1E**). Na skutek połączenia się plemnika z komórką jajową powstaje zygota, rozwijająca się w zarodek. Z połączenia drugiego plemnika z komórką centralną powstaje triploidalne bielmo. Osłonki zalążka (**Rycina 1G**) przekształcają się w łupinę nasienną (Hejnowicz, 1980).



Rycina 1. Schemat woreczka zalążkowego z zaznaczonymi najważniejszymi częściami budowy. A. Okienko zalążka, B. Koniec chalazalny zalążka, C. Komórka jajowa, D. Synergidy, E. Diploidalna komórka centralna, F. Antypody. Źródło: domena publiczna (Internet) - zmodyfikowane

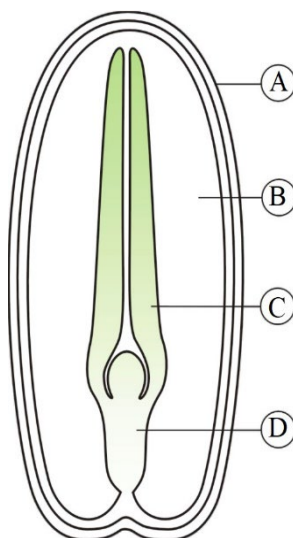
1.3.2 Budowa nasion

Podstawowymi częściami składowymi większości nasion roślin okrytonasiennych są: embriion (zarodek – **Rycina 2D**), tkanka spichrzowa (bielmo, endosperma – **Rycina 2B**) oraz łupina nasienna (**Rycina 2A**). U niektórych gatunków roślin występuje też obielmo (perisperma), wywodzące się z części ośrodka (nucellus), leżące zazwyczaj pomiędzy łupiną nasienną a bielmem. Jest to inny rodzaj tkanki spichrzowej o marginalnym znaczeniu.

Zarodek, prekursor nowej rośliny, to najważniejsza część nasienia. W typowej budowie zarodka można wyróżnić oś oraz liścienie. W zależności od liczby liścieni, wprowadzono podział na rośliny jednoliścienne oraz dwuliścienne. Oś zarodka tworzą: wierzchołek pędu, część podliścieniowa (hipokotyl) oraz wierzchołek korzenia. Oba wierzchołki zbudowane są z tkanki merystematycznej, posiadającej zdolność do szybkiego wzrostu i dają początek głównym częściom rośliny: łodydze i liściom (wierzchołek pędu) oraz korzeniom (wierzchołek korzenia). Hipokotyl jest strefą przejściową pomiędzy wierzchołkami. W procesie dojrzewania zarodka powstają liścienie (**Rycina 2C**), liście zarodkowe, z reguły krótkowieczne liście, opadające

wraz z wykształceniem przez roślinę kolejnych liści. W zależności od funkcji i rodzaju kiełkowania liścienie można podzielić na:

- liścienie spichrzowe, których funkcją jest odżywanie rozwijającej się siewki. Takie liścienie spotykane są przy kiełkowaniu podziemnym (hipogenicznym), kiedy pozostają one pod ziemią, otoczone łupiną nasienną, i odżywiają rozwijającą się siewkę (Szweykowska, 1993)
- liścienie asymiliacyjne, wynoszone są nad powierzchnię ziemi. Podczas kiełkowania nadziemnego (epigenicznego), po wyjściu z ziemi, liścienie zazieleniają się i zaczynają pełnić funkcję asymiliacyjną (Szweykowska, 1993)



Rycina 2. Schemat budowy nasienia rośliny dwuliściennej. A. Łupina nasienna, B. Bielmo, C. Liścienie, D. Zarodek. Źródło: (Grzesiuk i Kulka 1981 - zmodyfikowane).

Liczba liścieni w nasionach roślin jest stała w różnych grupach systematycznych. Ta cecha została wykorzystana przy tworzeniu kryterium podziału systematycznego roślin na jednoliścienne i dwuliścienne (Jardinaud i Petitprez 2003).

Łupina nasienna jest strukturą bardzo zróżnicowaną w królestwie roślin. Podstawowym budulcem łupiny nasiennej jest celuloza. W jej skład wchodzi też inne związki, takie jak: związki kutyny i ligniny, reszty żywicowe lub śluz. Wykształcane są również na jej powierzchni

struktury skrzydełkopodobne lub włoskopodobne. W zależności od składu łupiny nasiennej ma ona inne właściwości fizykochemiczne w tym, odporność na patogeny oraz przepuszczalność dla wody. Obecność struktur zewnętrznych na łupinie nasiennej pozwala znacząco zwiększyć zasięg dystrybucji nasion (Kopcewicz 2012).

1.3.3 Materiały zapasowe nasion

1.3.3.1 Lipidy

W obrębie królestwa roślin ilość lipidów w nasionach jest bardzo zróżnicowana i waha się od ułamka procenta do około 70% (Grzesiuk i Kulka 1981). Istnieją trzy główne tkanki, zawierające lipidy zapasowe w nasionach: bielmo (np. *Ricinus communis*), liścienie (np. *Brassica napus*, *Helianthus annuus*, *Linum usitatissimum*) oraz zarodek (np. *Triticum aestivum*, *Zea mays*) (Baud i Lepiniec 2010).

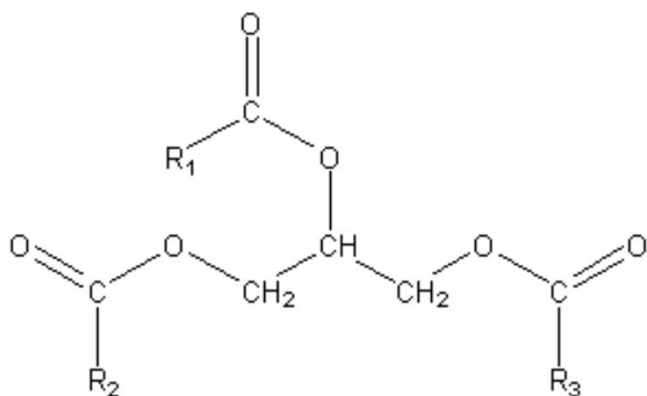
Istnieją dwa główne typy lipidów (tłuszczowców): tłuszcze proste i tłuszcze złożone. Oba te typy pełnią istotną, chociaż różną, funkcję fizjologiczną. Tłuszcze złożone pełnią zazwyczaj funkcje strukturalne, a tłuszcze proste stanowią materiał zapasowy. Jako główna substancja zapasowa występują w nasionach około 90% wszystkich gatunków roślin. Lipidy złożone składają się głównie z glikolipidów i fosfolipidów, podczas gdy tłuszcze proste to w przeważającej większości triacyloglicerole i woski (estry kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych) (Grzesiuk i Kulka 1981, Kopcewicz i Lewak 2002).

W nasionach lipidy zapasowe przechowywane są najczęściej w wyspecjalizowanych strukturach zwanych oleosomami, ciałkami olejowymi lub sferosomami (Zweytick i in., 2000, Murphy 2003). Zwykle lipidy te są przechowywane w oleosomach jako triacyloglicerole, które są cennym i wysoce skondensowanym źródłem energii podczas embriogenezy (Kączkowski 1992, Kinney 2003). Jojoba (*Simmondsia chinensis*) jest jedyną rośliną, która nie magazynuje

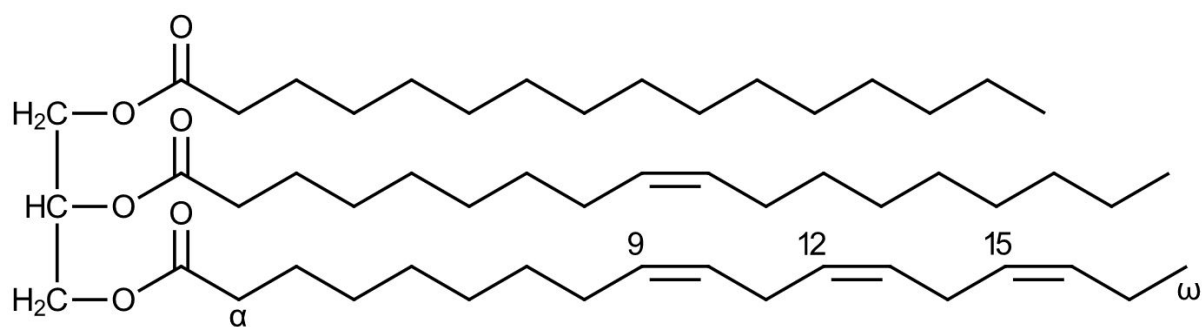
lipidów w formie triacylogliceroli (Schmid i Ohlrogge 2002). Zamiast tego jako podstawowy materiał zapasowy gromadzi płynne woski.

Triacyloglicerole

Poza wspomnianym wyjątkiem jakim jest jojoba, wszystkie pozostałe rośliny, magazynujące lipidy jako materiał zapasowy w nasionach, gromadzą go w formie triacyloglicerolu, zwanego również triglicerydem bądź, potocznie, tłuszczem. Triacyloglicerole zbudowane są z cząsteczki glicerolu i trzech cząsteczek długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, połączonych wiązaniami estrowymi z cząsteczką glicerolu (**Rycina 3 i 4**). Wyróżnia się triacyloglicerole proste (zbudowane z trzech takich samych kwasów tłuszczowych) oraz złożone (zawierające dwa lub trzy różne kwasy tłuszczowe w cząsteczce). W naturze częściej występują triacyloglicerole złożone (Kopcewicz i Lewak 2002).



Rycina 3. Wzór strukturalny triacyloglicerolu. R oznacza łańcuchy alifatyczne. Źródło: domena publiczna (Internet)



Rycina 4. Przykład cząsteczki triacyloglicerolu złożonego. Od lewej: gliceryna, po prawej od góry: kwas palmitynowy, kwas oleinowy, kwas α -linolenowy. Źródło: domena publiczna (Internet)

Dotychczas opisano ponad 300 różnych kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład triacylogliceroli lipidów zapasowych nasion (van de Loo i in., 1993). Można je pogrupować ze względu na długość łańcucha alifatycznego (**Tabela 1**) lub stopień jego nasycenia.

Tabela 1. Charakterystyka kwasów tłuszczowych ze względu na długość łańcucha alifatycznego

Grupy kwasów tłuszczowych	Nazwa angielska i skrót	Charakterystyka kwasów karboksylowych
Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe	<i>Short-chain fatty acids</i> (SCFA)	Krótkołańcuchowe kwasy karboksylowe, alifatyczny ogon krótszy niż C = 6 (nie występują w roślinach)
Średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe	<i>Medium-chain fatty acids</i> (MCFA)	Średniołańcuchowe kwasy karboksylowe, alifatyczny ogon C = 6 do 12
Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe	<i>Long-chain fatty acids</i> (LCFA)	Długołańcuchowe kwasy karboksylowe, alifatyczny ogon C = 14 do 20
Bardzo długołańcuchowe kwasy tłuszczowe	<i>Very long chain fatty acids</i> (VLCFA)	Bardzo długołańcuchowe kwasy karboksylowe, alifatyczny ogon C \geq 22

Nasycone kwasy tłuszczowe (ang. *saturated fatty acids*, SFA) to kwasy karboksylowe, które pomiędzy cząsteczkami węgla w łańcuchu alifatycznym zawierają tylko pojedyncze wiązania.

W warunkach normalnych występują one w formie białego ciała stałego. Kwasy tłuszczowe,

których łańcuch alifatyczny zawiera 10 lub więcej atomów węgla są nielotne i nierozpuszczalne w wodzie.

Nienasycone kwasy tłuszczowe (ang. *unsaturated fatty acids*, UFA) to kwasy karboksylowe, które pomiędzy cząsteczkami węgla w łańcuchu alifatycznym posiadają jedno (ang. *monounsaturated fatty acids*, MUFA) lub wiele (ang. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) podwójnych wiązań. Położenie podwójnych wiązań w łańcuchu determinuje właściwości chemiczne oraz konformację danego kwasu tłuszczowego.

Właściwości triacylogliceroli są różne w zależności od składu kwasów tłuszczowych. W królestwie roślin w składzie triacylogliceroli gromadzonych w nasionach dominują kwasy tłuszczowe zawierające 16 i 18 atomów węgla oraz co najmniej jedno wiązanie nienasycone. W triacyloglicerolach uprawnych roślin oleistych dominują kwasy: palmitynowy (16:0), oleinowy (18:1 Δ^9) oraz linolowy (18:2 $\Delta^9,12$), (Bewley i Black 1985). U wielu gatunków roślin występują specjalne kwasy tłuszczowe, wysoce pożądane w wielu gałęziach przemysłu ze względu na posiadane właściwości. Jako najistotniejsze warto wymienić: kwas rycynolowy ($C_{18}H_{34}O_3$) - jednonienasycony, długołańcuchowy kwas tłuszczowy z dodatkową grupą wodorotlenową, produkowany np. przez *Ricinus communis* (Carlsson 2009); kwas wernolowy ($C_{18}H_{32}O_3$) - jednonienasycony, długołańcuchowy kwas tłuszczowy z grupą epoksydową, produkowany np. przez *Vernonia galamensis* (Perdue 1989); kwas erukowy ($C_{22}H_{42}O_2$) - jednonienasycony, bardzo długołańcuchowy kwas tłuszczowy produkowany np. przez *Brassica napus* czy *Crambe abyssinica*. Kwas rycynolowy wykorzystywany jest w przemyśle chemicznym jako prekursor do produkcji bioplastiku oraz jako składnik kosmetyków (sól cynkowa). Olej wernolowy został zaproponowany jako prekursor spoiw, lakierów i farb oraz powłok przemysłowych. Ze względu na niską lepkość może być stosowany jako nielotny rozpuszczalnik w farbach olejnych, ponieważ zostaje włączony do suchej farby, a nie

odparowuje. Olej erukowy wykorzystywany jest przez przemysł chemiczny jako smar łatwo ulegający biodegradacji.

Woski

Woski to estry kwasów tłuszczowych i tłuszczowych alkoholi. Woski występują powszechnie w królestwie roślin, stanowiąc składnik hydrofobowej warstwy na wierzchni organów roślin. Woski syntetyzowane i magazynowane są również w nasionach jojoba jako materiał zapasowy (Moreau i Huang 1977). Jest to jedyne dotychczas odkryte źródło płynnego wosku w królestwie roślin. Podobny rodzaj wosku znajduje się w oleju olbrot, który jest produkowany przez kaszalota zwyczajnego i gromadzony w specjalnej puszcze (ang. *spermaceti organ*) zlokalizowanej w jego czaszce. Podstawowymi funkcjami olbrotu były regulacja wyporności kaszalota oraz aktywny udział w echolokacji. W XIX i XX wieku olbrot był używany głównie jako smar do silników mechanicznych. Jego nieprzeciętne właściwości smarujące doprowadziły do bezpośredniego zagrożenia wyginięciem kaszalota zwyczajnego.

Woski roślinne syntetyzowane są w retikulum endoplazmatycznym (ang. *endoplasmatic reticulum*, ER). Substratami do syntezy wosku są kwasy tłuszczowe połączone z koenzymem A (ang. *fatty acid coenzyme A*, Fa-CoA) oraz alkohole tłuszczowe (ang. *fatty alcohol*, FA-OH). Fa-CoA (acylo-CoA), powstają z kwasów tłuszczowych syntetyzowanych w plastydach (przez syntazę kwasów tłuszczowych; ang. *fatty acid synthase*, FAS) podczas ich transportu przez błony plastydowe. W cytoplazmie mogą być wykorzystane bezpośrednio do syntezy acylolipidów lub mogą ulegać elongacji do pożądanej długości łańcucha, przeprowadzanej w błonie ER przez elongazę kwasów tłuszczowych (ang. *fatty acid elongase*, FAE). FaOH powstają w reakcji przeprowadzanej przez reduktazy kwasów tłuszczowych (ang. *fatty acid reductase*, FAR). Enzymy te zlokalizowane są również w ER i wykorzystują jako substraty acylo-CoA z cytoplazmatycznej puli tych związków. Końcowym etapem syntezy wosków jest

połączenie Fa-CoA oraz FA-OH przez syntazę wosków (ang. *wax synthase*, WS) (Miklaszewska M, 2018).

Zapasowy wosk jojoba składa się głównie z cząsteczek zawierających pomiędzy 38 a 44 atomów węgla oraz nie więcej niż po jednym wiązaniu podwójnym w każdym z komponentów cząsteczki wosku. Dzięki temu woski te wykazują wysoką stabilność temperaturową oraz stabilność oksydacyjną. Woski zapasowe u jojoba magazynowane są w oleosomach (Frandsen i in. 2001).

Oleosomy

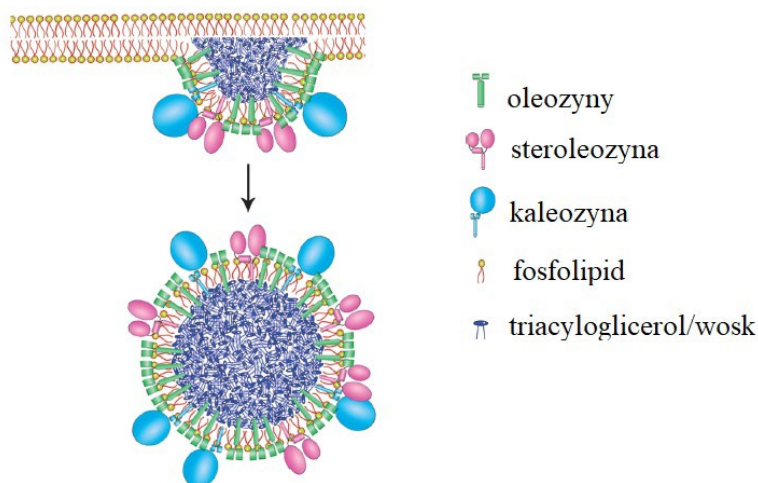
Aby możliwe było magazynowanie silnie hydrofobowych substancji w endospermie nasion, wykształcone zostały specjalne organella. Oleosomy (inaczej sferosomy lub ciała olejowe) powstają na skutek gromadzenia się triacylogliceroli bądź wosków w podwójnej błonie ER komórki. Triacyloglicerole czy woski rozpychając błonę od wewnątrz, prowadząc do uwypuklenia się jej, co w końcowej fazie prowadzi do enkapsulacji hydrofobowych lipidów wewnątrz oleosomów (**Rycina 5**). Oleosom składa się z pojedynczej warstwy fosfolipidowej, której hydrofilowe części lipidów zwrócone są do cytoplazmy. Wnętrze oleosomu jest homogeniczne, zawiera tylko lipidy: triacyloglicerole (niekiedy diacyloglicerole i wolne kwasy tłuszczowe) bądź woski. Ponieważ oleosom po oderwaniu od błony ER nie bierze udziału w procesie syntezy lipidów zapasowych, wielkości tego organellum są stałe dla poszczególnych gatunków i nie ulegają zmianie w procesie dojrzewania nasion. Wielkości opisanych oleosomów wynoszą od 0,6 do 2,5 μm (Schmid i Ohlrogge, 2002; Zweytick i in., 2000). W błonach oleosomów obecne są gatunkowo specyficzne białka: oleozyn, kaleozyny oraz steroleozyny (Shimada i Hara-Nishimura, 2010).

Białka błonowe oleosomów

W nasionach roślin zidentyfikowano trzy rodziny białek błonowych oleosomów: oleozyny, kaleozyny i steroleozyny. Białka te występują wyłącznie w świecie roślin. Najliczniejszymi białkami w ciałach olejowych nasion są oleozyny, które pełnią funkcje strukturalne. Wszystkie oleozyny mają trzy główne domeny:

1. hydrofilową domenę N-końcową,
2. hydrofobową domenę centralną,
3. hydrofilową domenę C-końcową.

Domena środkowa jest wysoce konserwowana i tworzy strukturę podobną do szpilki do włosów, która składa się z dwóch przeciwrównoległych β -nici, połączonych motywem węzła prolinowego. Ta struktura jest wstawiona do macierzy triglicerydowej oleosomów (**Rycina 5**).



Rycina 5. Schemat powstawania oleosomów – źródło: Shimada i Hara-Nishimura, 2010, zmodyfikowane

Oleozyny nasion charakteryzują się masą cząsteczkową w zakresie od 15 do 30 kDa. Determinują one zarówno wielkość oleosomu, jak i wpływają na proces kiełkowania nasion. Ponadto, wykształcają odporność nasion na zamarzanie. Poza nasionami oleozyny obecne są

również w pyłku kwiatu. Oleozyny pyłku kwiatu mają masę cząsteczkową od 10 do 50 kDa. Ich cechą charakterystyczną jest występowanie domen bogatych w glicynę, które nie występują w oleozynach nasion. Oleozyny pyłku wykazują działanie stabilizujące.

Kaleozyny mają masy cząsteczkowe około 30 kDa. Podobnie jak oleozyny składają się z hydrofilowej domeny N-końcowej, konserwowanej, hydrofobowej domeny centralnej z motywem wężła prolinowego oraz hydrofilowej domeny C-końcowej. W przeciwieństwie do oleozyn, w kaleozynach występuje miejsce wiązania wapnia, motyw dłoni EF w domenie N-końcowej. Dzięki występowaniu motywu ręki EF oraz wapnia białka te posiadają aktywność enzymatyczną peroksygenazy. Przypuszcza się, że niektóre homologi kaleozyny mogą być zaangażowane w odpowiedź rośliny na stres środowiskowy, ponieważ są produkowane w liściach i łodygach w odpowiedzi na suszę i stres osmotyczny.

Steroleozyny mają masy cząsteczkowe około 40 kDa i charakteryzują się aktywnością dehydrogenazy/reduktazy. Na N-końcu steroleozyna ma motyw gałki proliny, który składa się z aminokwasów hydrofobowych Pro-Pro/Phe/Ile/Leu-10-Pro-Pro/Fe. Chociaż przypuszcza się, że steroleozyny mają związek z biosyntezą steroli, ich funkcje fizjologiczne pozostają nieznane.

1.3.3.2 Węglowodany

Skrobia

Skrobia może stanowić do 80% suchej masy nasienia i zwykle występuje w nasionach jako cukier zapasowy (Grzesiuk i Kulka 1981). W skrobi występują dwa rodzaje polimerów glukozy: amyloza i amylopektyna. W cząsteczce amylozy, która występuje w formie bardzo długiego, pojedynczego i nierozgałęzionego łańcucha, znajdują się setki do tysięcy reszt glukozy, które są połączone wiązaniami α -1,4-glikozydowymi. Łańcuchy amylopektynowe posiadają dodatkowo rozgałęzienia. Większość reszt glukozy w rozgałęzieniach połączona jest

w ten sam sposób jak w cząsteczce amylozy. Punkty rozgałęziania tworzone są w miejscu wiązań α -1,6-glikozydowych, które występują co około 30-35 reszt glukozydowych (Kopcewicz i Lewak, 2002). Skrobia magazynowana jest przez rośliny w postaci ziaren o średnicy 1-100 μm , zawierających 20-30% amylozy i 70-80% amylopektyny. Ziarna te są magazynowane w różnych częściach nasienia. Kształt ziaren skrobi oraz ich wielkość zależą od gatunku rośliny. Chociaż ziarna skrobi wykazują dużą zmienność morfologii, ich wewnętrzna organizacja pozostaje taka sama. Ich grubość waha się w granicach 120-400 nm. Składają się one z naprzemiennych warstw apomorficznych i półkryształicznych. (Buléon i in., 1998; Smith i Denyer, 2003).

Disacharydy i oligosacharydy

Nasiona mogą również zawierać węglowodany w postaci disacharydów i oligosacharydów, ale ich sumaryczna ilość jest stosunkowo mała (do kilkunastu procent). Jeśli chodzi o disacharydy o funkcji magazynującej, najbardziej powszechna jest sacharoza. W dojrzałych nasionach stanowi ona 0,2-6% suchej masy. Wśród oligosacharydów dominuje rafinoza. Stachioza i werboskoza są z kolei mniej powszechnymi pochodnymi rafinozy występującymi w nasionach. Stwierdzono, że wyżej wymienione związki kumulują się głównie w zarodkach, ale można je również znaleźć w warstwach bielma lub aleuronów (Lityński, 1970; Grzesiuk i Kulka 1981). Disacharydy i oligosacharydy odgrywają istotną rolę jako tak zwany materiał zapasowy pierwszej potrzeby. Podczas kiełkowania i rozwoju siewek stanowią ważne źródło cukrów wykorzystywanych w procesie oddychania zarodka w czasie gdy główne rezerwy materiałów zapasowych nie są jeszcze uruchomione (Bewley i Black, 1985).

Hemicelulozy

Hemicelulozy, które są polisacharydami i pochodnymi polisacharydów, mogą odgrywać rolę zapasową w nasionach niektórych gatunków roślin. W przeciwieństwie do skrobi, hemicelulozy

nie gromadzą się wewnątrz komórek, ale odkładają się w ścianach komórkowych (Grzesiuk i Kulka, 1981). U niektórych gatunków roślin mogą stanowić nawet 40% suchej masy nasion. Największą grupą polisacharydów ścian komórkowych komórek nasion, aktywowanych podczas kiełkowania, są mannany. Wśród hemiceluloz wyróżnia się:

- mannany,
- galaktomannany,
- galaktany,
- glukomannany,
- ksyloglukany.

Nasiona z dużą zawartością hemicelulozy charakteryzują się znaczną twardością (Bewley i Black, 1985).

1.3.3.3 Białka zapasowe

Obok lipidów i węglowodanów kolejną grupą substancji zapasowych nasion są białka. W ramach swojej podstawowej funkcji białka zapasowe kondensują związki azotowe, które są dostępne do natychmiastowego wykorzystania w przypadku rozpoczęcia procesu kiełkowania nasion (Kączkowski 1992). Ciała białkowe powstają podczas tworzenia nasion. Białka zapasowe odkładane są w strukturach białkowych otoczonych pojedynczą błoną. Podczas kiełkowania ciała białkowe ulegają hydrolizie, dostarczając nowej roślinie aminokwasów potrzebnych w procesach syntezy (Kopcewicz i Lewak 2002). Zawartość białka w nasionach jest zróżnicowana i zależna od gatunku rośliny, zazwyczaj waha się od 10% do 40% suchej masy (Shewry 1995). Najniższą zawartość białek stwierdzono w nasionach skrobiowych, a największe ich ilości w nasionach białkowych. Nasiona tłuszczowe zajmują pozycję pośrednią (Grzesiuk i Kulka 1981). Białka zapasowe podzielono na cztery grupy: prolaminy, albuminy, globuliny i gluteliny (Shewry 1995). Wśród różnych gatunków roślin proporcje poszczególnych frakcji są zróżnicowane. Głównymi białkami zapasowymi u roślin dwuliściennych są albumina i globuliny, u roślin jednoliściennych - prolaminy i gluteliny

(Shewry 2003). Białka zapasowe w nasieniu znajdują się głównie w bielmie, zarodku oraz liścieniach. W ziarniakach zbóż miejscem deponowania białek zapasowych jest warstwa aleuronowa (Grzesiuk i Kulka, 1981).

Albuminy

Albuminy to grupa białek zapasowych nasion rozpuszczalnych w wodzie, powszechnie występujących w nasionach roślin dwuliściennych. Są to specyficzne gatunkowo, małe białka o wielkości 10-15 kDa. Najczęściej nazywane są albuminami zapasowymi 2S (Borroto i Dure, 1987) lub jak w przypadku *Brassica napus* napinami (Mandal i Mandal, 2000). Strukturalnie albuminy to heterodimery, składający się z dwóch łańcuchów polipeptydów o masach cząsteczkowych około 4 kDa i około 8 kDa połączonych dwoma mostkami dwusiarczkowymi. Albuminy nie są glikozylowane (Shewry, 2003).

Prolaminy

Nasiona traw i zbóż zawierają prolaminy, grupę białek spotykanych wyłącznie w świecie roślin. Prolaminy zbudowane są głównie z proliny i glutaminy; zawierają również tryptofan, treoninę oraz metioninę. Cechuje je niska zawartość lizyny (Shewry, 2003) oraz rozpuszczalność w alkoholach niskocząsteczkowych. Prolaminy są heterogeniczne, ich masa molowa waha się od 10 do 100 kDa (Shewry i Halford, 2002). Dominującymi formami prolamin w nasionach są monomery i małe agregaty (Mandal i Mandal, 2000), ale są one również zdolne do tworzenia polimerów większych niż 1 MDa (Shewry, 2003). W zależności od gatunku rośliny, prolaminy określa się za pomocą następujących nazw: awenina w owsie, gliadyna w pszenicy i życie, hordeina w jęczmieniu oraz zeina w kukurydzy (Grzesiuk i Kulka, 1981).

Globuliny

Wśród roślinnych białek zapasowych najczęściej występują globuliny. Największe ich ilości znajdowane są w roślinach dwuliściennych, niektórych gatunkach zbóż (owies, ryż), jak również w zarodnikach paproci (Shewry i in., 1995). Do ekstrakcji tych białek z nasion i ziaren używa się rozcieńczonych roztworów soli (Bewley i Black, 1985). W drodze analizy sedymentacyjnej wyodrębniono dwie frakcje globulin nasiennych: 7S i 11S. Te dwie frakcje posiadają różne struktury. Trimery 7S mają masę cząsteczkową 150-190 kDa, podczas gdy frakcja 11S zawiera heksamery o masie cząsteczkowej 300-450 kDa (Shewry, 2003). Obie te frakcje są glikoproteinami, które oprócz mannozy zawierają również glukozaminę i galaktozaminę (Kączkowski, 1992).

Gluteiny

Spośród białek zapasowych, oprócz prolamin, typowymi białkami roślinnymi są również gluteiny. Stanowią największą grupę białek użytkowych, wykorzystywanych zarówno w przemyśle spożywczym, jak i w przemyśle paszowym (Kączkowski, 1992). Jest to dominująca frakcja zapasowych białek w ziarniakach ryżu i pszenicy (Grzesiuk i Kulka, 1981; Krishnan i Okita, 1986). Białka te mają zdolność tworzenia agregatów, w których poszczególne cząsteczki połączone są mostkami dwusiarczkowymi. Są rozpuszczalne w słabych roztworach kwasów i zasad. Nie mają określonej masy cząsteczkowej; opisane przykłady charakteryzują się masą w przedziale od 50 kDa do niejednokrotnie 2 MDa (Grzesiuk i Kulka, 1981). Gluteina to podstawowy składnik glutenu, mającego kluczowe znaczenie w nadawaniu mące pszennej piekarniczych właściwości. Skład aminokwasowy glutein jest zbliżony do składu aminokwasowego prolamin.

Ciałka białkowe

Ciałka białkowe to organella występujące w nasionach, które umożliwiają magazynowanie białek zapasowych. Mogą one powstawać z błony ER lub na skutek podziału dużych wakuol. Pierwszy proces charakterystyczny jest dla roślin zbożowych (ryż, sorgo, kukurydza), drugi został opisany dla większości roślin dwuliściennych. Mechanizm powstania ciałek białkowych jest podobny: na skutek gromadzenia się białek zapasowych w błonie ER bądź w dużej wakuoli dochodzi z czasem do jej odfragmentowania się (błona ER) bądź podziału (wakuola) na mniejsze ciała białkowe (Müntz, 1998; Kermod, 2003). Końcowa forma ciała białkowego otoczona jest pojedynczą błoną, a jej rozmiar nie przekracza 25 μm . Skład ciałek białkowych jest przeważnie jednorodny, co oznacza, że zawierają jeden typ białek zapasowych. Wyjątkowo mogą pojawić się ciała białkowe, w których globuliny występują wspólnie z albuminami. Zaobserwowano również ciała białkowe, w których występowały inkluzje, pochodzące z wytrąconych białek nierozpuszczalnych (krystaloidy) bądź bezpostaciowych, globularnych form, zbudowanych z fityny (globoidy) (Bewley i Black, 1985).

Warstwa aleuronowa

Warstwa aleuronowa to skrajna warstwa bielma, najczęściej obserwowana w ziarniakach różnorodnych zbóż. Zbudowana jest z dużych, prostopadłościennych komórek, które mają za zadanie magazynowanie białek zapasowych. W przypadku wspomnianych ziarniaków zbóż, warstwa aleuronowa gromadzi do 30% całości białek zapasowych zmagazynowanych w nasieniu. Warstwa ta różni się zarówno morfologicznie, jak i biochemicznie od tkanek bielma skrobiowego, które znajduje się wewnątrz ziarniaków. W tej części nasienia gromadzone są głównie skrobia oraz niewielkie ilości białek (Becraft i Gibum, 2011).

1.3.4 Mobilizacja materiałów zapasowych nasion

Uruchomienie rezerw energetyczno-strukturalnych zgromadzonych w nasieniu możliwe jest tylko w momencie rozpoczęcia kiełkowania nasienia. Proces ten można określić jako wyjście nasienia ze stanu anabiozy i rozpoczęcie rozwoju dorosłej rośliny. Jako początek kiełkowania przyjmuje się imbibicję, czyli fazę intensywnego pobierania wody. Końcem procesu kiełkowania jest natomiast zakończenie tworzenia przez siewkę powierzchni asymilacyjnej czyniącej ją zdolną do samodzielnej wegetacji. Do tego momentu, czyli do uzyskania zdolności autotrofii, najpierw zarodek, a następnie młoda roślina rozwijają się dzięki zgromadzonym w nasieniu substratom energetycznym (Lityński, 1970).

Kiełkowanie nasienia to proces wielostopniowy, podczas którego zarodek przechodzi przez szereg zmian anatomicznych i morfologicznych. Podstawowymi etapami kiełkowania nasienia, podczas których zarodek zużywa materiały zapasowe są etap kataboliczny i anaboliczny. Etap kataboliczny to faza kiełkowania, w której zgromadzone w nasieniu materiały zapasowe, z reguły reprezentowane przez wielkocząsteczkowe związki, zostają hydrolizowane do mniejszych substancji, które są transportowane z tkanek bielma bądź z liścieni do zarodka, by zostać zużytymi w kolejnym etapie kiełkowania – fazie anabolicznej. Podczas niej wspomniane wcześniej metabolity materiałów zapasowych są wykorzystywane przez zarodek do tworzenia strukturalnych białek, węglowodanów, hormonów, lipidów oraz wszystkich pozostałych związków, potrzebnych do prawidłowego rozwoju zarodka (Kopcewicz i Lewak 2002, Jahnsen 2003). W królestwie roślin powszechnie spotyka się nasiona, w których zgromadzone są dwa bądź więcej rodzajów materiałów zapasowych (Bewley i Black 1985). Ta kompleksowość materiałów zapasowych wymusza harmonijne współdziałanie szlaków enzymatycznych i skorelowane działanie wszystkich procesów metabolicznych, zachodzących podczas uruchamiania materiałów zapasowych. Poniżej opisano poszczególne etapy uruchamiania nasiennych materiałów zapasowych.

1.3.4.1 Mobilizacja disacharydów i oligosacharydów

Węglowodany o małej masie cząsteczkowej, które są zlokalizowane w osi zarodka, są pierwszymi materiałami zapasowymi uruchamianymi po rozpoczęciu kiełkowania nasienia. Podstawowymi przedstawicielami tej grupy są rafinoza, sacharoza i stachioza, które wykorzystywane są w procesie oddychania zarodka jako materiał zapasowy pierwszej potrzeby. Na przykładzie zbóż oszacowano, że cały rezerwuar tych sacharydów zużywany jest podczas pierwszych 48 godzin kiełkowania nasienia. Węglowodany bielma nasiennego stają się dostępne dla kiełkującego zarodka dopiero w trzeciej dobie od rozpoczęcia procesu kiełkowania (Bewley i Black 1985).

1.3.4.2 Mobilizacja skrobi

Skrobia, gromadzona w nasionach w postaci ziaren, to niejednorodny cukier zapasowy, zbudowany z mieszaniny amylozy oraz amylopektyny. Ta niejednorodność wymusza istnienie różnego przebiegu hydrolizy dla każdego z tych polimerów. Pierwszy etap hydrolizy skrobi w nienaruszonych ziarnach jest katalizowany przez dwa enzymy: α -amylazę i β -amylazę. Pierwszy z nich jest hydrolazą, która specyficznym przecina wiązania α -1-4-glikozydowe w przypadkowych miejscach. Produktami tej hydrolizy są glukoza i maltoza (w przypadku działania α -amylazy na cząsteczkę amylozy) oraz dodatkowo małowcząsteczkowe oligosacharydy, połączone wiązaniem α -1-6-glikozydowym (pochodzące z hydrolizy amylopektyny). β -amylaza hydrolizuje zaś wiązanie α -1-4-glikozydowe najbardziej zewnętrzne odcinając cząsteczki maltozy. W przypadku hydrolizy amylopektyny, oprócz maltozy, końcowym produktem jej działania (podobnie jak w przypadku hydrolizy amylopektyny przez α -amylazę) są dekstryny końcowe, czyli fragmenty wewnętrzne polisacharydu skrobi, połączone wiązaniem α -1-6-glikozydowym. Są one substratem dla oligo-1,6-glukozydazy, która hydrolizuje wiązania α -1-6-glikozydowe w cząsteczce dekstryny

końcowej. Powstające krótkołańcuchowe oligosacharydy są dalej rozkładane do glukozy lub maltozy zarówno przez α -amylazę jak i β -amylazę. Cząsteczki maltozy hydrolizowane są zaś przez α -glukozydazę do pojedynczych cząsteczek glukozy (Kopcewicz i Lewak 2002).

Procesem alternatywnym uwalniania glukozy ze skrobi jest proces fosforolizy. Aktywowana jonami fosforanowymi fosforylaza skrobiowa hydrolizuje wiązania α -1-4-glikozydowe najbardziej skrajnych reszt glukozyowych łańcuchów amylozy i amylopektyny, uwalniając cząsteczki glukozy-1-fosforanu. Hydroliza wiązań α -1-6-glikozydowych uzyskanych w tym procesie dekstryn końcowych zachodzi tak samo, jak opisano powyżej dla procesu hydrolizy przeprowadzanej przez amylazy (Grzesiuk i Kulka 1981, Bewley i Black 1985).

Opisany proces hydrolizy skrobi prowadzi do powstawania prekursorów sacharozy – cukru transportowego, który w tej formie dostarczany jest do rozwijającego się korzenia oraz pędu powstałej siewki. Sacharoza syntetyzowana jest bezpośrednio z fosforylowanej glukozy, będącej produktem reakcji fosforolizy. W przypadku wolnej glukozy, uzyskanej w procesie hydrolizy amylazami, wymagana jest jej wcześniejsza fosforylacja. Cząsteczka glukozy fosforylowana jest do glukozy-6-fosforanu. W następującej kolejno reakcji izomeryzacji przekształcana jest do glukozy-1-fosforanu, a kolejno w UDP-glukozę. Jest ona następnie wykorzystywana jako substrat do syntezy fosforanu sacharozy poprzez wiązanie z fruktozo-6-fosforanem. Ostatnim krokiem procesu jest przekształcenie fosforanu sacharozy w cząsteczkę sacharozy (Kopcewicz i Lewak, 2002).

Po przetransportowaniu do organów docelowych powstałej siewki, sacharoza wykorzystywana jest w procesach anabolicznych (synteza polisacharydów, lipidów, aminokwasów), jak również katabolicznych (jako donator niezbędnej do procesów anabolicznych energii) (Grzesiuk i Kulka, 1981; Bewley i Black, 1985).

1.3.4.3 Mobilizacja hemicelulozy

Magazynowane w ścianach komórkowych bielma lub liścienia hemicelulozy są również zużywane podczas pierwszych etapów kiełkowania siewki. Główne grupy hemiceluloz nasion: ksyloglukany, mannany oraz galaktany są prekursorami cukrów prostych, takich jak glukoza, galaktoza, mannoza, arabinoza i ksyloza. Cukry te, po odpowiednich przekształceniach, są transportowane w formie sacharozy do rozwijającej się siewki i wykorzystywane w procesie oddychania komórkowego bądź jako prekursory polisacharydów ścian komórkowych siewki (Buckeridge i in., 2000).

1.3.4.4 Mobilizacja triacylogliceroli

Gromadzone w oleosomach estry kwasów tłuszczowych i glicerolu są cennym materiałem energetycznym i strukturalnym dla rozwijającej się rośliny. Aby roślina mogła z nich korzystać, niezbędne jest ich przekształcenie do formy, w której mogą być transportowane z oleosomu do zarodka kiełkującej rośliny. Formą tą jest sacharoza, a reakcja przekształcenia w nią triacyloglicerolu jest wielostopniowym procesem enzymatycznym. Pierwszym etapem reakcji jest hydroliza wiązania estrowego pomiędzy kwasami tłuszczowymi a szkieletem glicerolu. Katalizowana jest ona przez lipazy triacyloglicerolu, zlokalizowane w błonie oleosomu. Wolny glicerol zostaje ufosforylowany i przekształcony w fosfodihydroksyaceton. W tej formie ulega dalszym przekształceniom w ciągu reakcji glikolitycznych. Wolne kwasy tłuszczowe zostają natomiast skierowane do cyklu β -oksydacji, zachodzącego w gliksysomach.

Gliksysomy są organellami występującymi w komórkach liścieni, bielma i warstwy aleuronowej roślin, które są zlokalizowane w sąsiedztwie oleosomów. Pod względem strukturalnym są tożsame z peroksysomami i określane wspólną nazwą mikrociał. Otoczone są pojedynczą błoną białkowo-lipidową. Mają kształt okrągły lub owalny i średnicę 0,1–1,5 μm (Kopcewicz i Lewak, 2002). Gliksysomy odgrywają ważną rolę w procesie mobilizacji

tłuszczów podczas kiełkowania roślin. Reakcje zachodzące w glioksysomach zapewniają przekształcenie lipidów w cukry, wykorzystywane do budowy struktur komórkowych kiełkujących roślin. Enzymy obecne wewnątrz glioksysomu, liaza izocytrynianowa i syntaza jabłczanowa, umożliwiają prowadzenie cyklu glioksalanowego. Jego dwa główne produkty, bursztynian oraz jabłczan, transportowane są poza strukturę glioksysomu. Bursztynian kierowany jest do mitochondrium i zostaje włączony do cyklu Krebsa, w efekcie czego zostaje przekształcony do energii w postaci ATP. Jabłczan zaś zostaje włączony do reakcji glukoneogenezy. Zachodzi ona w cytoplazmie i rozpoczyna się od utlenienia jabłczanu do szczawiooctanu. W kolejnych etapach reakcji szczawiooctan przekształcany jest w fosfoenolopirogronian. Ostatnim produktem glukoneogenezy jest sacharoza, która transportowana jest do korzenia i pędu siewki. Efektywne przekształcenie tłuszczów w cukry jest możliwe dzięki odizolowaniu reakcji glukoneogenezy od przemian zachodzących w mitochondriach (Kopcewicz i Lewak, 2002).

1.3.4.5 Mobilizacja wosków

Z dotychczasowych danych literaturowych omawiających kiełkowanie nasion jojoba wynika, że podczas kiełkowania zachodzi mobilizacja wosków. Proces mobilizacji wosków rozpoczyna się od hydrolizy wiązania estrowego, który jest katalizowany przez esterazę wosków. W efekcie tej reakcji powstają kwas tłuszczowy oraz alkohol tłuszczowy (Huang i in., 1978). Kwasy tłuszczowe transportowane są bezpośrednio do glioksysomu i poddawane reakcjom opisanym w rozdziale powyżej. Długołańcuchowe alkohole tłuszczowe mogą być dalej metabolizowane tylko po utlenieniu do kwasów tłuszczowych. Reakcja ta jest dwuetapowym procesem, w którym dwa enzymy – oksydaza alkoholi długołańcuchowych oraz dehydrogenaza aldehydów długołańcuchowych, przekształcają cząsteczki alkoholi tłuszczowych do cząsteczek kwasów tłuszczowych (Rajangam i in., 2013).

1.3.4.6 Mobilizacja białek

Zapasy białek, które można znaleźć we wszystkich nasionach, są podstawowym rezerwuarem gotowych związków azotowych, dostępnych dla kiełkującej siewki. Mobilizacja białek polega na uwalnianiu wolnych amidów i aminokwasów z ciałek białkowych do tkanek kiełkującego zarodka. Odbywa się to na drodze hydrolizy wiązań peptydowych w zapasowych białkach. W zarodku aminokwasy mogą zostać użyte do ponownej syntezy białek strukturalnych nowopowstającej rośliny bądź, po szeregu przekształceniach, stanowić materiał do syntez innych związków azotowych (Czerwiński, 1976; Kopcewicz i Lewak, 2002).

Pierwszym etapem mobilizacji białek jest deamidacja i hydroliza mostków disiarczkowych. Procesy te, zachodzące w ciałkach białkowych, inicjują proces hydrolizy białek zapasowych, zmieniając wyjściową strukturę białek zapasowych. W kolejnym etapie, endopeptydazy hydrolizują wewnętrzne wiązania peptydowe, prowadząc do powstania krótkich łańcuchów peptydowych. W kolejnym kroku do wnętrza ciałek białkowych transportowane są endo- i egzopeptydazy cytoplazmatyczne oraz oleosomalne. Podczas gdy endopeptydazy pochodzące z ciałek olejowych w dalszym ciągu hydrolizują wewnętrzne wiązania peptydowe krótkich peptydów, zwiększając ilość krótkich polipeptydów, aminopeptydazy i karboksypeptydazy, enzymy z grupy egzopeptydaz, hydrolizują wiązania peptydowe najbardziej skrajnych aminokwasów krótkich łańcuchów polipeptydowych. Aminopeptydazy działają na N-koniec peptydów, podczas gdy karboksypeptydazy działają od C-końca. Uwolnione aminokwasy zwielfokrotniają objętość ciała białkowego, w konsekwencji prowadząc do rozerwania jego błony i uwolnienia aminokwasów w końcowej fazie kiełkowania nasion (Grzesiuk i Kulka, 1981; Bewley i Black, 1985).

Spośród uwolnionych aminokwasów białek zapasowych pewien procent wykorzystywany jest do ponownej syntezy białek strukturalnych i enzymatycznych w nowopowstającej siewce.

Reszta uzyskanych aminokwasów zostaje poddana dalszym modyfikacjom i stanowi prekursor dla innych związków organicznych. Ketokwasy, powstające na drodze deaminacji oksydacyjnej aminokwasów, poddawane są kolejnym modyfikacjom, aby ostatecznie stać się prekursorami węglowodanów oraz lipidów. Amoniak, powstający w reakcjach deaminacji, neutralizowany jest poprzez wykorzystanie go jako substratu w syntezie amidów.. Alkaloidy powstają z amin, które powstają podczas dekarboksylacji aminokwasów. W tym samym procesie powstają wybrane regulatory wzrostu roślin. W przypadku braku aminokwasów, potrzebnych w kiełkującej siewce do produkcji białek, możliwe jest ich uzyskanie na drodze transaminacji kwasu glutaminowego (Lityński, 1970; Grzesiuk i Kulka, 1981).

Zaobserwowano, że mobilizacja białek jest procesem, zachodzącym stosunkowo późno po rozpoczęciu kiełkowania. Rozpoczyna się pomiędzy 4. a 8. dniem od fazy imbibicji i skorelowana jest ze spadkiem aktywności inhibitorów, prowadzącej do rozpadania się kompleksów proteaza-inhibitor (Mayer i Shain, 1974). Zaobserwowano również, że proces proteolizy w ciałkach białkowych nie zachodzi równomiernie w całym nasieniu (Müntz i in., 2001).

1.3.4.7 Mobilizacja fityny

Fityna, będąca największym rezerwuarem związków fosforowych w nasionach roślin, uruchamiana jest pomiędzy 2. a 5. dniem od rozpoczęcia procesu kiełkowania. Fitaza, enzym hydrolizujący fitynę, produkuje szereg produktów: mio-inozytol, fosforany nieorganiczne oraz zasocjowane kationy fosforanowe. Fosforany, po przetransportowaniu do tkanek rozwijającego się zarodka, wykorzystywane są do syntezy nukleotydów, estrów kwasu fosforowego oraz fosfolipidów. Mio-inozytol, będący prekursorem wybranych polisacharydów roślinnych ścian komórkowych, wykorzystywany jest w procesie ich syntezy (Grzesiuk i Kulka, 1981; Bewley i Black, 1985).

2 WPROWADZENIE I CEL PRACY

Głównym materiałem zapasowym nasion ponad 90% gatunków roślin są lipidy zapasowe; przede wszystkim triacyloglicerole (TAG) (Sommerville i in., 2000). Podczas kiełkowania nasion, triacyloglicerole są rozkładane do wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu. Proces ten przeprowadzają lipazy. Uwolnione z TAG kwasy tłuszczowe metabolizowane są dalej w procesie β -oksydacji. W kiełkujących nasionach proces ten przebiega w glioksosomach. W odróżnieniu od zwierząt gdzie jedynym celem β -oksydacji jest dostarczenie ATP (proces przebiega w mitochondriach), u roślin β -oksydacja służy głównie, jako źródło prekursorów do biologicznych syntez (Sommerville i in. 2000, Kopcewicz i Lewak, 2002). Po odłączeniu od TAG kwasy tłuszczowe transportowane są do glioksosomów gdzie w reakcji zależnej od ATP przekształcane są do acylo-CoA. Kolejno w reakcji katalizowanej przez kompleks czterech enzymów odłączane są od nich dwu-węglowe reszty acetylowe połączone z CoA (acetylo-CoA). Reakcja rozpoczynana jest przez oksydazę acylo-CoA, która wprowadza podwójne wiązanie typu trans w pozycji Δ^2 (w procesie tym powstaje także H_2O_2 który rozkładany jest przez katalazę). Kolejny enzym, hydrataza enoilo-CoA, dołącza cząsteczkę wody. Powoduje to likwidację podwójnego wiązania oraz przyłączenie grupy hydroksylowej do atomu węgla „3”. Trzeci z enzymów kompleksu, dehydrogenaza β -hydroksyacylo-CoA, utlenia grupę hydroksylowa do grupy ketonowej; przenosi elektrony na NAD^+ (powstaje NADH). Ostatni z enzymów kompleksu, acetylo-transferaza acylo-CoA (tiolaza) odłącza acetylo-CoA i przyłącza do reszty acylowej CoA, aktywując ją do acylo-CoA. Skrócony o dwa atomy węgla, zaktywowany kwas tłuszczowy może znowu wchodzić w reakcje prowadzące do kolejnego odłączenia acetylo-CoA. Cykl powtarza się aż do całkowitego rozłożenia cząsteczki kwasu tłuszczowego. Powstały w procesie β -oksydacji acetylo-CoA metabolizowany jest dalej w cyku glioksalanowym. Cykl ten jest modyfikacją cyklu Krebsa; po przyłączeniu acetylo-CoA do szczawiooctanu i powstaniu cytrynianu przekształconemu

kolejno do izocytrynianu zaczyna działać enzym charakterystyczny tylko dla tego cyklu: liaza izocytrynianowa. Rozszczepia ona izocytrynian na bursztynian i gliksalan. Bursztynian służy głównie do odtworzenia szczawiooctanu, zaś do gliksalanu dołączana jest jednostka dwuwęglowa pochodząca z acetylo-CoA. Powstaje jabłczan, który eksportowany jest z gliksosomów do cytozolu gdzie w procesie glukoneogenezy służy do wytworzenia cukrów wykorzystywanych przez rozwijające się siewki. Reakcję powstawania jabłczanu katalizuje syntaza jabłczanowa, drugi enzym charakterystyczny dla cyklu gliksalanowego (Sommerville i in. 2000, Kopcewicz i Lewak, 2002).

Podczas hydrolizy wosków (głównego materiału zapasowego nasion jojoba), w odróżnieniu od hydrolizy TAG, oprócz kwasów tłuszczowych powstają również długołańcuchowe alkohole tłuszczowe. Aby mogły być one wykorzystane, jako źródło energii dla rozwijających się siewek muszą być one najpierw utlenione do odpowiednich kwasów tłuszczowych. Reakcja ta przeprowadzana jest przez oksydazę alkoholi tłuszczowych. Po przekształceniu do kwasów tłuszczowych mogą dalej już być przekształcane w procesie β -oksydacji i kolejno w reakcjach cyklu gliksalanowego.

Badania przeprowadzane w ramach niniejszej pracy były częścią międzynarodowego projektu o akronimie ICON. Głównym celem projektu było wytworzenie (opracowanie warunków do takiego wytworzenia) transgenicznych roślin oleistych produkujących olej zawierające woski. Jedyną poznaną rośliną oleistą produkującą naturalnie woski, magazynowane następnie w nasionach, jest jojoba. Magazynowane w nasionach woski są podczas kiełkowania nasion hydrolizowane, a komponenty ich hydrolizy są następnie dalej metabolizowane (opis powyżej) i wykorzystywane przez rozwijające się siewki. Pierwszą reakcją pozwalającą na dalszy metabolizm wosków jest reakcja ich hydrolizy przeprowadzana przez enzymy z grupy lipaz. Ponieważ charakterystyka biochemiczna lipaz oraz ich specyficzność substratowa, zarówno tych występujących w nasionach jojoba jak i tych występujących w nasionach roślin oleistych

potencjalnie przeznaczonych do transgenezy była bardzo słabo poznana, celem niniejszej pracy było dostarczenie takich informacji dla pozostałych uczestników projektu (oraz dla szerszego grona społeczności akademickiej). Do badań wytypowano trzy gatunki roślin: jojoba (*Simmondsia chinensis*), katran abisyński (*Crambe abyssinica*) oraz lnicznik siewny (*Camelina sativa*). W pierwszym etapie badań charakterystyce miały być poddane lipazy kielkujących nasion jojoba, a kolejno lipazy kielkujących nasion katrań i lnicznika. Ponieważ brak było standardowych procedur, wstępny etap badań miał dotyczyć opracowania/optymalizacji metod badawczych. W ramach badań zaplanowano również syntezę odpowiednich substratów, głównie znakowanych [¹⁴C] wosków, ponieważ substraty te były komercyjnie niedostępne. W badaniach zaplanowano też analizę mobilizacji wosków podczas kiełkowania nasion ewentualnych roślin transgenicznych zdolnych do ich biosyntezy i akumulacji. Wszystkie zaplanowane zadania zostały pomyślnie przeprowadzone, a wyniki tych badań opisane są w dalszych rozdziałach pracy.

3 MATERIAŁY I METODY

3.1 Stosowane odczynniki, bufony i roztwory

I. Ekstrakcja lipidów

- metanol (Merck)
- chloroform (Merck)
- kwas octowy lodowaty (Merck)

II. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

- heksan (Merck)
- eter dietylowy (Merck)
- kwas octowy lodowaty (Merck)
- chloroform (Merck)
- metanol (Merck)
- płytki chromatograficzne pokryte krzemionką SilicaGel 60 (Merck)

III. Chromatografia gazowa (GC)

- metanol suszony SeccoSolv (Merck)
- kwas siarkowy VI (Sigma Aldrich)
- heksan czysty (Merck)
- ester metylowy kwasu heptadekanowego (17:0-Me) (Sigma Aldrich)

IV. Izolacja frakcji mikrosomalnych

- 0,1 M potasowy bufor fosforanowy pH 7,2 (Sigma Aldrich)
- Sacharoza (Sigma Aldrich)
- Albumina surowicy wołu – BSA – (Life Technologies)

- Katalaza (Roche)

V. Reakcje in vitro

- Benzen (Sigma Aldrich)
- 10 mM chlorek magnezu (Sigma Aldrich)
- 10 mM chlorek wapnia (Sigma Aldrich)
- 0,1 M bufor cytrynianowy pH 4,0 - 6,0 (Sigma Aldrich)
- 0,1 M potasowy bufor fosforanowy pH 7,2 (Sigma Aldrich)
- 0,1 M bufor Tris base pH 8,0-10,0 (Sigma Aldrich)
- Substraty do reakcji:
 - o TAG* - [1-¹⁴C]trioleinian glicerolu ([¹⁴C]18:1-TAG) (Perkin Elmer, Waltham)
 - o TAG – trioleinian glicerolu (18:1 – TAG) (Larodan)
 - o Pochodne trioleinianu glicerolu (dioleinian glicerolu i monooleininian glicerolu oraz wolny kwas oleinianowy, uzyskiwano metodą, opisaną w rozdziale 3.8.3.2
 - o Woski – radioaktywne substraty do analizy specyficzności substratowej zostały uzyskane w Pracowni Biochemii Roślin MWB UG-GUMed.
Wszystkie użyte woski opisano w rozdziale 4.1.3.5

VI. Ekstrakcja białek rozpuszczalnych

- Bufor ekstrakcyjny: 0,1 M Tris-HCl, 1% SDS, 1 mM DTT, pH 6,8 (Sigma Aldrich)

VII. Ekstrakcja węglowodanów

- Bufor MOPS z α -amylazą: 50 mM MOPS, 5 mM CaCl₂, 0,02% azydek sodu, α -amylaza 100 U/ml, pH 7,0 (Sigma Aldrich)

- Bufor octanowy z amyloglukozydazą: 200 mM octan sodu, 0,02% azydek sodu, amyloglukozydaza 5 U/ml, pH 4,5 (Sigma Aldrich)
- Bufor octanowy: 50 mM octan sodu, pH 4,5 (Sigma Aldrich)

3.2 Zestaw do oznaczania stężenia białek

Do oznaczania stężenia białek wykorzystano zestaw Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific):

- Albumina (standard): 2 mg/ml; 1,5 mg/ml; 1 mg/ml; 0,8 mg/ml; 0,6 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,1 mg/ml
- Reagent A: bufor węglanowy z dodatkiem soli kwasu winowego i kwasu bicinechoninowego
- Reagent B: 4% wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi

3.3 Zestaw do elektroforezy poliakrylamidowej oraz transferu białek

- Żel poliakrylamidowy NuPAGE 12% Bis-Tris Gel (Invitrogen)
- Membrana nitrocelulozowa Nitrocellulose Membrane 0,2 μ m Pore size (Invitrogen)
- Bufor NuPAGE "LDS Sample Buffer" (Invitrogen), skład na 10 ml: glycerol - 4 g, Tris-HCl - 0,666 g, Tris base - 0,682 g, dodecylosiarczan litu - 0,8 g, EDTA - 0,006 g, błękitbrylantynowy kumaryny (servaBlu G250) - 0,75ml 0,1% roztworu, czerwień fenolowa - 0,25 ml 1% roztworu, pH 8,5
- Bufor NuPAGE "MOPS SDS Running buffer" (Invitrogen), skład: 50 mM MOPS, 50 mM Tris base, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7,7
- Bufor NuPAGE "Transfer buffer" (Invitrogen), skład: 20 mM Bicine, 20 mM Bis-Tris, 1,2 mM EDTA, 0,05 mM chlorobutanol, 10% metanol, pH 7,2

3.4 Zestaw do oznaczania specyficznych białek w żelu

- Zestaw "BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit, Roche)"
- "Western Blocking Reagent" - 10% roztwór oczyszczonej kazeiny w buforze maleinianowym (Invitrogen)
- Przeciwciała wtórne - znakowane peroksydazą przeciwciała mysich i króliczych immunoglobulin klasy G (Invitrogen)
- Zestaw chemiluminescencyjny - odczynnik A: wodny roztwór luminolu zawierający 4-jodofenol, odczynnik B: wodny roztwór boranu sodu (Invitrogen)
- Zestaw do barwienia białek na żelach poliakrylamidowych Colloidalbluestaining kit (Invitrogen).

3.5 Zestaw do oznaczania zawartości cukrów

Do oznaczenia zawartości skrobi użyto zestawu „Total Starch assay kit” (Megazyme):

- α - amylaza termostabilna 3000 U/ml
- Amyloglukozydaza 200 U/ml
- Roztwór GOPOD - wodorofosforan (V) potasu, kwas p-hydroksybenzoesowy i azydek sodu z dodatkiem oksydazy glukozy (12 000 U/l), 0,4 M aminoantypiryny oraz peroksydazy (650 U/l)

3.6 Aparatura wykorzystywana w badaniach

- Aparat do elektroforezy poliakrylamidowej, XCell SureLock™, Blot Module, Invitrogen
- Homogenizator, UltraTurraX® TLS, IKA-Labrotechnik
- Komora hodowlana,
- Łąźnia wodna, GFL 1086
- Spektrofotometr, Spectroquant® Pharo300, Merck

- System obrazowania żeli, BioRad® ChemiDoc™ XRS Imager
- Wirówka, Rotofix 32A, Hettich Zentrifugen
- Instant Imager (Packard Instrument Co.)
- Chromatograf gazowy GC-2010 (Shimadzu) wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny z kolumną CP-WAX 58 CB 60 m × 0.25 mm (Perlan Technologies)
- Komory chromatograficzne (VWR)
- Licznik scyntylicyjny Beckman LS6000TA (Beckman)
- pH metr model FiveEasy (Mettler Toledo)
- Płyta grzewcza Yellow MAG HP 7 z łaźnią piaskową (YellowLine)
- Sonikator Branson MT1800-E (Branson Instruments Company)
- Termoblok Digital HeatBlock (VWR)
- Termomikser Thermomixer Compact 5350 (Eppendorf)
- Ultrawirówka Beckman L-70 (Beckman)
- Waga analityczna XA 60/220/X (Radwag)
- Wirówka Centrifuge 5415 C (Eppendorf)
- Wytrząsarka rotacyjna Incubator Shaker Series G-25 (New Brunswick Scientific)
- Wytrząsarka rotacyjna Innova 40 (New Brunswick Scientific)
- Wytrząsarka typu „Vortex” (neoLab oraz VWR)

3.7 Materiał roślinny

3.7.1 *Jojoba*

Nasiona jojoba (*Simmondsia chinensis*) otrzymano od Johna Dyera i Janet Tanski z Departamentu Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (USDA, United States Department of Agriculture). Nasiona uzyskane były z krzewów pochodzących z czterech różnych akcesji, oznaczonych jako: 144, 145, 146 i 147. Nasiona zważono i podzielono na grupy wagowe

od 400 mg do 1300 mg co 100 mg. Do badań mobilizacji materiałów zapasowych podczas kiełkowania wykorzystywano nasiona o masie około 700 mg.

W celu zapoczątkowania kiełkowania nasiona moczone przez 18 h w wodzie w temperaturze 28 °C. Namoczone nasiona wysadzano do wermikulitu - sztucznej gleby pozbawionej substancji odżywczych i podkiełkowały w fitotronie szafkowym w temperaturze 28 °C przy 16-godzinnym fotoperiodzie (natężenie światła 4500 lx)

Badane nasiona analizowane były w 4, eksperymentalnie określonych stadiach rozwojowych:

- a. stadium 0 - nasiona nieskiełkowane, powietrznie suche, niepoddane imbibicji;
- b. stadium 1 - nasiona skiełkowane, z pękniętą łupiną nasienną i korzeniem długim na 1-3 cm (stadium 1 przypadało na 7. dzień po rozpoczęciu eksperymentu);
- c. stadium 2 - nasiona skiełkowane, pęd z pierwszą parą liści, kilkunastocentymetrowy korzeń (stadium 2 przypadało na 16. dzień po rozpoczęciu eksperymentu);
- d. stadium 3 - nasiono skiełkowane, długi na kilkanaście centymetrów pęd z trzema parami wykształconych liści i z czwartą parą liści rozpoczynającą rozwój, korzeń główny długości kilkudziesięciu centymetrów z dobrze rozwiniętym systemem korzeni bocznych (stadium 3 przypadało na 26. dzień po rozpoczęciu eksperymentu).

3.7.2 *Katran abisyński*

Nasiona katroanu (*Crambe abyssinica*) otrzymano od profesora Stena Stymne ze Szwedzkiego Uniwersytetu Rolniczego w Alnarp. Do badań mobilizacji materiałów zapasowych wykorzystywano nasiona odmiany Mayer.

Nasiona pozbawiano łupiny zewnętrznej i moczone przez noc w wodzie destylowanej. Następnie wykładano je na szalki Petriego (o średnicy 20 cm) wyłożone wilgotną bibułą

i podkiełkowały w ciemności w temperaturze pokojowej. Do analiz pobierano nasiona suche oraz nasiona/liścienie w 3, 6, 10 i 14 dniu od momentu wyłożenia ich na bibułę.

3.7.3 Lnianka

Nasiona lnianki (*Camelina sativa*) odmiany Suneson otrzymano od profesora Edgara Cahoon z Uniwersytetu w Nebrasce. Otrzymano nasiona nietransformowane oraz nasiona transformowane oznaczone symbolem: #3-6-5 (reduktaza kwasów tłuszczowych/ syntaza wosków z jojoba) oraz symbolem #3-4-14 (reduktaza kwasów tłuszczowych/ syntaza wosków z jojoba). Nasiona moczoło przez 12 godzin w wodzie destylowanej i wykładano na szalki Petriego wyłożone zwilżoną bibułą filtracyjną i podkiełkowały w ciemności w temperaturze pokojowej. Nasiona/liścienie pobierano do analiz każdego kolejnego dnia od momentu wyłożenia ich na bibułę - do piątego dnia włącznie. Analizy wykonano również na nasionach suchych (dzień 0).

3.8 Ilościowe i jakościowe oznaczenie zawartości lipidów zapasowych badanych nasion

3.8.1 Ekstrakcja lipidów

Lipidy z nasion jojoba oraz nasion/liścieni lnianki siewnej i nasion/liścieni katanu abisyńskiego ekstrahowały w temperaturze pokojowej według zmodyfikowanej metody Bligh i Dyer (1969). Nasiona jojoba, ze względu na ich wielkość i twardość, cięto na kawałki i homogenizowały w mechanicznym rozdrabniaczu ultraTurrax. Nasiona/liścienie lnianki siewnej i katanu abisyńskiego homogenizowały z 3,75 ml mieszaniny chloroformu i metanolu (1:2; v/v) i 1,25 ml 0,15 M kwasu octowego w szklanym homogenizatorze. Homogenaty przelewowały do probówek szklanych o objętości 12 ml, dodawowały 1,25 ml chloroformu i 1,25 ml wody destylowanej a następnie intensywnie wytrząsowały. Kolejno homogenaty poddawowały wirowaniu (2-5 minut przy prędkości 1400x g) w celu dokładnego oddzielenia warstwy chloroformowej od warstwy metanolowo-wodnej. Następnie warstwy chloroformowe z rozpuszczonymi

lipidami przenoszono do nowych probówek i przechowywano w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do czasu dalszych analiz. W przypadku nasion jojoba ekstrakcję lipidów wykonywano podobnie, lecz używano 3x większych objętości omówionych wyżej odczynników i odpowiednio większe probówki wirówkowe.

3.8.2 Chromatografia cienkowarstwowa

Poszczególne klasy lipidów wyekstrahowanych z nasion jojoba oraz nasion/liścieni lnianki i katanu rozdzielano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Otrzymane ekstrakty chloroformowe odparowywane były w łaźni piaskowej ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$) w strumieniu azotu. Po całkowitym odparowaniu chloroformu, lipidy rozpuszczano ponownie w $50\text{ }\mu\text{l}$ chloroformu i nanoszono na płytkę TLC o wymiarach $10\times 20\text{ cm}$ bądź $20\times 20\text{ cm}$. Fazę stałą stanowił żelem krzemionkowym „SilicaGel 60” (Merck) pokrywający płytki. Fazę rozwijającą stanowiły zazwyczaj kombinacje rozpuszczalników podane poniżej:

- a) w celu rozdzielania niepolarnych frakcji lipidowych: heksan: eter dietylowy: kwas octowy ($70:30:1\text{ v:v:v}$);
- b) w celu rozdzielania lipidów polarnych: chloroform: metanol: kwas octowy: woda ($85:15:10:3,5\text{ v:v:v:v}$).

Po rozdziale płytka była suszona pod wyciągiem w temperaturze pokojowej.

Aby zwizualizować poszczególne klasy lipidów na płytkach TLC, umieszczano je w naczyniu wysyconym parami jodu. Po kilku sekundach płytkę wyjmowano z par jodu, a poszczególne klasy lipidów identyfikowano za pomocą porównania ich lokalizacji z lokalizacją wzorców. Aby ilościowo oznaczyć udział poszczególnych klas lipidów w całkowitym ekstrakcie, płytkę spryskiwano wodą, krzemionkę wraz z poszczególnymi grupami lipidów zdrapywano i przenoszono do osobnych probówek. Następnie, w celu odwodnienia krzemionki, dodawano do tych probówek niewielkie ilości metanolu ($0,1\text{-}0,3\text{ ml}$, w zależności od ilości krzemionki)

który od razu odparowywano (wraz z wodą zawartą w krzemionce) w łaźni piaskowej (45 °C) w strumieniu azotu. Po odparowaniu metanolu lipidy zawarte w żelu krzemionkowym poddawane były transmetylacji, a następnie analizie na chromatografie gazowym.

3.8.3 Chromatografia gazowa

Chloroformowe ekstrakty lipidowe (nie zawierające wosków) odparowywano do sucha w łaźni piaskowej (45 °C) pod strumieniem azotu. Następnie osady zalewano 2 ml mieszaniny metylacyjnej (metanol suszony: 99,999 % kwas siarkowy; 98:2 v:v). Transmetylacja trwała 45 minut i przeprowadzana była w 90 °C w bloku grzewczym Digital Heatblock (VWR). Po wystudzeniu próbek do temperatury pokojowej dodawano do nich określone ilości nmol estru metylowego kwasu heptadekanowego (17:0-Me), 2 ml wody dejonizowanej oraz 3 ml heksanu. Próbki intensywnie mieszano przez około 30 s i wirowano przy prędkości 1400x g. Po wirowaniu przenoszono warstwę heksanową (górną) do nowych probówek; heksan odparowywano w łaźni piaskowej (45 °C) pod parami azotu. Uzyskane estry metylowe kwasów tłuszczowych rozpuszczano w 100 µl heksanu i analizowano na chromatografie gazowym Shimadzu GC-2010, wyposażonym w kolumnę CP-WAX 58 CB 60 m × 0.25 mm (Perlan Technologies) oraz detektor płomieniowo -jonizacyjny (FID).

Próbki (ekstrakty chloroformowe) zawierające woski, oprócz „metylacji” poddawano jeszcze procedurze „derywatywacji”. Po odparowaniu chloroformu próbki tego typu zalewano 2 ml 0,1 M NaOH w suchym metanolu i inkubowano przez 1 godz. w 90 °C (inny rodzaj procedury „metylacji”). Następnie, po dodaniu znanej ilości 17:0-Me, powstałe estry metylowe kwasów tłuszczowych i wolne alkohole tłuszczowe ekstrahowano heksanem (w sposób opisany wyżej, przy procedurze „metylacji” próbek nie zawierających wosków). Heksan odparowywano pod strumieniem azotu, a powstałe osady zalewano 0,15 ml czynnika derywatyzyjnego BSTFA (N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide) i inkubowano 15 min w 70 °C. Powstałe w tym czasie zderywatywowane alkohole tłuszczowe i uzyskane uprzednio

w procesie „metylacji” estry metylowe kwasów tłuszczowych ekstrahowano heksanem (2 ml wody dejonizowanej, 3 ml heksanu, intensywne wytrząsanie, wirowanie). Frakcje heksanowe odparowywano do sucha, a powstałe osady rozpuszczano w znanej niewielkiej ilości heksanu (zazwyczaj 100 μ l) i poddawano analizie na GC (o parametrach podanych wyżej). Zastosowanie procedury „derywatywacji” pozwalało na uzyskiwanie dobrego rozdziału (piki o odpowiednich kształtach) alkoholi tłuszczowych obecnych w woskach lub występujących, jako wolne alkohole tłuszczowe.

Poszczególne estry metylowe kwasów tłuszczowych oraz zderywatywowane alkohole tłuszczowe identyfikowane były na podstawie porównania ich czasów retencji z czasami retencji poszczególnych wzorców, a określanie ich zawartości dokonywane było poprzez porównanie wielkości ich pików z wielkością piku zewnętrznego standardu (17:0-Me). Do analizy uzyskanych wyników używano oprogramowania GC solution Analysis 2.31.00 (LabSolutions).

3.9 Określanie specyficzności substratowej lipaz frakcji mikrosomalnych z kielkujących nasion jojoba, lnianki i katanu

3.9.1 Izolacja frakcji mikrosomalnych

Wszystkie etapy izolacji frakcji mikrosomalnych przeprowadzano w chłodni w temperaturze 4°C. Ze względu na duże rozmiary oraz wysoką twardość, nasiona jojoba w pierwszym etapie cięte były na drobne kawałki skalpelem, umieszczane w buforze ekstrakcyjnym i wstępnie homogenizowane mechanicznym rozdrabniaczem UltraTurrax. Dalsze etapy izolacji frakcji mikrosomalnej były takie same dla wszystkich nasion. Tkanka była rozdrabniana w szklanym homogenizatorze z buforem ekstrakcyjnym (bufor fosforanowy o pH 7,2 zawierający 0,33 M sacharozę, albuminę wołu [1 mg/ml] oraz katalazę [1000 U/ml]). Homogenaty przesączało przez 2 warstwy gazy młynarskiej („Miracloth”) bezpośrednio do probówek wirówkowych

(Beckman) i wirowano w 4 °C najpierw przy 20000x g przez 12 minut (pozbywanie się ścian komórkowych, plastydów, mitochondriów i całych komórek) a następnie (uzyskane w pierwszym wirowaniu supernatanty) przy 100000x g przez 1,5 h w ultrawirówce Beckman L-70-ultracentrifuge (firmy Beckman). Osady zawierające frakcję mikrosomalną przenoszono stalową szpatułką do małych szklanych homogenizatorów i zawieszano w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,2. Tak uzyskane homogenaty frakcji mikrosomalnych przenoszono do probówek Eppendorfa i przechowywano w -80 °C do czasu wykorzystania w dalszych badaniach.

3.9.2 Ilościowe oznaczenie „zagęszczenia” wyizolowanych frakcji mikrosomalnych

„Zagęszczenie” wyizolowanych frakcji mikrosomalnych oznaczano na podstawie określenia zawartości endogennej fosfatydylocholiny (PC) w otrzymanych homogenatach tych frakcji. W tym celu z określonych objętości tych homogenatów ekstrahowano lipidy zmodyfikowaną metodą opisaną przez Bligh i Dyer (1969). Do pobranych porcji tych frakcji (zazwyczaj 30-50 µl) dodawano 3,75 ml mieszaniny chloroformu i metanolu w stosunku 2:1 (v:v). Następnie dodawano 1,25 ml metanolu, 1,25 ml wody dejonizowanej oraz 1,25 ml 0,15 M kwasu octowego. Całość intensywnie mieszano oraz wirowano przy 1400x g. Uzyskane frakcje chloroformowe zawierające lipidy odparowywano w strumieniu azotu w łaźni piaskowej przy 45 °C. Powstałe osady rozpuszczano w 50 µl chloroformu, наносono na płytkę do chromatografii cienkowsarstwowej i rozwijano w układzie rozwijającym „chloroform: metanol: kwas octowy: woda dejonizowana (85:15:10:3,5 v:v:v:v)”. Produkty rozdziału wizualizowano parami jodu, a detekcji endogennej PC dokonywano poprzez porównanie lokalizacji rozdzielonych lipidów z lokalizacją wzorca (zawierającego egzogenną PC). Krzemionkę wraz z mikrosomalną PC zdrapywano i poddawano transmetylacji (p. 3.8.3). Zawartość PC w analizowanej próbce została określona przy pomocy chromatografii gazowej (p. 3.8.3).

3.9.3 Oznaczanie aktywności enzymów zawartych w frakcjach mikrosomalnych w warunkach *in vitro*

3.9.3.1 Przygotowanie frakcji mikrosomalnych do reakcji *in vitro*

Określone objętości frakcji mikrosomalnych (zawierające zazwyczaj 5 nmol endogennej PC) po rozmrożeniu przenoszono do probówek Eppendorfa, ponownie zamrażano i liofilizowano przez noc w liofilizatorze HetoPowerDry LL 3000 (ThermoScientific). Wysuszone frakcje mikrosomalne przeznaczano bezpośrednio po wyjęciu z liofilizatora do wykonania testów określających aktywność i specyficzność substratową lipaz w nich zawartych.

3.9.3.2 Substraty do reakcji *in vitro*

Synteza monoacylogliceroli i diacylogliceroli

Aby uzyskać mieszaninę 1,2-di[1-¹⁴C]oleoilo-sn-glicerolu i 2,3-di[1-¹⁴C]oleoilo-sn-glicerol oraz 2-[1-¹⁴C]oleoilo-sn-glicerol wykorzystano sn-,1,3-specyficzną lipazę pochodzącą z *Rhizopus arrhizus* (Sigma Aldrich) do trawienia [1-¹⁴C]trioleinianu glicerolu ([¹⁴C]18:1-TAG) (Perkin Elmer, Waltham). Pobierano z roztworu wyjściowego 1,5 μmol [¹⁴C]18:1-TAG, odparowywano rozpuszczalnik (łaźnia piaskowa o temp. 45 °C, strumień azotu) i rozpuszczano w 0,5 ml eteru dietylowego. Aby rozpocząć reakcję dodawano 10 U lipazy rozpuszczonej w 1 ml buforu Tris-HCl o pH 7,8. Mieszaninę poddawano intensywnemu mieszaniu przez okres 30 minut w temperaturze pokojowej. Do przerywania reakcji używano 20 μl kwasu octowego (zakwaszenie środowiska reakcji inaktywowało lipazę). W celu ekstrakcji produktów reakcji odparowano eter dietylowy w łaźni piaskowej (45 °C) pod strumieniem azotu a następnie przeprowadzono ekstrakcję lipidów metodą opisaną przez Bligh i Dyer (1969). Produkty reakcji rozdzielano przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej, używając układu rozwijającego „heksan: eter dietylowy: kwas octowy w stosunku 70:30:1 (v:v:v)”. Po rozdziale i wysuszeniu płytki dokonywano wizualizacji produktów reakcji za pomocą elektronicznej

autoradiografii (Instant Imager; Packard Instrument Co.). Fragmenty krzemionki zawierające produkty reakcji ($[^{14}\text{C}]18:1$ - wolny kwas tłuszczowy, sn-2- $[^{14}\text{C}]18:1$ -monoacyloglicerol, sn-1,2- $[^{14}\text{C}]18:1$ -diacyloglicerol łącznie z sn-2,3- $[^{14}\text{C}]18:1$ -diacyloglicerol i $[^{14}\text{C}]18:1$ -triacyloglicerol) zdrapywano z płytki i eluowano zawarte w nich lipidy. W tym celu zdrapane fragmenty krzemionki zalewano 3,75 ml mieszaniny chloroformu i metanolu (1:2, v:v) i poddawano sonikacji przez 15 minut. Po odwirowaniu (1400x g) roztwór przenoszono do nowej probówki a pozostały osad poddawano ponownej elucji (taka sama procedura jak poprzednio). Do uzyskanych roztworów dodawano: 1,25 ml 0,15 M kwasu octowego, 1,25 ml chloroformu i 1,25 ml wody. Całość intensywnie mieszano i poddawano wirowaniu (1400x g) w celu dokładnego rozdzielania się frakcji chloroformowej od frakcji metanolowo-wodnej. Frakcje chloroformowe (uzyskane z dwóch kolejnych elucji danego fragmentu krzemionki) łączono, odparowywano do sucha pod strumieniem azotu i rozpuszczano ponownie w znanej objętości chloroformu. W celu określenia zawartości danego lipidu w uzyskanych eluatach, pobierano porcje tych roztworów i po transmetylacji poddawano analizie za pomocą chromatografii gazowej. Radioaktywność uzyskanych związków określano zaś przy pomocy licznika scyntylicyjnego.

Synteza wosków

Woski wykorzystywane do określania specyficzności substratowej lipaz zawartych w uzyskanych frakcjach mikrosomalnych z badanych nasion, zostały zsyntetyzowane w laboratorium Biochemii Roślin MWB UG i GUMed (w którym wykonywana była obecna praca). Alkohole tłuszczowe potrzebne do syntezy zakupione zostały w firmie Larodan, a znakowane węglem ^{14}C kwasy tłuszczowe w firmie Biotrend (Cologne, Germany). Zakupione $[^{14}\text{C}]$ kwasy tłuszczowe posłużyły do syntezy $[^{14}\text{C}]$ acylo-CoA wykorzystywanych do syntezy $[^{14}\text{C}]$ wosków. Syntezę acylo-CoA przeprowadzono w laboratorium, w którym wykonana była niniejsza praca, zgodnie ze zmodyfikowaną metodą opisaną przez Sánchez i in. (1973).

Zsyntetyzowane zostały następujące typy wosków wykorzystywanych w przeprowadzonych badaniach: nienasycony kwas tłuszczowy:nienasycony alkohol tłuszczowy ($[^{14}\text{C}]18:1-16:1\text{-OH}$, $[^{14}\text{C}]18:1-18:1\text{-OH}$, $[^{14}\text{C}]18:1-18:3\text{-OH}$, $[^{14}\text{C}]18:1-22:1\text{-OH}$, $[^{14}\text{C}]18:1-24:1\text{-OH}$); nasycony kwas tłuszczowy:nienasycony alkohol tłuszczowy ($[^{14}\text{C}]16:0-16:1\text{-OH}$, $[^{14}\text{C}]16:0-18:3\text{-OH}$, $[^{14}\text{C}]16:0-22:1\text{-OH}$, $[^{14}\text{C}]16:0-24:1\text{-OH}$); nasycony kwas tłuszczowy:nasycony alkohol tłuszczowy ($[^{14}\text{C}]16:0-10:0\text{-OH}$, $[^{14}\text{C}]16:0-14:0\text{-OH}$, $[^{14}\text{C}]16:0-16:0\text{-OH}$, $[^{14}\text{C}]16:0-18:0\text{-OH}$, $[^{14}\text{C}]16:0-22:0\text{-OH}$).

Syntezę $[^{14}\text{C}]$ wosków wykonano zgodnie z metodyką podaną przez Miklaszewską i in. (2018). Do syntezy wykorzystano frakcje mikrosomalne z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* transformowanych genem syntazy wosków (MhWS2) sklonowanym z *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* z wykorzystaniem wektora pVT-URA. Odpowiednie porcje wspomnianych frakcji mikrosomalnych poddawano liofilizacji przez około 12 h. Do tak wysuszonych mikrosomów dodawano po 100 nmol odpowiednich alkoholi tłuszczowych rozpuszczonych w 20 μl benzenu. Benzen natychmiast odparowywano pod strumieniem azotu, a mikrosomy zalewano 100 μl buforu fosforanowego (pH 6,7) zawierającego 20 nmol $[^{14}\text{C}]18:1\text{-CoA}$ lub 20 nmol $[^{14}\text{C}]16:0\text{-CoA}$ oraz 0,2 mg albuminy wołu. Inkubację przeprowadzano w termo-mikserze (z funkcją wytrząsania) o temp. 50 °C przez okres 1 h. Inkubację/reakcję syntezy wosków kończono przez dodanie 5 μl lodowatego kwasu octowego, 375 μl mieszaniny chloroform/metanol (1:2; v/v), 125 μl chloroformu i 125 μl wody destylowanej. Po intensywnym wytrząśnięciu i odwirowaniu, frakcje chloroformowe (dolne) przenoszono do probówek szklanych i chloroform odparowywano pod strumieniem azotu (łaznia piaskowa o temp. 45 °C). Osady zalewano 50 μl chloroformu, a uzyskane zatężone ekstrakty rozdzielano na płytkach TLC (silica gel 60) w układzie „heksan:eter di-etylowy: kwas octowy; 70:30:1, v/v/v). Fragmenty żelu zawierające zsyntetyzowane $[^{14}\text{C}]$ woski odzyskiwano z płytki TLC. Woski w nich zawarte eluowano zgodnie z metodyką podaną wyżej (fragment

dotyczący syntezy mono- i di-acylogliceroli). Zawartość wosków w uzyskanych eluatach określano za pomocą licznika scyntylicyjnego wykorzystując dane dotyczące specyficznej radioaktywności [^{14}C]acylo-CoA użytych do ich syntezy.

3.9.4 Przebieg reakcji in vitro określających aktywność i specyficzność badanych lipaz

Do zliofilizowanej frakcji mikrosomalnej dodawano po 20 μl benzenu z rozpuszczonymi substratami reakcji. Benzen natychmiast odparowywano w łaźni piaskowej (45 $^{\circ}\text{C}$) pod strumieniem azotu. Następnie dodawano do próbek po 100 μl buforu reakcyjnego (rodzaj buforu zależał od celów danego doświadczenia i podawany jest pod tabelami i rysunkami obrazującymi uzyskane wyniki) o temperaturze takiej jak temperatura, w której później prowadzona była reakcja. Inkubacje prowadzono w urządzeniu Eppendorf Thermomixer Compact (blok grzewczy z wytrząsaniem), wytrząsając próbki z prędkością 1250 rpm. Aby zakończyć reakcję, do próbek dodawano 375 μl mieszaniny chloroform:metanol (2:1; v:v), 5 μl stężonego kwasu octowego, 125 μl chloroformu oraz 125 μl wody dejonizowanej. Mieszaniny energicznie mieszano przez 30 s, następnie wirowano przy 1400x g. Po zakończeniu wirowania warstwy chloroformowe przenoszono do nowych próbek, zagęszczano i rozdzielano na płytkach TLC (układ rozwijający: „heksan: eter dietylowy: kwas octowy”, 70:30:1; v:v:v). Rozdzielone produkty reakcji wizualizowano oraz określano ilościowo stosując technikę elektronicznej autoradiografii przy pomocy Instant Imager (Packard Instrument Co.). Przy identyfikacji produktów reakcji oraz określaniu ich ilości posługiwano się wzorcami znakowanymi węglem ^{14}C (o znanej radioaktywności) analizowanymi chromatograficznie łącznie z rozdzielanymi produktami przeprowadzonych reakcji.

3.9.5 Synteza wosków przeprowadzana przez enzymy zawarte we frakcjach mikrosomalnych z kiełkujących nasion badanych roślin oleistych

Do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z kiełkujących nasion badanych roślin oleistych (czas podkiełkowania podany w opisie odpowiednich tabel) dodawano rozpuszczone w 19 μ l benzenu substraty do reakcji – między innymi wolny kwas tłuszczowy, znakowany radioaktywnie oraz wolny alkohol tłuszczowy (inne substraty wykazane zostały w odpowiednich tabelach). Po odparowaniu benzenu dodawano 100 μ l buforu inkubacyjnego (rodzaj buforu podano w opisie odpowiednich tabel) lub tegoż buforu zawierającego dodatkowo 20 μ M tetrahydrolipstatynę (inhibitor lipaz) lub 7 mM DTNB (związek wiążący wolny CoA i blokujący tym samym powstawanie acylo-CoA). Inkubację przeprowadzano w termo-mikserze z wstrząsaniem (1250 rpm). Czas i temperaturę inkubacji podano w opisie odpowiednich tabel. Reakcję kończono w identyczny sposób jak to podano w p. 3.8.4. Identyfikację i oznaczenie zawartości produktów reakcji wykonywano również zgodnie opisem podanym w tym punkcie.

We wszystkich doświadczeniach dotyczących badanych lipaz, w których wyniki ich aktywności podawano w przeliczeniu na mg białka mikrosomalnego, stosowano przelicznik: 1 nmol mikrosomalnej fosfatydylocholiny = 4,4 μ g białka mikrosomalnego.

3.10 Oznaczanie zawartości białek rozpuszczalnych

3.10.1 Izolacja białek rozpuszczalnych z nasion jojoba

Do izolacji białek wykorzystywano nasiona będące w tych samych stadiach rozwojowych, co nasiona wykorzystywane do izolacji lipidów. Pojedyncze nasiona, pozbawione łupiny nasiennej (poza stadium 0, kiedy to łupinę pozostawiano) krojono skalpelem na drobne kawałki i dodawano do 20 ml buforu ekstrakcyjnego (0,1M Tris/HCl, 1% SDS, 1mM DTT, pH 6,8).

Rozdrobnione nasiona homogenizowano mechanicznym rozdrabniaczem UltraTurrax i wirowano przy 1400x g przez 5 minut. Procedurę tę powtarzano trzykrotnie, ostatnie wirowanie wydłużając do 10 minut. Z otrzymanych supernatantów pobierano 1,5 ml porcje (nie pobierając osadu lipidowego) i przechowywano w -20 °C do czasu przeprowadzenia dalszych analiz. Białka z frakcji mikrosomalnych uzyskanych z kiełkujących nasion jojoba ekstrahowano zaś z osadów uzyskanych po 20 minutowym wirowaniu frakcji mikrosomalnych zawierających około 100 nmol endogennego PC przy 14000 rpm (wirówka przystosowana do wirowania probówek Eppendorfa o pojemności 1,5 ml). Osady ucierano z 0,1 ml buforu ekstrakcyjnego za pomocą teflonowych tłoczków dostosowanych do 1,5 ml probówek Eppendorfa. Po utarciu ekstrakty wirowano przez 10 minut, a uzyskane supernatanty przenoszono do nowych probówek i przechowywano w -20 °C do czasu przeprowadzenia dalszych analiz.

3.10.2 Ilościowa analiza wyizolowanych białek rozpuszczalnych

Zawartość wyizolowanych białek rozpuszczalnych oznaczano metodą spektrofotometryczną, korzystając z zestawu Pierce BCA Protein Assay (ThermoScientific). Z odpowiednio rozcieńczonych ekstraktów białkowych pobierano po 50 µl, i przenoszono do 15 ml probówek szklanych. Do probówek tych dodawano następnie po 50 µl 0,5% SDS. Po intensywnym wymieszaniu kolejno dodawano do nich po 2 ml świeżo zmieszanego odczynnika BCA (odczynnik A z odczynnikiem B zmieszany wg instrukcji producenta) i inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37 °C z wytrząsaniem. Po inkubacji wykonywano pomiary spektrofotometryczne przy długości fali $\lambda = 562$ nm. Uzyskane pomiary absorbancji przeliczano następnie na stężenie białka wykorzystując krzywą wzorcową wykonaną dla albuminy wołowej (w zakresie stężeń 200-1000 µg/ml) równocześnie z analizowanymi próbkami.

3.10.3 Analiza oleozyn kielkujących nasion jojoba oraz frakcji mikrosomalnych wyizolowanych z tych nasion metodą immunoblotingu.

Pierwszym etapem w przeprowadzanej analizie było rozdzielenie badanych ekstraktów białkowych metodą elektroforetyczną. Do rozdziału wykorzystywano gotowe żele poliakrylamidowe NuPAGE firmy Novex. Z ekstraktów białkowych przeznaczonych do rozdziału pobierano porcje zawierające 300 µg białka i uzupełniano wodą destylowaną do 75 µl, a następnie dodawano po 25 µl „4xNuPAGE LDS Sample buffer”. Tak przygotowane ekstrakty przechowywano przez noc w 4 °C lub bezpośrednio przynoszono do rozdzielnic. Przed naniesieniem na żel, z ekstraktów pobierano po 20 µl i inkubowano 10 min w 70 °C w celu denaturacji zawartych w nich białek. Po wystudzeniu, próbki наносono na żel (10 µl/studzienka; 30 µg białka) i rozwijano przez około 50 min aż niebieski barwnik znalazł się 0,5 cm od końca żelu. Rozdział prowadzono przy napięciu 200V, stosując „1xNuPAGE MOPS SDS”, jako górny i dolny bufor rozwijający. Po wykonanym rozdziale, żel z rozdzielonymi białkami przenoszono do komory transferowej wyłożonej gąbką zwilżoną buforem transferowym (1x NuPAGE Transfer Buffer) i przykrytą bibułą filtracyjną namoczona tymże buforem. Kolejno, na żel nakładano zwilżoną buforem transferowym membranę nitrocelulozową, przykrywano ją zwilżoną bibułą filtracyjną i zwilżonymi gąbkami w ilości dopasowanej do wielkości komory transferowej. Po umieszczeniu tak przygotowanej komory transferowej w aparacie do elektroforezy zalewano ją buforem transferowym, a na zewnątrz komory nalewno wodę destylowaną w celu chłodzenia komory podczas transferu białek z żelu na membranę nitrocelulozową. Transfer prowadzono przez 60 min pod napięciem 30V (elektroda dodatnia umieszczona była od strony membrany).

Po zakończeniu transferu, membranę przenoszono do odpowiedniego naczynia i płukano dwukrotnie przez 15 min 50 ml buforu TBS. Tak przygotowaną membranę zalewano 20 ml 1% roztworu „Western Blocking Reagent” w TBS i inkubowano przez noc w 4 °C

delikatnie wstrząsając. Celem tej operacji było wypełnienie wolnych przestrzeni membrany białkami pochodzącymi z dodanego odczynnika. Następnego dnia membranę płukano trzykrotnie po 15 min na wolnoobrotowej wytrząsarce z 50 ml buforu TBS. Po zakończeniu płukania, membranę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę z pierwotnymi przeciwciałami specyficznymi dla oleozyn owsa (5 μ l przeciwciał rozpuszczonych w 50 ml 0,5% „Western Blocking Reagent” w TBS) na wolnoobrotowej wytrząsarce. Po zakończonej inkubacji membranę poddawano płukaniu na wolnoobrotowej wytrząsarce; 2 razy po 15 minut z 50 ml buforu TBST, następnie 2 razy z 50 ml 0,5% roztworu „Western Blocking Reagent” w TBS. Tak przygotowaną membranę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut z wtórnymi przeciwciałami królika znakowanymi peroksydazą (2 μ l przeciwciał wtórnych rozpuszczone w 20 ml 0,5% roztworu „Western Blocking Reagent” w TBS; wytrząsarka wolnoobrotowa). Po zakończeniu inkubacji membranę płukano czterokrotnie po 15 minut z 50 ml buforu TBST.

Wizualizację oleozyn przeprowadzano w BioRad® ChemiDoc™ XRS Imager. Membranę przygotowaną tak jak opisano powyżej umieszczano w powyższym urządzeniu i pokrywano ją świeżo przygotowaną mieszaniną chemiluminescencyjną (2,5 ml odczynnika A z dodatkiem 25 μ l odczynnika B; „BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit)”, Roche). Luminescencja była szczytywana przez 30 min. Obrazy membran z uwidacznionymi w postaci ciemnych prążków oleozynami zostały następnie przetworzone na odpowiednie zdjęcia.

3.11 Oznaczanie zawartości węglowodanów

3.11.1 Oznaczanie zawartości węglowodanów w kielkujących nasionach jojoba

Do oznaczeń całkowitej zawartości węglowodanów (glukoza, skrobia, reszta α -glukanów) w nasionach jojoba użyto zestawu Total Starch Kit (Megazyme), wykorzystujący metodę „amyloglucosidase/ α -amylase”, opisaną przez McCleary i in. (1997). Nasiona jojoba

w stadiach 0 - 3 (0, 7, 16 i 26 dzień podkiełkowania) macerowano w ciekłym azocie (oprócz stadium „0” pozbawione były łupiny nasiennej). Sproszkowaną tkankę suszono przez 24 h w 80 °C, a następnie przechowywano w temperaturze pokojowej do czasu przeprowadzenia analizy.

3.11.1.1 Oznaczanie całkowitej zawartości α -glukanów i glukozy

Do 50 g sproszkowanej tkanki dodawano 100 μ l 80% etanolu i energicznie mieszano. Kolejno dodawano 1,5 ml buforu MOPS z α -amylazą (p. 3.1.VII). Po dodawaniu enzymu mieszaninę energicznie mieszano. Inkubacja przeprowadzana była w temperaturze 100 °C przez 6 minut; co minutę próbki mieszano. W kolejnym etapie (po ostudzeniu mieszaniny), do próbek dodawano po 2 ml buforu octanowego z amyloglukozydazą (p. 3.1.VII). Całość energicznie wytrząsano i przenoszono do nowej łaźni wodnej. Inkubacja prowadzona była w 50 °C przez 30 minut. Po zakończeniu inkubacji próbki wirowano przy 1400x g przez 10 minut. Supernatanty z nad osadu przenoszono do próbek miarowych, a osady zalewano 5 ml buforu octanowego (p. 3.1.VII). Energicznie wytrząsano i wirowano przy 1400x g przez 10 minut. Uzyskane supernatanty przenoszono do próbek z supernatantami z pierwszego wirowania, uzupełniano wodą dejonizowaną do 10 ml i intensywnie mieszano.

Aby wykonać pomiary zawartości glukozy w uzyskanych roztworach, pobierano po 0,1 ml ich objętości i dodawano do 3 ml odczynnika GOPOD (p. 3.5). Próbę ślepią przygotowywano, dodając do 3 ml odczynnika GOPOD 0,1 ml wody dejonizowanej, a w próbie kontrolnej – 100 μ g glukozy w 0,1 ml wody dejonizowanej. Tak przygotowane roztwory inkubowano w łaźni wodnej w 50 °C przez 20 minut. Po inkubacji odczytywano wyniki poprzez pomiar spektrofotometryczny przy długości fali $\lambda = 510$ nm. Uzyskane wartości absorbancji podstawiano do równania, pozwalającego oznaczyć procentową zawartość badanych cukrów w suchej masie badanych nasion:

$$S = \Delta A \times F \times 100 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180;$$

gdzie:

S - procentowy udział badanego cukru w suchej masie badanych nasion;

ΔA - absorbancja próby w odniesieniu do próby ślepej;

F - współczynnik konwersji absorbancji na μg ($100 \mu\text{g}$ glukozy/absorbancja próby ślepej);

100 - korekta objętości (pobrane 0,1 ml z 10 ml);

1/1000 - przeliczenie μg na mg;

W - masa proszku pobranego do analizy w mg;

162/180 - korekta ilości wolnej glukozy do anhydro - glukozy (składnika skrobi).

3.11.1.2 *Oznaczanie zawartości skrobi i glukozy*

Do oznaczenia zawartości skrobi i glukozy w nasionach jojoba z wcześniej przygotowanych sproszkowanych wysuszonych nasion pobierano po 50 mg proszku i przenoszono do szklanych probówek. Tkanę inkubowano z 2,5 ml 80% etanolu w 85 °C przez 5 minut. Probówki energicznie mieszano i dodawano kolejne 2,5 ml 80% etanolu, intensywnie mieszano i poddawano wirowaniu przy 1400 g przez 10 minut. Supernatanty przenoszono do nowych probówek, a osady zalewano 5 ml 80% etanolu. Po energicznym mieszaniu probówki ponownie wirowano przy 1400x g przez 10 minut. Uzyskane supernatanty przenoszono do poprzednio uzyskanych supernatantów i uzupełniano do 10 ml wodą dejonizowaną, po czym mieszano. Supernatanty te zawierały wolną glukozę i krótkołańcuchowe α -glukanów wyekstrahowane etanolem z badanego materiału. Ilość glukozy określano zgodnie z instrukcją zawartą

w podpunkcie 3.11.1.1; krótkołańcuchowe α -glukanów mimo obecności w ekstraktach nie dawały reakcji barwnej. Aby oszacować ilość skrobi, osady z których wyekstrachowano wolną glukozę i krótkołańcuchowe α -glukanów, zalewano 1,5 ml buforu z α -amylazą (p. 3.5) i dalej postępowano zgodnie z protokołem opisanym w punkcie 3.11.1.1. Po określeniu zawartość wolnej glukozy i zawartości skrobi w badanych próbkach, ilości te odejmowano od całkowitej zawartości α -glukanów (w tym skrobi) i glukozy określoną w punkcie 3.11.1.1. Różnicę uznawano, jako zawartość krótkołańcuchowych α -glukanów (innych niż cząsteczki skrobi) w badanych próbkach.

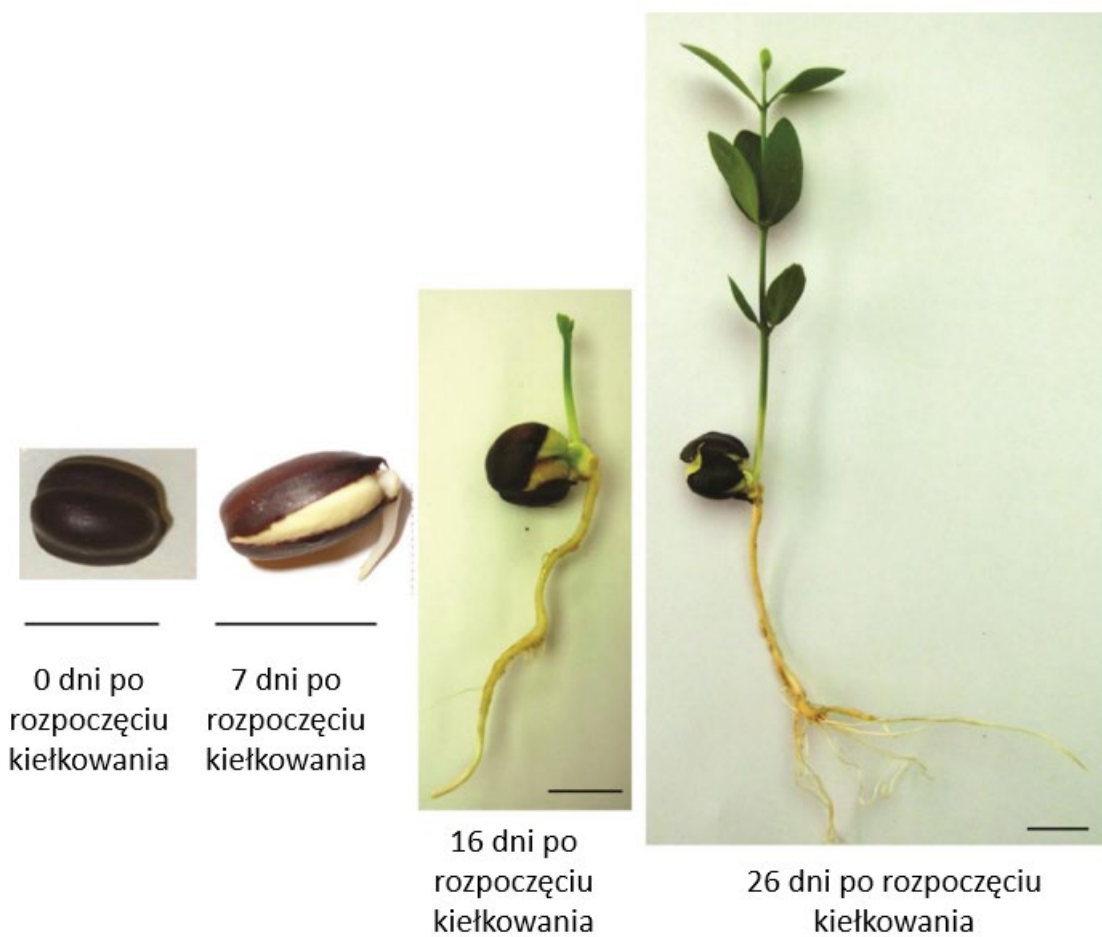
4 WYNIKI

4.1 Jojoba (*Simmondsia chinensis*)

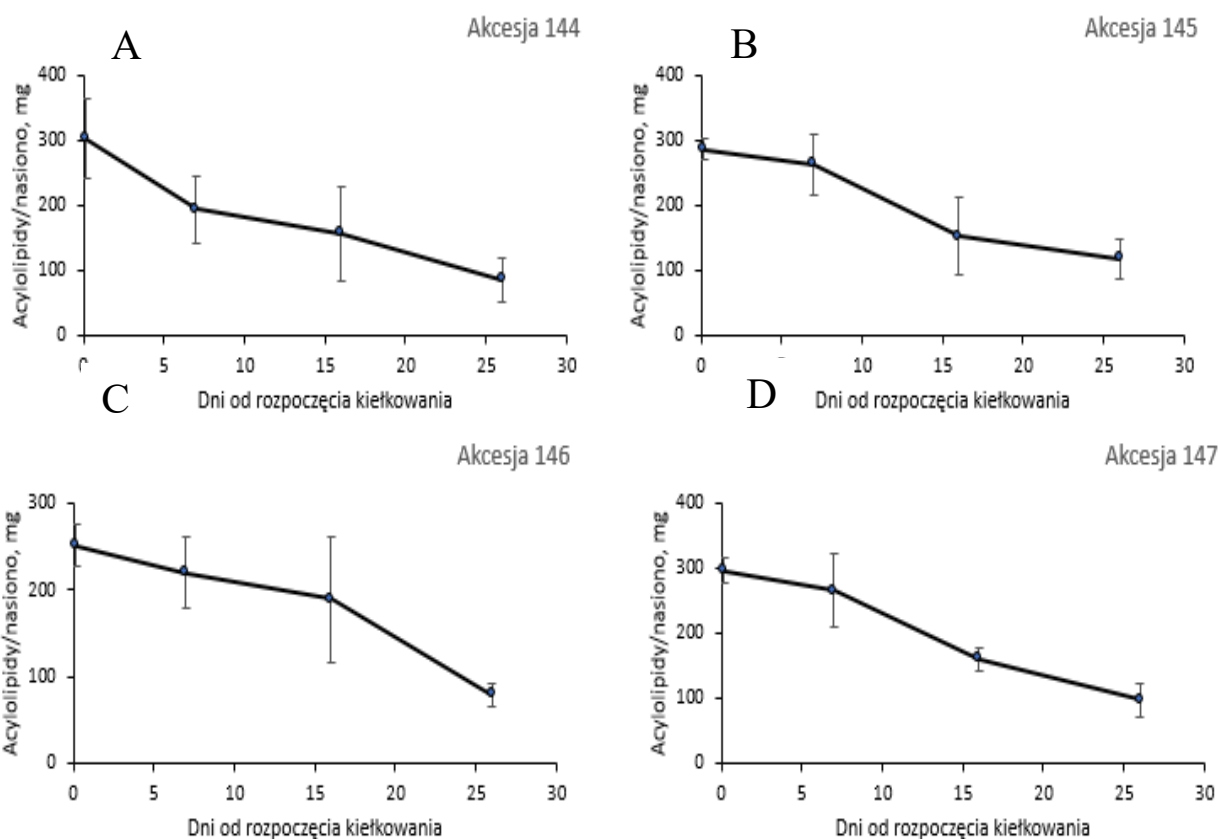
4.1.1 Mobilizacja materiałów zapasowych nasion jojoba podczas kiełkowania

Badania dotyczyły zmian zawartości lipidów, białek i cukrowców zachodzące podczas kiełkowania nasion jojoba (*Simmondsia chinensis*). Analizy zawartości białek i cukrowców wykonane zostały we współpracy z Szymonem Stelter, ówczesnym magistrantem Zakładu.

Nasiona jojoba pochodzące z czterech różnych akcesji (144, 145, 146, 147) podkiełkowały przez okres 26 dni (**Rycina 6**), podczas których monitorowano za pomocą techniki GC-FID zmiany w zawartości ich acylolipidów. Uzyskane tą techniką ilości μmol kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych występujące w acylolipidach analizowanych nasion przeliczano następnie na miligramy stosując przelicznik: $1 \mu\text{mol} = 0,32 \text{ mg}$ (średnia masa $1 \mu\text{mol}$ występujących w analizowanych ekstraktach kwasów i alkoholi tłuszczowych). W nasionach pochodzących ze wszystkich czterech akcesji, podczas pierwszych 26 dni kiełkowania, zawartość acylolipidów ulegała zmniejszeniu o około 60-70% (**Rycina 7**). Dynamika mobilizacji acylolipidów była zróżnicowana w obrębie analizowanych akcesji. Najbardziej znaczący spadek zawartości acylolipidów w przypadku akcesji 144 obserwowano w pierwszym tygodniu kiełkowania (**Rycina 7A**), zaś w przypadku akcesji 145 i 147 pomiędzy 7. a 16. dniem od rozpoczęcia kiełkowania (**Rycina 7B, D**). W przypadku akcesji 146, największy spadek w zawartości acylolipidów następował jeszcze później – pomiędzy 16. a 26. dniem od rozpoczęcia kiełkowania (**Rycina 7C**).

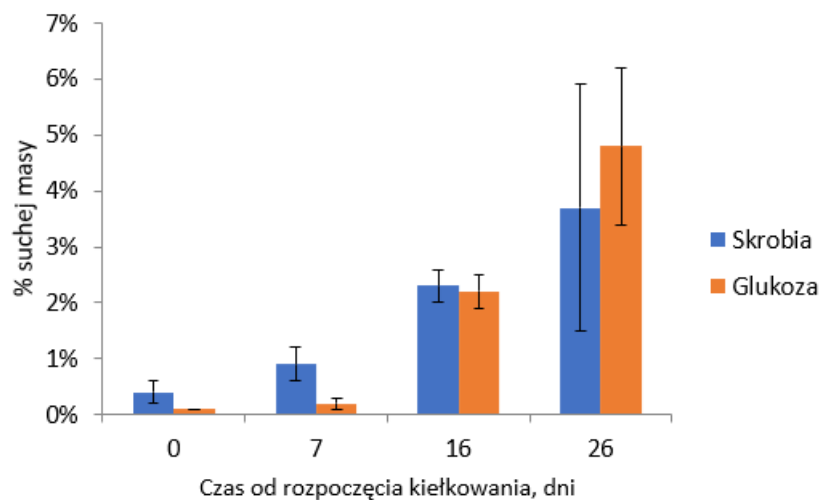


Rycina 6. Różne stadia kiełkowania nasion jojoba. Ciągła czarna linia na dole każdej z fotografii odpowiada długości 1 cm.

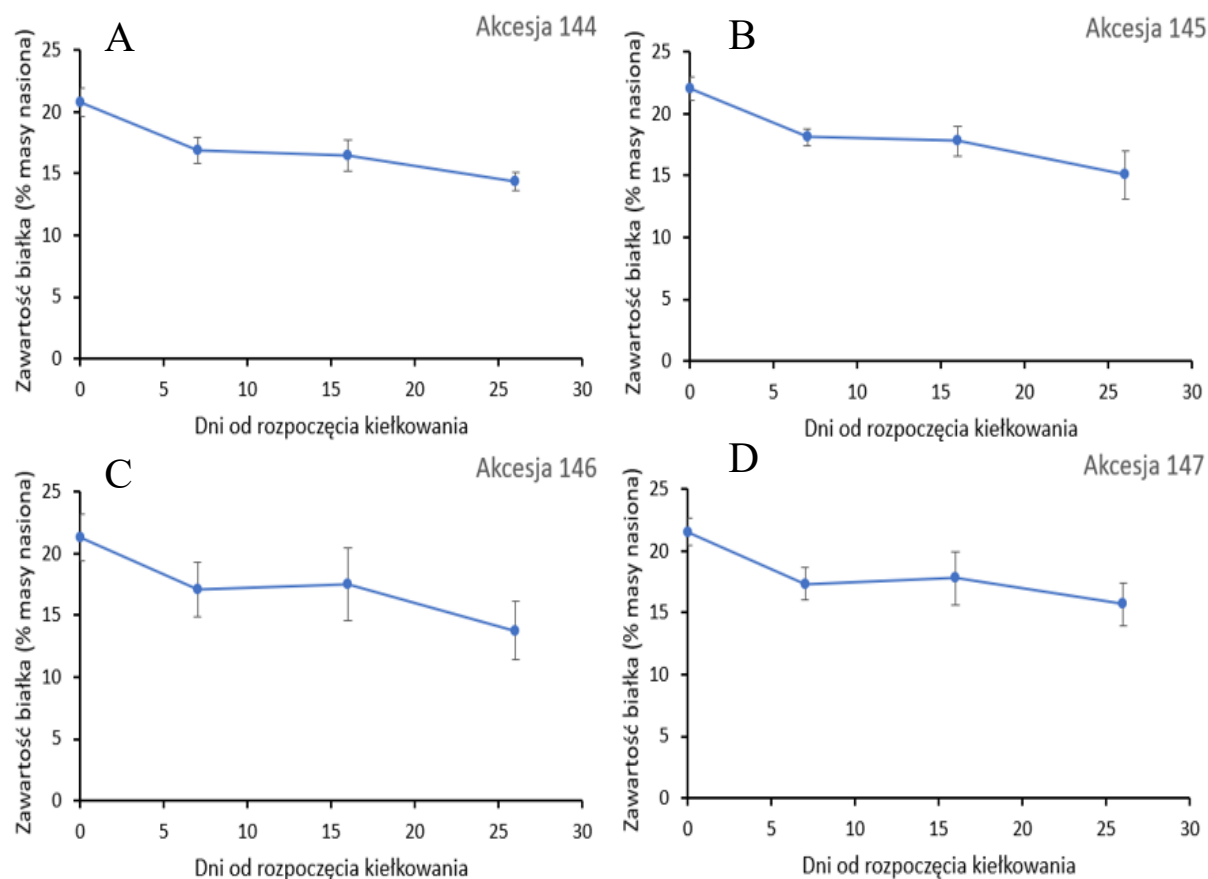


Rycina 7. Zmiany zawartości acylolipidów w nasionach jojoba pochodzących z akcesji 144 (A), 145 (B), 146 (C) oraz 147 (D) podczas kiełkowania. Na wykresach przedstawiono wartości średnie z 4 powtórzeń biologicznych \pm odchylenie standardowe.

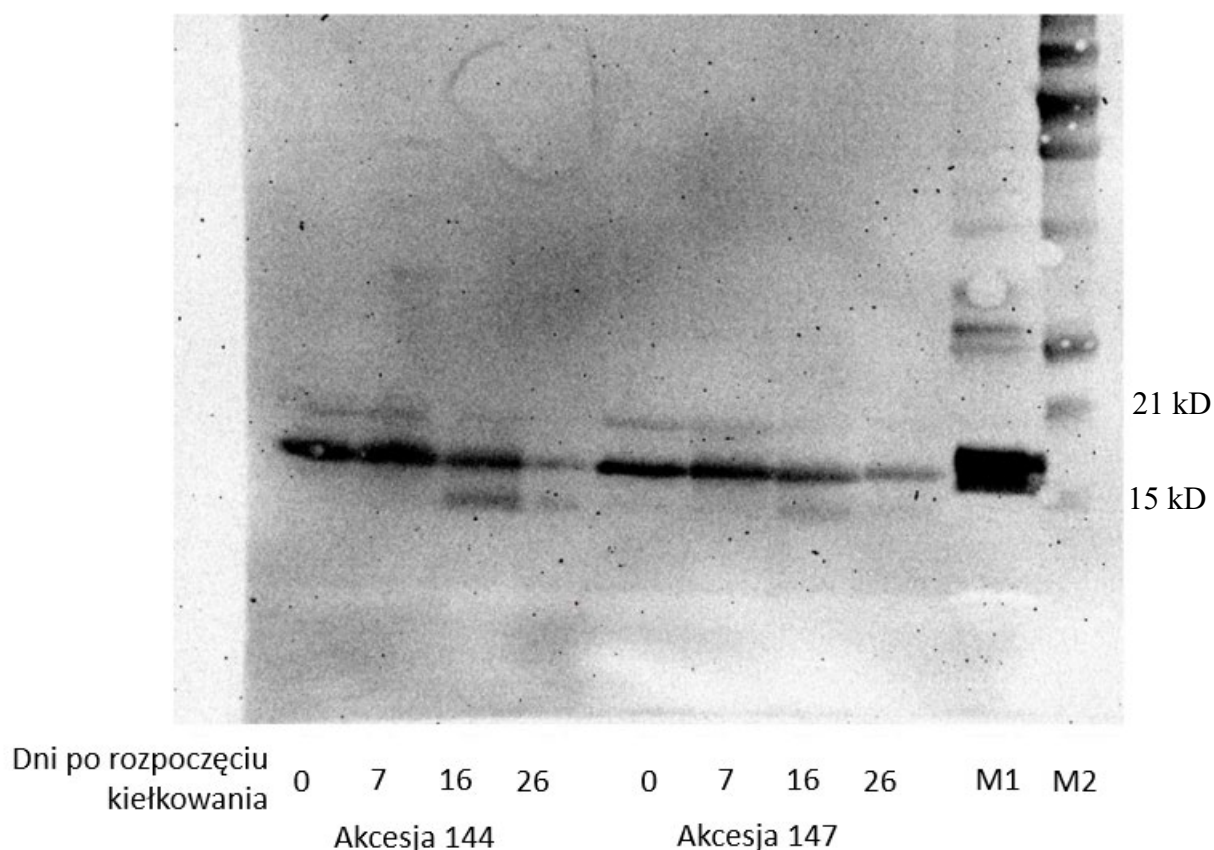
Mobilizacji acylolipidów w procesie kiełkowania towarzyszył wzrost zawartości cukrów: glukozy i skrobi (**Rycina 8**) oraz spadek ogólnej zawartości białek (**Rycina 9**). Początkowa zawartość białek w nasionach wynosiła przeciętnie 21% masy nasion. W trakcie kiełkowania zmniejszała się zaś o około 15% we wszystkich badanych akcesjach. Mobilizacja białek następowała głównie w przeciągu pierwszego tygodnia kiełkowania (**Rycina 9**). Zmiany zachodzące w zawartości poszczególnych grup białek podczas procesu kiełkowania nie były dalej poddawane szczegółowym analizom, oprócz zmian zachodzących w zawartości oleozyn, specjalnej grupy białek związanych z membraną otaczającą ciała tłuszczowe. Wykazano w nich, że ogólna zawartość oleozyn w ekstraktach białkowych izolowanych z kiełkujących nasion zmniejszała się począwszy od 7. dnia kiełkowania nasion, najintensywniej pomiędzy 16. a 26. dniem kiełkowania (**Rycina 10**).



Rycina 8. Zmiany zawartości skrobi i glukozy w kiełkujących nasionach jojoba. Badania wykonano na nasionach akcesji 147. Na wykresach przedstawiono wartości średnie z 4 powtórzeń biologicznych \pm odchylenie standardowe.

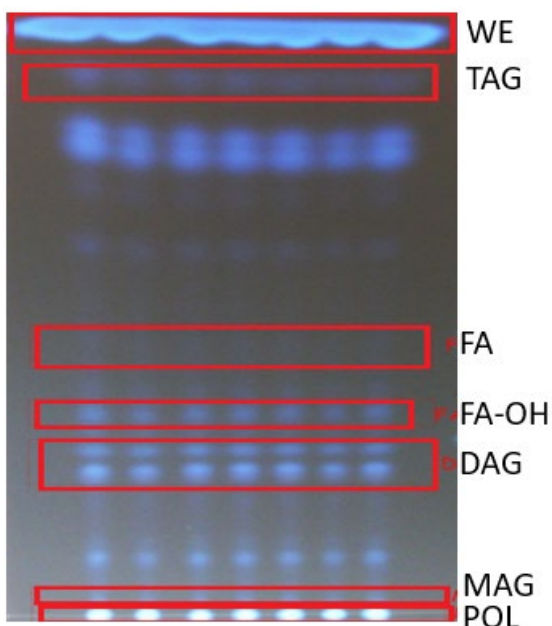


Rycina 9. Zmiany zawartości białka w kiełkujących nasionach jojoba. Na wykresach pokazano zmiany zawartości białka względem całkowitej początkowej masy nasion pochodzących z akcesji 144 (A), 145 (B), 146 (C) oraz 147 (D) podczas kiełkowania. Na wykresach przedstawiono wartości średnie, z co najmniej 4 powtórzeń biologicznych \pm odchylenie standardowe.



Rycina 10. Analiza zawartości oleozyn w ekstraktach białkowych z kiełkujących nasion jojoba. Immunobloting wykonano wykorzystując przeciwciała specyficzne dla oleozyn owsa. M1: ekstrakt z kukurydzy, M2: marker białkowy

Analiza składu acylolipidów w nasionach jojoba z czterech badanych akcesji wykazała, że dominującą klasą lipidów są woski, których zawartość wynosiła, w zależności od akcesji, od 95% do 98% wszystkich wyizolowanych lipidów. Zawartość innych typów lipidów była znikoma. Lipidy polarne stanowiły około 1 do 2% frakcji lipidowej, triacyloglicerole – od 0,4 do 1%, wolne kwasy tłuszczowe – od 0,3 do 1% i wolne alkohole – od 0,2% do 1% w zależności od analizowanej akcesji i przeprowadzonego rozdziału (przykładowy chromatogram przedstawiono na **Rycinie 11**). Ponieważ analiza składu frakcji lipidowej nasion jojoba nie była jednym z głównych celów obecnej pracy, uzyskane wyniki nie zostały poddane dokładnej analizie statystycznej; zaprezentowano jedynie wartości w obrębie, których mieściła się zawartość poszczególnych klas lipidów.



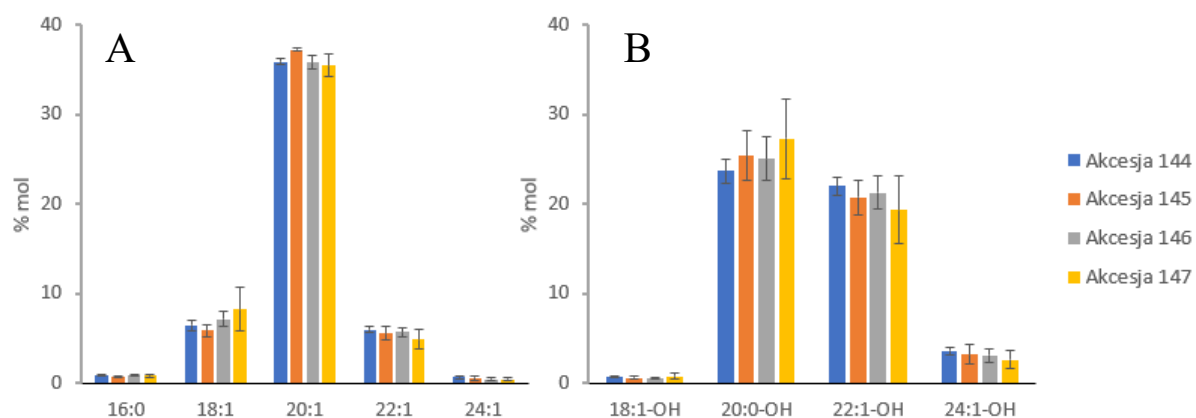
Rycina 11. Przykładowy chromatogram z wybarwionymi lipidami po rozdziale ekstraktów chloroformowych z niekiełkujących nasion jojoba metodą chromatografii cienkowarstwowej w układzie „obojętnym” (heksan:eter dietylowy:kwas octowy; 70:30:1). WE, woski; TAG, triacyloglicerole; FA, wolne kwasy tłuszczowe; FA-OH, alkohole tłuszczowe; DAG, diacyloglicerole; MAG, monoacyloglicerole; POL, lipidy polarne

W lipidach nasion wszystkich badanych akcesji dominującymi kwasami tłuszczowymi były: kwas eikozenowy (20:1; około 36% całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych), kwas oleinowy (18:1; około 7%), kwas erukowy (22:1; około 6%), kwas palmitynowy (16:0; około 0.8%) oraz kwas nerwonowy (24:1; około 0.5%) (**Tabela 2, Rycina 12A**). Wśród alkoholi tłuszczowych w największej ilości występowały: alkohol arachidylowy (20:1-OH; około 25% całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych), alkohol erukowy (22:1-OH; około 21%), alkohol lignocerylowy (24:1-OH; około 3%) oraz alkohol oleinowy (18:1-OH; 0.7%) (**Tabela 2, Rycina 12B**).

Tabela 2. Względna zawartość głównych kwasów tłuszczowych (FA) i alkoholi tłuszczowych (FA-OH) w lipidach dojrzałych nasion jojoba (% całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych)

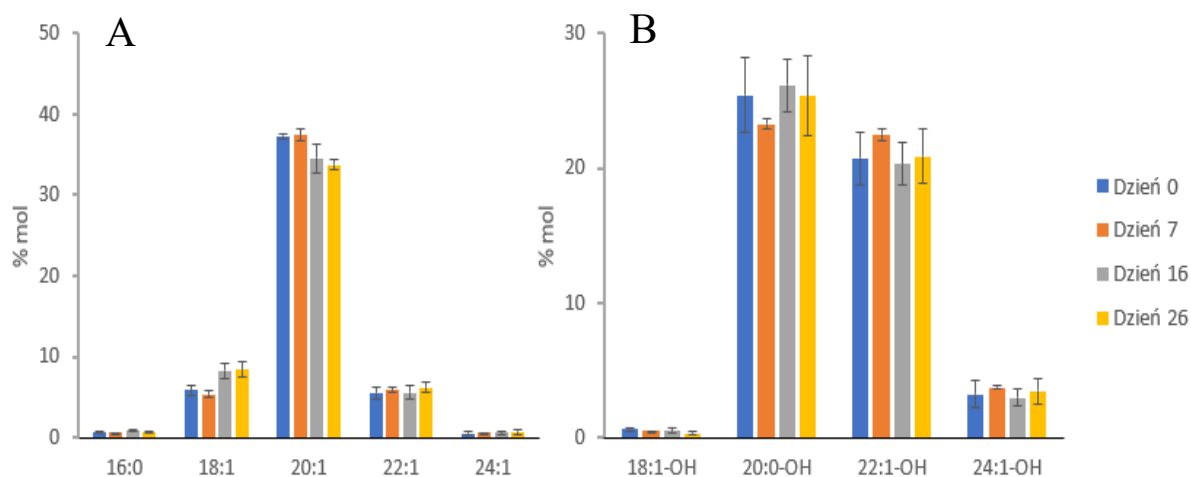
FA/FA-OH	Akcesja 144	Akcesja 145	Akcesja 146	Akcesja 147
16:0	0,93 ± 0,08	0,68 ± 0,12	0,88 ± 0,12	0,85 ± 0,20
18:1	6,50 ± 0,57	5,89 ± 0,65	7,14 ± 0,86	8,29 ± 2,38
20:1	35,90 ± 0,39	37,25 ± 0,23	35,83 ± 0,74	35,49 ± 1,31
22:1	6,02 ± 0,29	5,60 ± 0,72	5,71 ± 0,51	4,93 ± 1,14
24:1	0,65 ± 0,15	0,58 ± 0,20	0,45 ± 0,16	0,45 ± 0,20
18:1-OH	0,72 ± 0,07	0,62 ± 0,14	0,55 ± 0,11	0,79 ± 0,35
20:1-OH	23,67 ± 1,37	25,41 ± 2,82	25,08 ± 2,47	27,27 ± 4,46
22:1-OH	22,01 ± 1,06	20,74 ± 1,92	21,24 ± 1,84	19,34 ± 3,78
24:1-OH	3,61 ± 0,43	3,23 ± 1,04	3,13 ± 0,75	2,60 ± 1,03

Wyniki przedstawiają wartości średnie z czterech powtórzeń biologicznych ± odchylenie standardowe. Pełne nazwy kwasów i alkoholi tłuszczowych podano w tekście powyżej i w wykazie skrótów.



Rycina 12. Skład kwasów tłuszczowych (**A**) i alkoholi tłuszczowych (**B**) nasion jojoba z różnych akcesji. Na wykresach przedstawiono względną zawartość głównych kwasów tłuszczowych oraz alkoholi tłuszczowych we frakcji lipidów dojrzałych nasion jojoba (% całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych). Przystawiono wartości średnie z 4 powtórzeń biologicznych \pm odchylenie standardowe. Pełne nazwy kwasów i alkoholi tłuszczowych podano w tekście powyżej i w wykazie skrótów.

Profil zmian we względnej zawartości kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych podczas 26 dni kiełkowania nasion jojoba był podobny dla wszystkich analizowanych akcesji (**Tabela S1**). Graficznie, przykładowy zestaw wyników przedstawiono dla akcesji 145 (**Rycina 13**). W przypadku wszystkich akcesji, podczas kiełkowania zaobserwowano znaczący spadek zawartości kwasu eikozenowego (20:1) oraz wzrost zawartości kwasu oleinowego (18:1; **Tabela S1**; **Rycina 13A**). Względna zawartość pozostałych kwasów tłuszczowych (**Tabela S1**; **Rycina 13A**) oraz alkoholi tłuszczowych (**Tabela S1**; **Rycina 13B**) była względnie stała podczas 26 dni kiełkowania.



Rycina 13. Zmiany składu kwasów tłuszczowych (A) i alkoholi tłuszczowych (B) lipidów nasion jojoba podczas kiełkowania. Na wykresach przedstawiono względną zawartość głównych kwasów tłuszczowych oraz alkoholi tłuszczowych we frakcji lipidów kiełkujących nasion jojoba (% całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych). Przetawiono wartości średnie z 4 powtórzeń biologicznych (akcesja 145) \pm odchylenie standardowe. Pełne nazwy kwasów i alkoholi tłuszczowych podano w wykazie skrótów.

4.1.2 Aktywność lipaz we frakcjach mikrosomalnych z kiełkujących nasion jojoba

W związku z tym, że geny kodujące lipazy nasion jojoba nie zostały jeszcze sklonowane, nie można było poddać analizie zmian w ekspresji genów kodujących te enzymy podczas kiełkowania nasion. W projekcie zdecydowano, więc że analizie poddana będzie aktywność tych enzymów na różnych etapach kiełkowania nasion. Do badania aktywności lipaz wykorzystano frakcje mikrosomalne wyizolowane z nasion jojoba w różnych stadiach ich kiełkowania. We wstępnych badaniach przeanalizowano aktywność lipaz w mikrosomach wyizolowanych w dniu rozpoczęcia kiełkowania oraz 14, 35 i 50 dni później. Jako substraty wykorzystano znakowane węglem [^{14}C] woski ([^{14}C]WE), znakowane węglem [^{14}C] triacyloglicerole ([^{14}C]TAG) oraz znakowane węglem [^{14}C] lipidy polarne ([^{14}C]PC i [^{14}C]PE; tylko w testach z mikrosomami wyizolowanymi w 35. dniu kiełkowania). Na bardzo wczesnych etapach kiełkowania, aktywność lipaz badana w stosunku do tri-[^{14}C]18:1-TAG oraz 20:1-OH-[^{14}C]18:1-WE była znikoma, a następnie ulegała zwiększeniu wraz z rozwojem procesu kiełkowania, osiągając najwyższą aktywność w późnych etapach tego procesu, tj. po 35 i 50 dniach od rozpoczęcia kiełkowania (**Tabela 3**). Zaobserwowano ponadto wzrost zawartości oleozyn (białek związanych cząstkami tłuszczowymi) we frakcjach mikrosomalnych pomiędzy 7. a 26. dniem kiełkowania (**Rycina 14**). Do dalszych badań związanych z charakterystyką biochemiczną lipaz kiełkujących nasion jojoba wykorzystywano frakcje mikrosomalne z późniejszych etapów kiełkowania nasion, charakteryzujące się wysoką aktywnością lipaz.

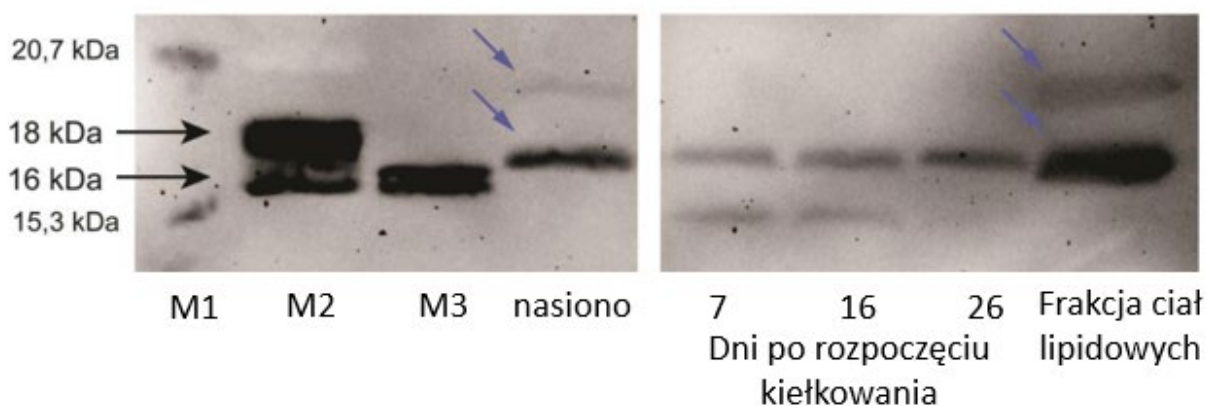
W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono zaś żadnej aktywności badanych lipaz w stosunku do sn-1-18:1-sn-2-[^{14}C]18:1-PC i w stosunku do sn-1-18:1-sn2-[^{14}C]18:1-PE; nie odnotowano uwalniania [^{14}C]18:1 z pozycji sn-2 tych lipidów (**Tabela 3**).

Tabela 3. Aktywność lipaz we frakcjach mikrosomalnych wyizolowanych z nasion jojoba w różnym stadium kiełkowania

Dodany substrat (1 nmol/reakcja)	% dodanej radioaktywności we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych			
	Czas kiełkowania			
	0 dni	14 dni	35 dni	50 dni
Tri-[¹⁴ C]18:1- TAG	Ilości śladowe	6,2 ± 0,7	44,8 ± 4,4	67,3 ± 4,2
20:1-OH- [¹⁴ C]18:1-WE	Ilości śladowe	2,2 ± 0,7	11,7 ± 2,5	18,5 ± 1,0
Sn-1-18:1-sn2- [¹⁴ C]18:1-PC	-	-	0,0	-
Sn-1-18:1-sn2- [¹⁴ C]18:1-PE	-	-	0,0	-

Wyniki przedstawiają wartość średnią z czterech do sześciu (w przypadku lipidów polarnych n = 2) powtórzeń biologicznych ± odchylenie standardowe.

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z kiełkujących nasion jojoba substraty dodawano rozpuszczone w 19 µl benzenu; benzen odparowano i dodano 100 µl 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,2); inkubowano przez 15 minut w 35 °C.



Rycina 14. Analiza „immunoblot” zawartości oleozyn we frakcjach mikrosomalnych wyizolowanych z nasion jojoba (akcesja 147) w różnych stadiach kiełkowania. M1: marker białkowy, M2: oleozyny z kukurydzy, M3: oleozyny z owsa, nasiono: kompletny ekstrakt białkowy z dojrzałych nasion jojoba. Frakcja ciał lipidowych: wyizolowana z dojrzałych nasion jojoba. Liczby po lewej stronie wskazują położenie markerów białkowych. Czarnymi strzałkami oznaczono dwie izoformy oleozyn z kukurydzy. Niebieskie strzałki wskazują dwie izoformy oleozyn jojoba (o masie około 17 kDa i 19,5 kDa).

4.1.3 Charakterystyka biochemiczna lipaz kiełkujących nasion jojoba

4.1.3.1 Wysycenie reakcji hydrolizy

Po ustaleniu w badaniach wstępnych, że porcje frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion jojoba, zawierające 2,5 nmol endogenego PC, są odpowiednie do testów charakteryzujących badane lipazy, wykonano doświadczenia mające na celu określenie ilości egzogenego substratu wysycającego reakcje hydrolizy, w testach z takimi porcjami frakcji mikrosomalnych. Badania rozpoczęto od testów z 1 nmol, 5 nmol, 10 nmol i 20 nmol tri- $[^{14}\text{C}]18:1\text{-TAG}$ /test. Inkubacje prowadzono w 35 °C przez okres 5 minut. Wykazano w nich, że ilość uwolnionych $[^{14}\text{C}]18:1\text{-FA}$ zwiększała się do 20 nmol $[^{14}\text{C}]18:1\text{-FA}$ /test (**Tabela S2**). W badaniach dotyczących liniowości reakcji w czasie wykazano, że reakcja zachodziła najszybciej w czasie pierwszych 2,5 minut, a później jej intensywność ulegała zmniejszeniu, szczególnie po 5 minutach inkubacji (**Tabela S3**). W dalszych testach, ilości egzogenego substratu (tri- $[^{14}\text{C}]18:1\text{-TAG}$) zwiększono do 35 nmol/test (10 do 35 nmol), a czas inkubacji

skrócono do 2,5 minut. Wykazano w nich, że ilość uwalnianych [^{14}C]18:1-FA zwiększała się jedynie przy zwiększaniu ilości egzogennej tri- ^{14}C]18:1-TAG do 20 nmol/test. Dalsze zwiększanie egzogennej substratu nie zwiększało już ilości uwalnianych kwasów tłuszczowych (**Tabela 4**). Ilość tą uznano więc za ilość [^{14}C]TAG wysycającą reakcję.

Tabela 4. Wpływ ilości egzogennej tri- ^{14}C]18:1-TAG na ilość zhydrolizowanych kwasów tłuszczowych w testach z taką samą ilością frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion jojoba

Zhydrolizowany [^{14}C]18:1 (nmol/test)					
Tri- ^{14}C]18:1-TAG (nmol/test)					
10	15	20	25	30	35
2,0 ^a ± 0,1	4,5 ^a ± 0,6	6,3 ± 0,2	5,7 ± 0,5	5,9 ± 1,6	6,6 ± 0,5

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, $n \geq 2$. ^a – statystycznie istotna różnica pomiędzy testami z dodatkiem 20 nmol [^{14}C]TAG a testami z dodatkiem pozostałych ilości [^{14}C]TAG w dwustronnym teście różnic średnich przy $\alpha = 0,05$

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholino) wyizolowanych z nasion jojoba w 35. dniu kiełkowania, substrat ([^{14}C]TAG) dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,2); inkubację przeprowadzano przez 2,5 minuty w 35 °C.

Badania dotyczące wysycenia reakcji katalizowanej przez lipazy kiełkujących nasion jojoba, zawarte w porcjach frakcji mikrosomalnych zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholino (PC), w stosunku do egzogenicznie dodanego wosku, wykonano już w zoptymalizowanych warunkach. Jako bufor inkubacyjny zastosowany został 0,1 M HEPES (pH 7), a temperatura inkubacji wynosiła 60 °C. Do testów wykorzystano 18:1-OH- ^{14}C]18:1-WE. Dodawano go w ilościach: 2,5 nmol, 5 nmol, 10 nmol, 20 nmol i 30 nmol/test. Ilość zhydrolizowanych kwasów tłuszczowych wzrastała wraz z ilością dodawanego wosku aż do 20 nmol/test. Zwiększenie tej ilości do 30 nmol/test nie skutkowało już dalszym zwieszeniem uwalnianych kwasów tłuszczowych (**Tabela 5**). Efekt ten zaobserwowano we wszystkich testowanych czasach inkubacji. Uznano więc, że wysycenie reakcji hydrolizy

egzogenego wosku następuje przy około 20 nmol/test. Najszybsza hydroliza dodanego wosku (przy wszystkich dodawanych jego ilościach) występowała w pierwszych 1,5 minutach inkubacji. Po tym czasie intensywność hydrolizy malała, szczególnie po 2,5 inkubacji, jednakże przebiegała dalej tylko z nieco zmniejszoną szybkością (co najmniej do 10 minut inkubacji; **Tabela 5**).

Tabela 5. Wpływ ilości egzogennej 18:1-OH-[¹⁴C]18:1-WE na ilość zhydrolizowanych kwasów tłuszczowych w testach z taką samą ilością frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion jojoba

Czas inkubacji (minuty)	Zhydrolizowany [¹⁴ C]18:1 (nmol/test)				
	18:1-OH-[¹⁴ C]18:1-WE (nmol/test)				
	2,5	5	10	20	30
1,5	0,15 ^a ± 0,01	0,5 ^a ± 0,06	0,93 ^a ± 0,06	1,35 ± 0,05	1,29 ± 0,03
2,5	0,24 ^a ± 0,02	0,74 ^a ± 0,06	1,14 ^a ± 0,06	1,61 ± 0,09	1,47 ± 0,15
5	0,37 ^a ± 0,05	0,90 ^a ± 0,02	1,68 ^a ± 0,12	2,39 ± 0,03	2,49 ± 0,63
10	0,57 ^a ± 0,03	1,45 ^a ± 0,03	2,23 ^a ± 0,08	3,94 ± 0,22	4,02 ± 0,45

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n ≥ 2. ^a – statystycznie istotna różnica pomiędzy testami z dodatkiem 20 nmol [¹⁴C]WE, a testami z dodatkiem pozostałych ilości [¹⁴C]WE w dwustronnym teście różnic średnich przy α = 0,05

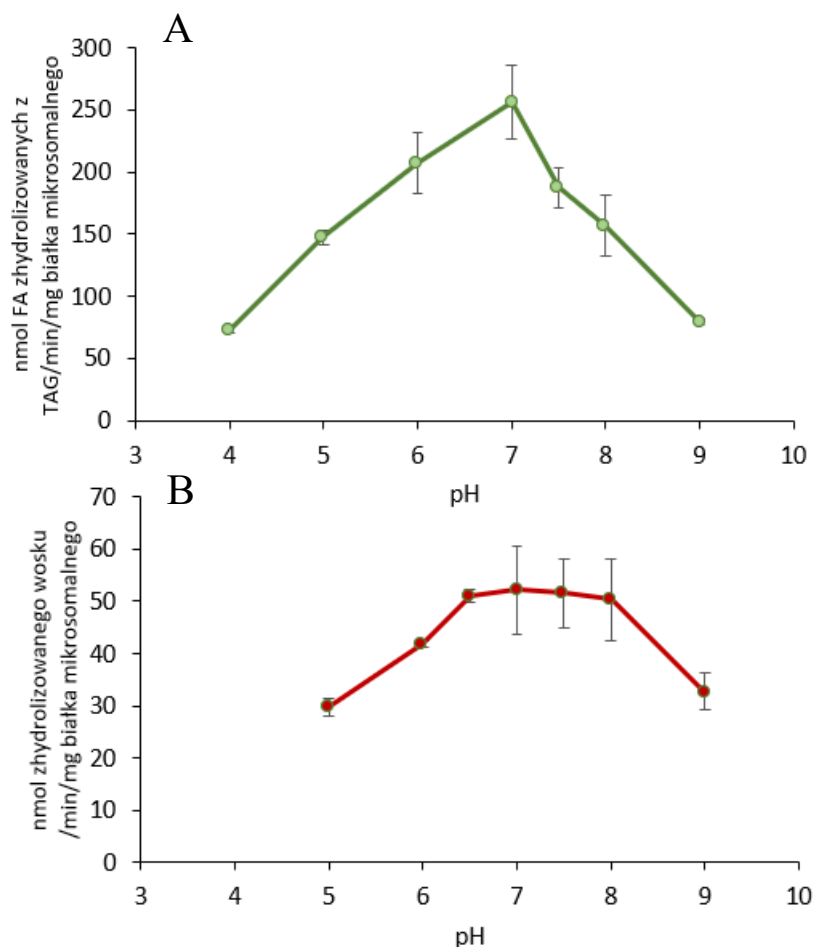
Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholino) wyizolowanych z nasion jojoba w 35. dniu kiełkowania, substrat ([¹⁴C]WE) dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,0); inkubację przeprowadzano w 60 °C.

4.1.3.2 Wpływ pH na aktywność lipaz kiełkujących nasion jojoba

Przy badaniu wpływu pH na aktywność lipaz kiełkujących nasion jojoba zastosowano: bufor cytrynianowy (pH 4,0-5,0), bufor fosforanowy (pH 6,0-8,0) i bufor Tris-HCl (pH 9,0). Reakcje prowadzono w 35°C przez okres 5 minut z wykorzystaniem porcji frakcji mikrosomalnych zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholino (PC). Aktywność lipaz nasion jojoba w stosunku do tri-[¹⁴C]18:1-TAG odnotowano dla wszystkich zastosowanych w testach wartości pH tj. od pH 4 do pH 9. Aktywność ta była najniższa w zastosowanych skrajnych wartościach pH i wynosiła około 25% aktywności maksymalnej odnotowanej dla pH 7. Pomiędzy pH 4 a pH 7 następował stopniowy wzrost aktywności lipaz

w stosunku do zastosowanego substratu, a pomiędzy pH 7 a pH 9 stopniowy spadek tej aktywności (**Rycina 15A**).

W przypadku stosowanego w przeprowadzonych testach wosku (18:1-OH-[¹⁴C]18:1), jako substratu dla badanych lipaz kiełkujących nasion jojoba, nie odnotowano jednego pH, które byłoby optymalne dla aktywności badanych enzymów. W tym przypadku najwyższą (podobną) aktywność lipaz stwierdzono przy wartościach pH w zakresie od 6,5 do 8,0 (**Rycina 15B**). Przy wartościach skrajnych pH, w testach z egzogennym woskiem, tj. pH 5 i pH 9, aktywność testowanych lipaz wynosiła około 60% ich aktywności maksymalne. Przy pH 5 była to podobna redukcja aktywności lipaz do tej odnotowanej w testach [¹⁴C]TAG. Przy pH 9 była to jednak mniejsza redukcja aktywności niż w analogicznych testach z [¹⁴C]TAG.



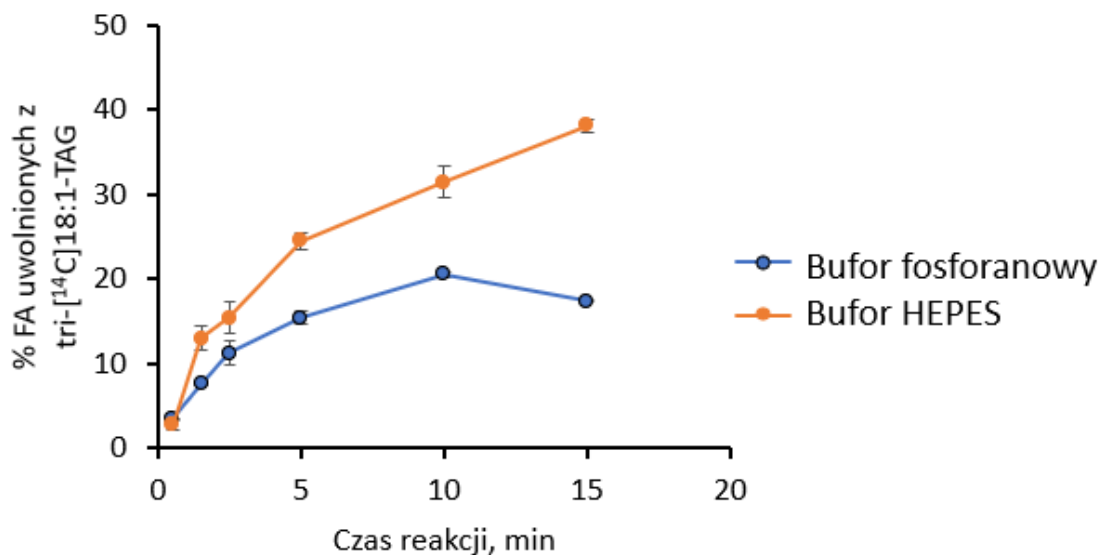
Rycina 15. Wpływ pH na aktywność lipaz z nasion jojoba w stosunku do triacyloglicerolu (tri- $[^{14}\text{C}]18:1\text{-TAG}$) (**A**) i wosku ($18:1\text{-OH-}[^{14}\text{C}]18:1$) (**B**). Na wykresach przedstawiono wartości średnie \pm odchylenie standardowe, $n \geq 2$. FA, kwas tłuszczowy

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion jojoba w 35. dniu kiełkowania, substraty (20 nmol/test) dodawano rozpuszczone w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu inkubacyjnego; inkubację przeprowadzano przez 5 minut w 35 $^{\circ}\text{C}$. Jako bufor inkubacyjny stosowano: bufor cytrynianowy (pH 4,0-5,0), bufor fosforanowy (pH 6,0-8,0) i bufor Tris-HCl (pH 9,0). Przy przeliczaniu aktywności na mg białka mikrosomalnego stosowano przelicznik: 1 nmol mikrosomalnej fosfatydylocholiny = 4,4 μg białka mikrosomalnego.

4.1.3.3 Wpływ buforu inkubacyjnego oraz jonów dwuwartościowych na aktywność lipaz kiełkujących nasion jojoba

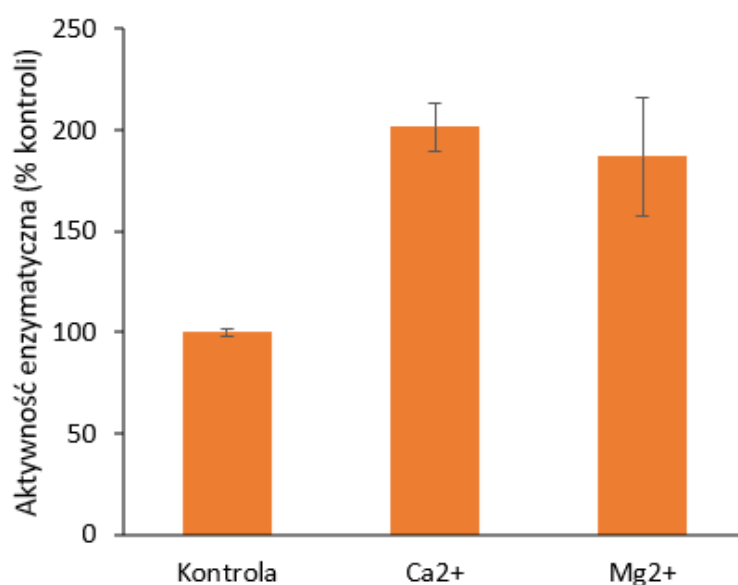
Ponieważ w wykorzystywanym w badaniach wstępnym buforze fosforanowym, nie można rozpuścić jonów wapnia ani jonów magnezu (fosforany tych jonów ulegają wytrąceniu), przed rozpoczęciem badań dotyczących wpływu jonów Mg^{2+} oraz Ca^{2+} na aktywność lipaz

kiełkujących nasion jojoba, sprawdzono wpływ dwu różnych buforów inkubacyjnych na aktywność tych enzymów. Porównano aktywność lipaz kiełkujących nasion jojoba w środowisku 0.1 M buforu fosforanowego (pH 7) oraz 0.1 M buforu HEPES (pH 7), w którym z powodzeniem można rozpuszczać jony wapnia i magnezu. Inkubację przeprowadzono w temperaturze 60 °C, ponieważ w badaniach wstępnych z wykorzystaniem 0,1 mM buforu fosforanowego (pH 7,2) aktywność lipaz w stosunku do [¹⁴C]TAG wzrastała aż do tej temperatury inkubacji (**Tabela S4**). Wykazano, że aktywność hydrolizy tri-¹⁴C]18:1-TAG (mierzona ilością uwalnianych [¹⁴C]18:1-FA) katalizowana przez lipazy kiełkujących nasion jojoba była wyższa w buforze HEPES w porównaniu do tejże hydrolizy w środowisku buforu fosforanowego (**Rycina 16**). W konsekwencji, w części dalszych badań, tj. tych dotyczących wpływu temperatury na aktywność badanych lipaz, dotyczących specyficzności substratowej tych enzymów, oraz do badań wpływu jonów wapnia i magnezu na ich aktywność wykorzystywano bufor HEPES. W badaniach dotyczących wpływu wspomnianych jonów wykazano, że dodatek do mieszaniny reakcyjnej kationów dwuwartościowych: Mg²⁺ oraz Ca²⁺ skutkowało około 2-krotnym zwiększeniem aktywności badanych lipaz (**Rycina 17**).



Rycina 16. Wpływ zastosowanego bufora inkubacyjnego na przebieg hydrolizy tri- ^{14}C 18:1-TAG (mierzonej ilości uwalnianych ^{14}C 18:1-FA) Na wykresach przedstawiono wartości średnie \pm odchylenie standardowe, $n \geq 2$. FA, kwas tłuszczowy; TAG, triacyloglicerol

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion jojoba w 35. dniu kiełkowania, substrat (20 nmol tri- ^{14}C 18:1-TAG/test) dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu fosforanowego lub 0,1 M buforu HEPES (pH obu buforów = 7,0); inkubację przeprowadzano w 60 $^{\circ}\text{C}$.



Rycina 17. Wpływ jonów dwuwartościowych na aktywność lipaz kiełkujących nasion jojoba. Jako substrat zastosowano tri-^[14C]18:1-TAG. Aktywność mierzono ilością uwalnianych ^[14C]18:1-FA. Kontrolę stanowiła aktywność lipaz w testach z buforem inkubacyjnym (0,1 M HEPES, pH 7) bez dodatku jonów. Na wykresach przedstawiono wartości średnie ± odchylenie standardowe (n ≥ 2), jako procent średniej aktywności kontroli. FA, kwas tłuszczowy; TAG, triacyloglicerol

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion jojoba w 35. dniu kiełkowania, substrat (20 nmol tri-^[14C]18:1-TAG/test) dodawano rozpuszczony w 19 µl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 µl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,0) bez żadnych dodatków (kontrola) oraz z dodatkiem 5 mM CaCl₂ lub z dodatkiem 5 mM MgCl₂; inkubacje przeprowadzano przez 5 minut w 60 °C.

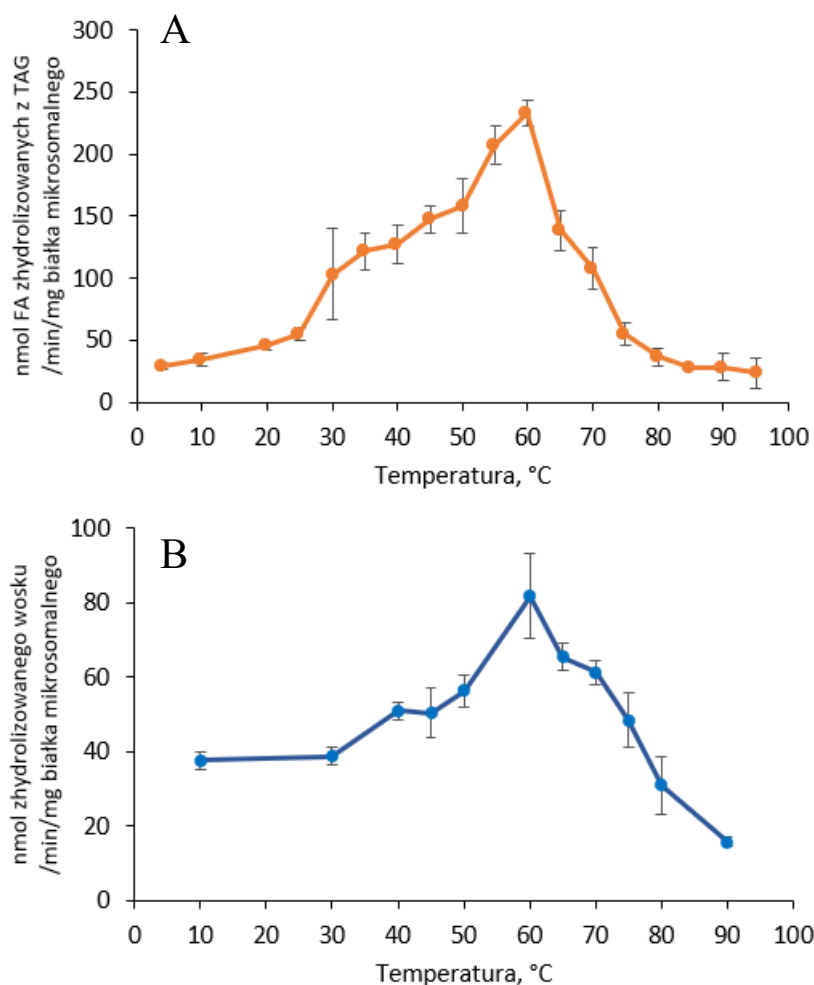
4.1.3.4 Wpływ temperatury na aktywność lipaz kiełkujących nasion jojoba

Po wykazaniu, że aktywność lipaz kiełkujących nasion jojoba w testach *in vitro* jest wyższa przy zastosowaniu buforu HEPES jako buforu inkubacyjnego, właściwe badania dotyczące wpływu temperatury na ich aktywność wykonano przy zastosowaniu już tego buforu (badania wstępne były wykonane przy zastosowaniu buforu fosforanowego; **Tabela S4**). Wykazano w nich, że lipazy kiełkujących nasion jojoba obecne we frakcjach mikrosomalnych charakteryzują się wysoką odpornością, zachowując swoje właściwości enzymatyczne w szerokim zakresie temperatur (**Rycina 18**). Przy wzroście temperatury reakcji od 4 °C do 60 °C obserwowano stopniowy wzrost aktywności lipaz wobec tri-^[14C]18:1-TAG.

Dalszy wzrost temperatury do 90 °C skutkował obniżeniem aktywności enzymatycznej o około 70% w porównaniu do aktywności maksymalnej odnotowanej dla temperatury 60 °C (**Rycina 18A**).

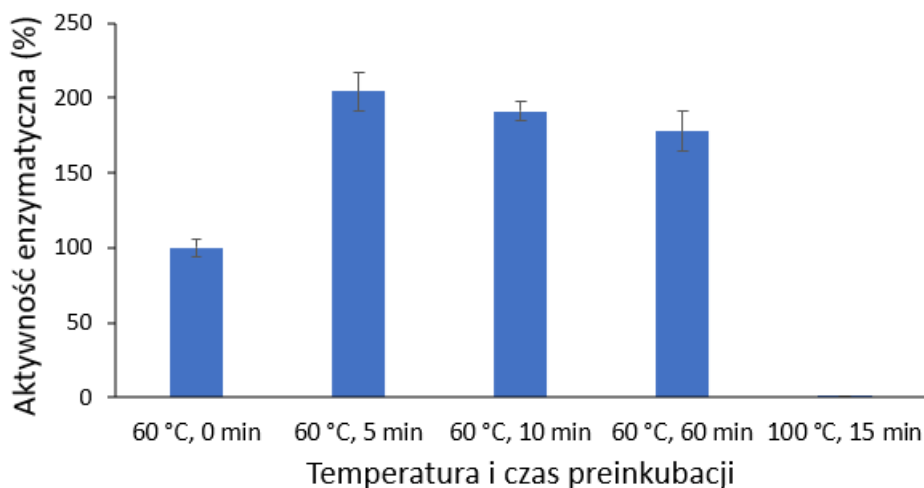
W przypadku wosku 18:1-OH-[¹⁴C]18:1, aktywność enzymatyczna lipaz w 10 °C (najniższej z badanych w tym przypadku temperatur) wynosiła około 50% aktywności maksymalnej (**Rycina 18B**) i była porównywalna (w wartościach bezwzględnych) do aktywności lipaz odnotowanej w tej temperaturze wobec tri-[¹⁴C]18:1-TAG. Wzrost temperatury inkubacji do 60 °C wywoływał podwojenie tej aktywności i był on relatywnie mniejszy niż odnotowany wzrost aktywności badanych lipaz wobec tri-[¹⁴C]18:1-TAG (w tym ostatnim przypadku wzrost aktywności był około 6-krotny). Dalszy wzrost temperatury inkubacji do 90 °C powodował spadek aktywności enzymatycznej w stosunku do zastosowanego wosku o około 80% w porównaniu do aktywności maksymalnej.

Dodatkowo zaobserwowano, że preinkubacja wysuszonych mikrosomów z dodanym substratem (tri-[¹⁴C]18:1-TAG) w temperaturze 60 °C w okresie czasu do 1 h przed rozpoczęciem testów aktywności enzymatycznej (tj. przed dodaniem do mikrosomów buforu inkubacyjnego) skutkowała istotnym zwiększeniem aktywności enzymatycznej lipaz (**Rycina 19**). Przeprowadzenie preinkubacji mikrosomów przez okres 5 minut było wystarczające, aby obserwować około 2-krotny wzrost aktywności enzymatycznej. Preinkubacja w temperaturze 100 °C przez 15 minut skutkowała dezaktywacją lipaz (obserwowano całkowity brak aktywności enzymatycznej; **Rycina 19**).



Rycina 18. Wpływ temperatury na aktywność lipaz kiełkujących nasion jojoba w stosunku do tri- $[^{14}\text{C}]18:1\text{-TAG}$ (**A**) i wosku $18:1\text{-OH-}[^{14}\text{C}]18:1$ (**B**). Na wykresach przedstawiono wartości średnie \pm odchylenie standardowe, $n \geq 2$. FA, kwas tłuszczowy; TAG, triacyloglicerol

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion jojoba w 35. dniu kiełkowania, substraty (20 nmol/ test) dodawano rozpuszczone w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,0); inkubację przeprowadzano przez 2,5 (testy z TAG) lub 1,5 (testy z egzogennym woskiem) minuty w odpowiednich temperaturach. Przy przeliczaniu aktywności na mg białka mikrosomalnego stosowano przelicznik: 1 nmol mikrosomalnej fosfatydylocholiny = 4,4 μg białka mikrosomalnego.

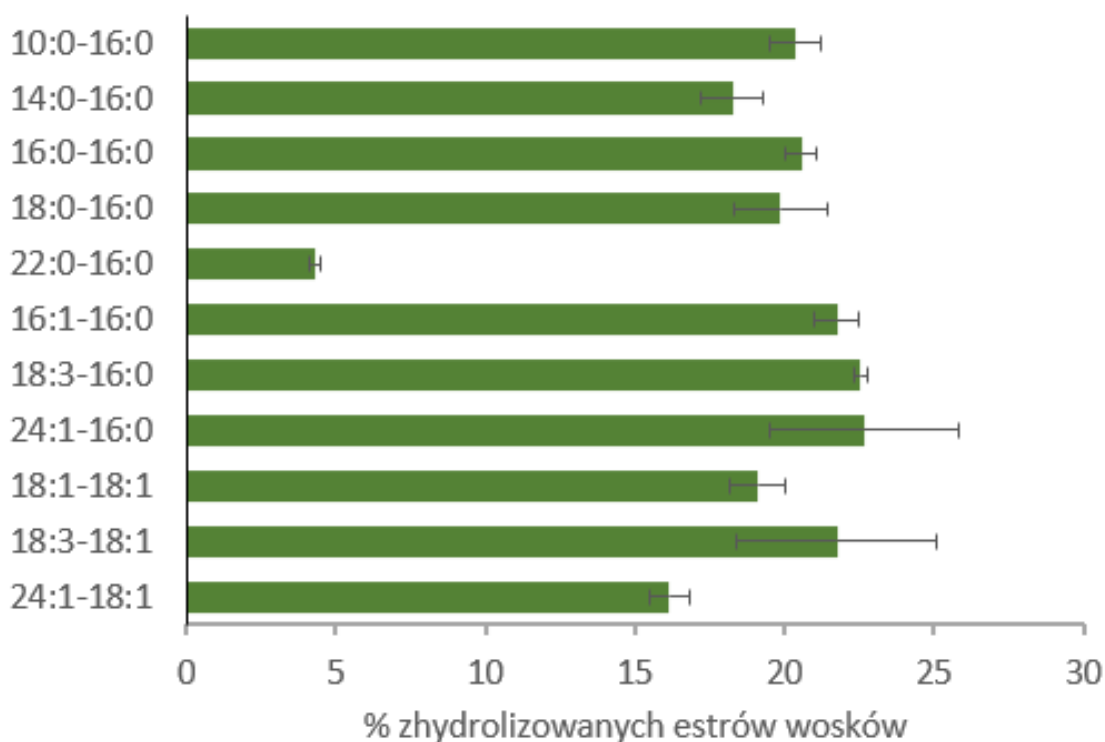


Rycina 19. Wpływ preinkubacji na aktywność lipaz z nasion jojoba w stosunku do tri- ^{14}C 18:1-TAG. Na wykresach przedstawiono aktywność lipaz (wartości średnie \pm odchylenie standardowe, $n \geq 2$) jako procent aktywności w testach, w których nie stosowano preinkubacji. Preinkubacja dotyczyła wysuszonych mikrosomów z dodanym substratem (przed dodaniem buforu inkubacyjnego). Pozostałe warunki testu takie jak podano w opisie Ryciny 13.

4.1.3.5 Specyficzność substratowa lipaz kielkujących nasion jojoba

W badaniach specyficzności substratowej lipaz kielkujących nasion jojoba nie uwzględniano różnych rodzajów triacylogliceroli tj. cząsteczek TAG z różnymi kwasami tłuszczowymi. W badaniach wykorzystywano jedynie dostępny komercyjnie tri- ^{14}C 18:1-TAG. W badaniach tych wykorzystano natomiast jedenaście różnych rodzajów wosków (**Rycina 20**). Woski te zostały zsyntetyzowane w Pracowni Biochemii Roślin jako że w handlu brak jest tego typu związków. Zsyntetyzowano osiem wosków zawierających ^{14}C 16:0-FA jako kwas tłuszczowy i różne nasycone (10:0, 14:0, 16:0, 18:0 i 22:0) i nienasycone (16:1, 18:3 i 24:1) alkohole tłuszczowe. Dodatkowo zsyntetyzowanych zostało 3 woski zawierające ^{14}C 18:1-FA, jako kwas tłuszczowy i nienasycone (18:1, 18:3 i 24:1) alkohole tłuszczowe. Większość badanych wosków hydrolizowana była przez lipazy kielkujących nasion jojoba z podobną intensywnością. Wyjątek stanowił wosk z długołańcuchowym nasyconym alkoholem tłuszczowym – 22:0-OH- ^{14}C 16:0. Był on hydrolizowany kilkakrotnie wolniej niż pozostałe wykorzystywane w badaniach woski. Podobny wosk (24:1-OH- ^{14}C 16:0),

z dłuższym alkoholem tłuszczowym, posiadającym jednak podwójne wiązanie, wykorzystywany był już przez badane lipazy w sposób podobny do wosków krótszołańcuchowych. Nieco słabiej od reszty wosków wykorzystywany był również wosk „24:1-OH-[¹⁴C]18:1”; wosk o najdłuższym łańcuchu węglowym. Zamiana kwasu tłuszczowego z 16:0 na 18:1 (oprócz wspomnianego powyżej wosku z 24:1-OH) nie wywoływała zauważalnych zmian w aktywności badanych lipaz (np. aktywność w stosunku do 18:3-OH-[¹⁴C]16:0 była podobna jak w stosunku do 18:3-OH-[¹⁴C]18:1. Również zmiana długości łańcucha węglowego alkoholu tłuszczowego w granicach C10-C18 nie wywoływała istotnych zmian w aktywności lipaz kiełkujących nasion jojoba. Ilość podwójnych wiązań w cząsteczce alkoholu tłuszczowego (od 1 do 3) o długości do 18C również nie wywoływała dużych zmian w aktywności lipaz (**Rycina 20**). Niestety w badaniach nie udało się uzyskać wosków znakowanych ¹⁴C, najbardziej typowych dla nasion jojoba, tj. zawierających alkohole: 20:1-OH czy 22:1-OH w połączeniu 20:1-FA, z powodu braku odpowiedniej specyficzności wykorzystywanych do syntezy tych wosków „syntaz wosków”. Na podstawie badań przeprowadzonych na kiełkujących nasionach jojoba wiadomo jednak, że woski w nich występujące są intensywnie hydrolizowane podczas procesu kiełkowania, a więc, że lipazy nasion jojoba są zdolne do ich hydrolizy, jednakże niewiadomym pozostaje, jaka byłaby intensywność ich hydrolizy w warunkach *in vitro*. Z tego względu nie możemy porównać intensywności ich hydrolizy z intensywnością hydrolizy testowanych wosków.



Rycina 20. Specyficzność substratowa lipaz z kiełkujących nasion jojoba w stosunku do różnych nasyconych i nienasyconych wosków. Na wykresach przedstawiono wartości średnie \pm odchylenie standardowe, $n \geq 2$. W skrótach nazw wosków (oś OY) pierwszy komponent to skrót nazwy alkoholu tłuszczowego, a drugi to skrót nazwy kwasu tłuszczowego.

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion jojoba w 35. dniu kiełkowania, substrat (2,5 nmol [14 C]WE/test) dodawano rozpuszczony w 19 μ l benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μ l 0,1 M buforu HEPES (pH 7,0); inkubację przeprowadzano w 60 $^{\circ}$ C przez 10 minut.

4.1.3.6 Zdolność lipaz kiełkujących nasion jojoba do syntezy wosków

Poza zdolnością do hydrolizy wosków oraz triacylogliceroli, lipazy obecne we frakcjach mikrosomalnych wyizolowanych z kiełkujących nasion jojoba wykazywały aktywność enzymatyczną w reakcji odwrotnej, tj. syntezy wosków z wykorzystaniem różnych donorów grup acylowych i wolnych alkoholi tłuszczowych. Woski były wydajnie syntetyzowane z wykorzystaniem, jako donory kwasów tłuszczowych, triacylogliceroli, diacylogliceroli oraz wolnych kwasów tłuszczowych, podczas gdy nie obserwowano syntezy wosków, gdy donorem kwasów tłuszczowych były acylo-CoA (kwasy tłuszczowe połączone z koenzymem A) oraz fosfolipidy. Syntezę wosków obserwowano również, kiedy do mieszaniny reakcyjnej

dotychczas dodawano jedynie wolne alkohole tłuszczowe, co wskazuje, że dyskutowane enzymy mogą wykorzystywać endogenne (lipidy frakcji mikrosomalnych) źródła grup acylowych (**Tabela 6**).

Tabela 6. Synteza wosków *in vitro* przez frakcje mikrosomalne z kiełkujących nasion jojoba

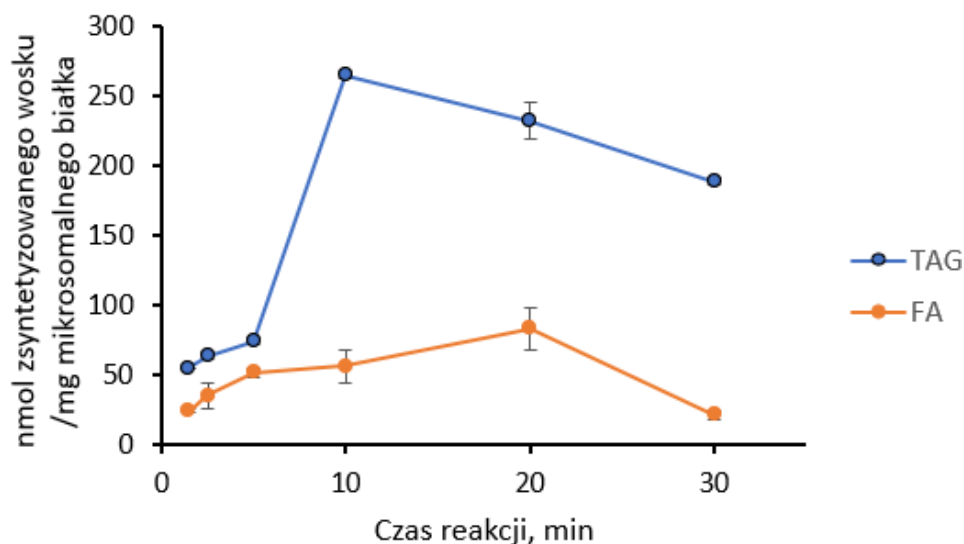
Dodane substraty (1 nmol każdego z substratów/reakcję)		Zsyntetyzowany produkt - [¹⁴ C]WE	
		[pmol]	[% kontroli]
[¹⁴ C]18:1- OH	-	167 ± 19	100
	+ 18:1-DAG	284* ± 27	159
	+ 18:1-TAG	248* ± 22	139
Tri-[¹⁴ C] 18:1-TAG	-	76 ± 13	100
	+ 18:1-OH	163* ± 7	214
	+ cholesterol	61 ± 6	80
18:1-OH	+ [¹⁴ C]18:1-FA	65 ± 9	-
	+ [¹⁴ C]18:1-CoA	0	-
	+ [¹⁴ C]PC	0	-
	+ [¹⁴ C]PE	0	-

Wyniki przedstawiają wartości średnie z czterech powtórzeń biologicznych ± odchylenie standardowe; * - statystycznie istotna różnica w stosunku do reakcji kontrolnej z dodanym wyłącznie substratem [¹⁴C] (test t-studenta, p < 0,01, n = 4)

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion jojoba w 35. dniu kiełkowania, substraty dodawano rozpuszczone w 19 µl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 µl 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,2); inkubację przeprowadzano przez 15 minut w 35 °C.

Przedstawione powyżej badania uzupełniono badaniami dotyczącymi dynamiki syntezy wosków przez frakcje mikrosomalne z kiełkujących nasion jojoba. W badaniach tych jako

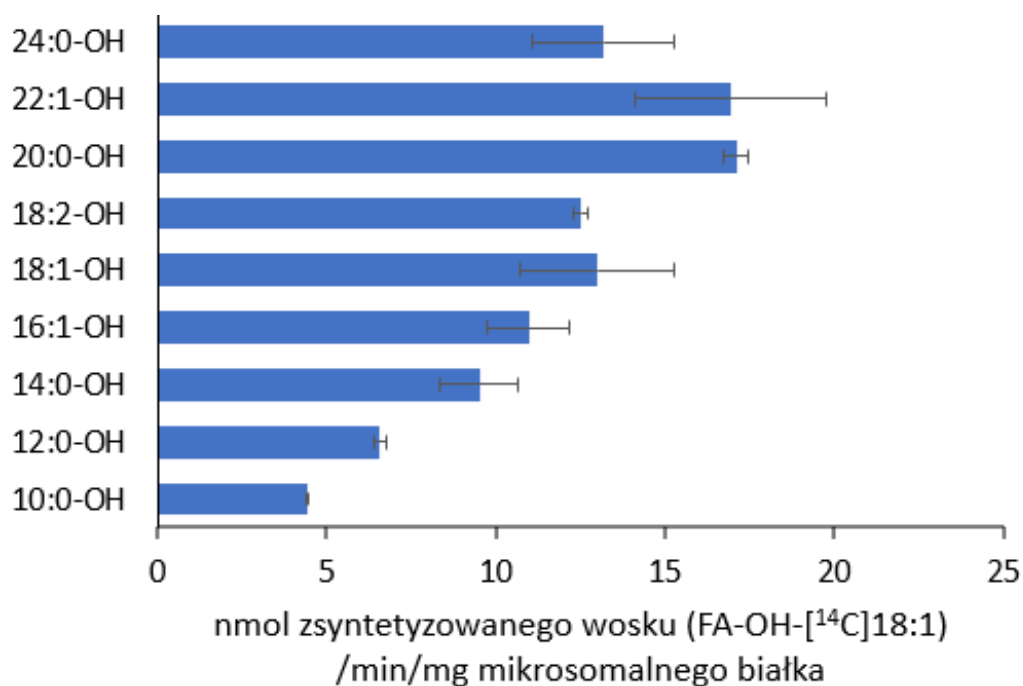
substraty zastosowano połączenie 18:1-OH z [¹⁴C]18:1 w jednym wariantcie i połączenie 18:1-OH z tri-[¹⁴C]18:1-TAG w drugim wariantcie. Warunki testów były takie jak podano w opisie Tabeli 5 z tym, że reakcje kończono po różnym czasie inkubacji (**Rycina 21**). W przypadku testów z tri-[¹⁴C]18:1-TAG jako donorem kwasów tłuszczowych, synteza wosków przeważała nad ich degradacją do 10 minut inkubacji. Po tym czasie ilość [¹⁴C]-wosków zaczynała spadać, co sugeruje, że szybkość hydrolizy wosków zaczynała przeważać nad szybkością ich syntezy. W przypadku [¹⁴C]18:1 jako donora kwasów tłuszczowych, hydroliza wosków zaczynała przeważać nad ich syntezą dopiero po 20 minutach inkubacji. Ilość [¹⁴C]-wosków zsyntetyzowanych z tri-[¹⁴C]18:1-TAG i 18:1-OH była większa niż ta powstająca z [¹⁴C]18:1 oraz 18:1-OH. Różnice te były największe pomiędzy 5. a 10. minutą reakcji (**Rycina 21**). Lepsze wykorzystanie TAG, jako donora kwasów tłuszczowych do biosyntezy wosku niż wolnego kwasu tłuszczowego może świadczyć o zdolności bezpośredniego przenoszenia kwasu tłuszczowego z TAG (transacylacja) na alkohol tłuszczowy podczas syntezy wosku, a nie uwalnianie go najpierw z TAG i wykorzystywanie dopiero wolnego kwasu tłuszczowego do reakcji syntezy.



Rycina 21. Dynamika reakcji syntezy wosków katalizowana przez lipazy z nasion jojoba z wykorzystaniem jako substratów: alkoholu tłuszczowego (18:1-OH) w kombinacji z triacyloglicerolem (tri- ^{14}C 18:1-TAG; w legendzie opisany jako TAG) oraz w kombinacji z wolnym kwasem tłuszczowym (^{14}C 18:1; w legendzie opisany jako FA). Na wykresie przedstawiono wartości średnie \pm odchylenie standardowe, $n \geq 2$.

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion jojoba w 35. dniu kiełkowania, substraty (20 nmol tri- ^{14}C 18:1-TAG lub 20 nmol ^{14}C 18:1-FA razem z 20 nmol 18:1-OH) dodawano rozpuszczone w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,0); inkubację przeprowadzano w 60 $^{\circ}\text{C}$. Przy przeliczaniu aktywności na mg białka mikrosomalnego stosowano przelicznik: 1 nmol mikrosomalnej fosfatydylocholiny = 4,4 μg białka mikrosomalnego.

W kolejnym etapie badań dotyczących zdolności syntezy wosków przez lipazy kiełkujących nasion jojoba badano ich specyficzność w stosunku do różnych alkoholi tłuszczowych, jako akceptorów kwasów tłuszczowych. W testach tych wykorzystano połączenia znakowanego kwasu oleinowego (^{14}C 18:1) z dziewięcioma różnymi alkoholami tłuszczowymi. Wykazano w nich, że spośród testowanych alkoholi najlepiej wykorzystywane były te o łańcuchu 20-węglowym i dłuższym, co najmniej do 24C. Nieco słabiej wykorzystywane były alkohole 18-węglowe, a te o najkrótszych łańcuchach węglowych (10:0-OH, 12:0-OH) najsłabiej. Stopień nienasycenia testowanych alkoholi tłuszczowych nie wpływał znacząco na ich wykorzystywanie do syntezy wosków (np. 18:1-OH i 18:2-OH wykorzystywane były bardzo podobnie, **Rycina 22**).



Rycina 22. Wpływ rodzaju alkoholu tłuszczowego (oś OY) na intensywność syntetazy wosków przez lipazy kiełkujących nasion jojoba. W testach tych, jako donor kwasów tłuszczowych wykorzystywano [^{14}C]18:1. Na wykresie przedstawiono wartości średnie \pm odchylenie standardowe, $n \geq 2$. FA-OH, alkohol tłuszczowy

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion jojoba w 35. dniu kiełkowania, substraty (20 nmol [^{14}C]18:1-FA + 20 nmol FA-OH) dodawano rozpuszczone w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,0); inkubację przeprowadzano w 60 $^{\circ}\text{C}$ przez 20 minut. Przy przeliczaniu aktywności na mg białka mikrosomalnego stosowano przelicznik: 1 nmol mikrosomalnej fosfatydylocholiny = 4,4 μg białka mikrosomalnego.

W celu potwierdzenia, że obserwowana w przedstawionych powyżej testach synteza wosków katalizowana jest przez enzymy typu lipaz, w kolejno przeprowadzonych badaniach wykonano testy z udziałem znanego inhibitora lipaz – tetrahydrolipstatyny. We wstępnych testach określających wpływ tetrahydrolipstatyny na aktywność lipaz kiełkujących nasion jojoba wykazano, że reakcja hydrolizy wosków i triacylogliceroli ulegała całkowitemu zahamowaniu w obecności tego inhibitora (**Tabela 7**).

Tabela 7. Wpływ tetrahydrolipstatyny na aktywność lipaz frakcji mikrosomalnych wyizolowanych z kiełkujących nasion jojoba

Dodany substrat (2,5 nmol/reakcję)	% dodanej radioaktywności we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych	
	Kontrola	+Tetrahydrolipstatyna
Triacyloglicerol:		
tri-[¹⁴ C]18:1-TAG	61,1 ± 10,5	0,0
Wosk:		
18:1-OH-[¹⁴ C]18:1	32,0 ± 4,5	0,0

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n ≥ 2.

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholino) wyizolowanych z nasion jojoba w 35. dniu kiełkowania, substraty (2,5 nmol każdego) dodawano rozpuszczone w 19 µl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 µl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,0) w przypadku kontroli lub tegoż buforu zawierającego dodatkowo 20 µM tetrahydrolipstatynę; inkubację przeprowadzano przez 10 minut w 60 °C.

W kolejnych testach badano wpływ tetrahydrolipstatyny i DTNB na intensywność syntezy wosków przez frakcje mikrosomalne kiełkujących nasion jojoba. W testach tych jako substraty do syntezy wosków wykorzystywano [¹⁴C]18:1 w połączeniu z trzema różnymi alkoholami tłuszczowymi. Testy wykonano w trzech wariantach: tylko z dodatkiem do badanych frakcji mikrosomalnych wymienionych substratów, z wymienionymi substratami i dodatkiem tetrahydrolipstatyny oraz z wymienionymi substratami i dodatkiem DTNB (inhibitor powstawania acylo-CoA). W testach zawierających tylko testowane substraty wykorzystywane do biosyntezy wosków, intensywność ich biosyntezy zależała w pewnym stopniu od zastosowanego alkoholu tłuszczowego; była najniższa w testach z 12:0-OH i najwyższa z 18:1-OH. Kiedy do mieszaniny reakcyjnej dodawano DTNB (wiąże koenzymu A i blokuje jego połączenie z kwasem tłuszczowym), ilość wosków zsyntetyzowanych *de novo* była nie niższa niż ilość wosków uzyskiwana w reakcji kontrolnej. Pokazuje to, że dodany 18:1-FA nie ulegał aktywacji do acylo-CoA przed wykorzystaniem jako substrat w reakcji syntezy

wosków. Dodatek tetrahydrolipstatyny do mieszanin reakcyjnych blokował zaś całkowicie syntezę wosków (**Tabela 8**). Test ten wskazuje bardzo wyraźnie, że obserwowana synteza wosków w testach z frakcjami mikrosomalnymi z kiełkujących nasion jojoba była katalizowana przez zawarte w niej lipazy. Gdyby była syntetyzowana przez „syntazy wosków” to do tej syntezy konieczne byłoby przekształcenie wolnego kwasu tłuszczowego do acylo-CoA. Przeprowadzone badania wykazały zaś wyraźnie, że ani dostarczony do mieszaniny reakcyjnej [¹⁴C]18:1-CoA nie był wykorzystywany do syntezy WE (**Tabela 6**), ani dodatek DTNB blokujący powstawanie acylo-CoA nie był w stanie wpłynąć na tę syntezę (**Tabela 8**).

Tabela 8. Wpływ tetrahydrolipstatyny i DTNB na syntezę wosków przez frakcje mikrosomalne z kiełkujących nasion jojoba

Substraty	Synteza <i>de novo</i> wosków (nmol/minuta/mg mikrosomalnego białka)		
	Kontrola	+Tetrahydrolipstatyna	+ DTNB
[¹⁴ C]18:1-FA + 12:0-OH	8,5 ± 1,1	0,0	9,2 ± 2,5
[¹⁴ C]18:1-FA + 18:1-OH	16,7 ± 1,5	0,0	18,8 ± 4,1
[¹⁴ C]18:1-FA + 20:0-OH	13,3 ± 0,4	0,0	19,3 ± 2,2

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n ≥ 2.

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion jojoba w 35. dniu kiełkowania, substraty (20 nmol każdego) dodawano rozpuszczone w 19 µl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 µl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,0), zawierającego dodatkowo 20 µM tetrahydrolipstatynę lub 7 mM DTNB (w testach z tymi inhibitorami); inkubację przeprowadzano przez 10 minut w 60 °C. Przy przeliczaniu aktywności na mg białka mikrosomalnego stosowano przelicznik: 1 nmol mikrosomalnej fosfatydylocholiny = 4,4 µg białka mikrosomalnego.

4.2 Katran abisyński (*Crambe abyssinica*) i lnicznik siewny (*Camelina sativa*)

4.2.1 Mobilizacja tłuszczów zapasowych podczas kiełkowania nasion *C. abyssinica* i *C. sativa*

Do badań wykorzystano nasiona katrań abisyńskiego odmiany „Mejer” i nasiona lnicznika siewnego odmiany „Suneson”; nasiona gatunków roślin oleistych planowanych do transgenezy genami związanymi z syntezą wosków w projekcie o akronimie ICON, którego częścią były badania prezentowane w niniejszej pracy. Badania rozpoczęto od określenia zmian zawartości lipidów nasion w czasie kiełkowania. Nasiona katrań podkiełkowano na wilgotnej bibule (w temperaturze pokojowej) przez okres 14 dni, natomiast nasiona lnicznika siewnego przez okres 5 dni. Analizę całkowitej zawartości lipidów w analizowanych nasionach katrań wykonano w momencie rozpoczęcia kiełkowania oraz po 3, 6, 10 i 14 dniach ich podkiełkowania. W przypadku nasion lnicznika siewnego analizę wykonano w momencie rozpoczęcia kiełkowania oraz po 1., 2., 3., 4., i 5. dniu podkiełkowania. Do analiz całkowitej zawartości lipidów w nasionach/liścieniach w przypadku nasion katrań pobierano w każdym z analizowanych czasów kiełkowania po 3 próby, z których każda zawierała 3 nasiona. W przypadku nasion *C. sativa* do ekstrakcji wykorzystywano pojedyncze nasiona; 5 nasion/powtórzeń z każdego dnia kiełkowania. W momencie rozpoczęcia kiełkowania nasiona katrań zawierały w acylolipidach średnio około 2,3 μmol kwasów tłuszczowych/nasiono. Po 14 dniach kiełkowania ilość ta zmniejszyła się do około 0,9 μmol /nasiono (do około 40% zawartości początkowej). Najszybsza mobilizacja tłuszczów następowała pomiędzy trzecim a szóstym dniem kiełkowania; około 8% wartości początkowej/dzień (**Tabela 9**). Wstępne badania dotyczące aktywności lipaz zawartych w frakcjach mikrosomalnych izolowanych z kiełkujących nasion katrań w kolejnych dniach kiełkowania wykazały, że aktywność lipaz zawartych w tych frakcjach była najwyższa pomiędzy 6. a 10. dniem kiełkowania w stosunku do triacylogliceroli (**Tabela S5**) i w 6. dniu

kiełkowania w stosunku do wosków (**Tabela S6**). W związku z powyższym późniejsze analizy dotyczące właściwości biochemicznych lipaz kiełkujących nasion katroanu wykonywano na frakcjach mikrosomalnych przygotowanych z nasion katroanu w 6. dniu ich podkiełkowania.

Tabela 9. Zmiany w zawartości acylolipidów w kiełkujących nasionach katroanu abisyńskiego (*Crambe abyssinica*)

Zawartość acylolipidów	Dni podkiełkowania				
	0	3	6	10	14
∑ μmol FA/	6,89	6,25	4,64	3,40	2,79
3 nasiona	± 1,06	± 0,96	± 0,45	± 0,68	± 0,75
% wartości początkowej	100	91	67	49	40

Wyniki przedstawiają wartości średnie z trzech powtórzeń biologicznych ± odchylenie standardowe. FA, kwasy tłuszczowe

Nasiona Inicznika siewnego są nasionami mniejszymi niż nasiona katroanu. Zawierają też mniejszą ilość lipidów niż nasiona katroanu. W momencie rozpoczęcia kiełkowania, nasiona *C. sativa* zawierały w acylolipidach średnio około 1,3 μmol kwasów tłuszczowych/nasiono. Po 5 dniach kiełkowania ilość ta zmniejszyła się do około 0,06 μmol/nasiono (do około 5% zawartości początkowej). Pomiedzy 1. a 4. dniem kiełkowania mobilizacja lipidów nasion *C. sativa* przebiegała prawie liniowo; spadek tej zawartości wynosił pomiedzy 20 a 30% wartości początkowej/dzień (**Tabela 10**). Do późniejszych analiz dotyczących właściwości biochemicznych i specyficzności substratowej lipaz kiełkujących nasion *C. sativa* zdecydowano stosować frakcje mikrosomalne przygotowane z nasion w 3. dniu ich podkiełkowania.

Tabela 10. Zmiany zawartości acylolipidów w kiełkujących nasionach lnicznika siewnego (*Camelina sativa*)

Zawartość acylolipidów	Dni podkielkowania					
	0	1	2	3	4	5
$\Sigma \mu\text{mol FA/}$	1,28	1,15	0,72	0,46	0,13	0,06
1 nasiono	$\pm 0,07$	$\pm 0,04$	$\pm 0,02$	$\pm 0,04$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$
% wartości początkowej	100	91	58	37	11	5

Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm odchylenie standardowe, n = 5. FA, kwasy tłuszczowe

Dominującą klasą lipidów dojrzałych nasion katroanu abisyńskiego były triacyloglicerole (TAG). Ich względna zawartość (% kwasów tłuszczowych wszystkich acylolipidów występujących w TAG) wynosiła średnio około 96,6%. Drugą pod względem ilości klasą lipidów były lipidy polarne (POL) analizowane jako jedna klasa. Ich względna zawartość wynosiła około 2,6%. Zawartość diacylogliceroli (DAG) wynosiła około 0,6%, wolnych kwasów tłuszczowych (FA) około 0,12%, a zawartość estrów steroli (SE) około 0,16% (**Tabela 11**). Również w dojrzałych nasionach lnicznika siewnego dominującą klasę lipidów były triacyloglicerole. Ich względna zawartość wynosiła około 92,7%. Lipidy polarne stanowiły około 3,7%, diacyloglicerole około 0,6%, wolne kwasy tłuszczowe około 1,4%, zaś estry steroli około 1,3% wszystkich acylolipidów (Klińska i in., 2019). Zmiany w zawartości acylolipidów analizowanych jako całość (**Tabele 9 i 10**), obserwowane podczas kiełkowania nasion, dotyczyć więc będą głównie zawartości TAG jako dominującej (>90% wszystkich acylolipidów) klasy acylolipidów.

Tabela 11. Zawartości poszczególnych klas acylolipidów w dojrzałych nasionach katrań abisyńskiego (*Crambe abyssinica*)

Względna zawartość acylolipidów	Klasy lipidów				
	POL	DAG	FA	TAG	SE
% \sum nmol FA	2,6	0,6	0,12	96,6	0,16
wszystkich acylolipidów	$\pm 0,5$	$\pm 0,1$	$\pm 0,04$	$\pm 0,5$	$\pm 0,04$

Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm odchylenie standardowe, n = 3. POL, lipidy polarne; DAG, diacyloglicerole; FA, wolne kwasy tłuszczowe; TAG, triacyloglicerole; SE, estry steroli

4.2.2 Charakterystyka biochemiczna lipaz kiełkujących nasion *C. abyssinica* i *C. sativa*

4.2.2.1 Wysycenie reakcji hydrolizy

Badania rozpoczęto od optymalizacji warunków reakcji in vitro. Jako substrat badanych lipaz stosowano komercyjnie dostępny tri-[¹⁴C]18:1-TAG. W badaniach tych stosowano, podobnie jak w badaniach dotyczących charakterystyki biochemicznej lipaz kiełkujących nasion jojoba, porcje frakcji mikrosomalnych zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholino/test. We wstępnych badaniach (mikrosomy z kiełkujących nasion z *C. abyssinica*) z wykorzystaniem 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,2) wykazano, że wysycenie reakcji może następować przy dodatku około 20 nmol tri-[¹⁴C]18:1-TAG/test (**Tabela S7**), a reakcja przebiega w sposób praktycznie liniowy do 5 minut i dalej w sposób już nieliniowy co najmniej do 30 minut (**Tabela S8**). Zamiana buforu fosforanowego na 0,1 M HEPES (pH 7) skutkowała, podobnie jak to było w przypadku lipaz z kiełkujących nasion jojoba, zwiększeniem aktywności hydrolitycznej (**Tabela S8**). W kolejnym badaniu, stosując bufor HEPES, próbowano ustalić wysycenie reakcji hydrolizy TAG w testach z frakcjami mikrosomalnymi z kiełkujących nasion zarówno *C. abyssinica* (badania wstępne zaprezentowano w **Tabeli S7**), jak i *C. sativa*. Wykazano w nich, że wysycenie tej reakcji następuje pomiędzy dodatkiem 25 a 30 nmol [¹⁴C]TAG/test. Największą średnią ilość zhydrolizowanych [¹⁴C]FA odnotowano przy dodatku 30 nmol [¹⁴C]TAG/test, jednakże ilość

ta nie różniła się statystycznie od ilości zhydrolizowanych [^{14}C]FA przy dodatku 25 nmol tri- ^{14}C]18:1-TAG/test (**Tabela 12**).

Tabela 12. Wpływ ilości egzogenego [^{14}C]TAG na ilość zhydrolizowanych kwasów tłuszczowych w testach z taką samą ilością frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion *C. sativa* i z kiełkujących nasion *C. abyssinica*

Ilość dodanego tri- ^{14}C]18:1-TAG [nmol/test]	Zhydrolizowany [^{14}C]18:1 (nmol/test)	
	<i>C. sativa</i>	<i>C. abyssinica</i>
10	5,39^a ± 0,71	1,26^a ± 0,14
20	9,14^a ± 1,19	2,22^a ± 0,2
25	12,78 ± 1,48	2,54 ± 0,27
30	14,76 ± 0,63	3,06 ± 0,18

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, $n \geq 2$. ^a – statystycznie istotna różnica pomiędzy testami z dodatkiem 30 nmol [^{14}C]TAG a testami z dodatkiem pozostałych ilości [^{14}C]TAG w dwustronnym teście różnic średnich przy $\alpha = 0,05$

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w 6. dniu kiełkowania lub *C. sativa* w 3. dniu kiełkowania, substrat (od 10 do 30 nmol [^{14}C]TAG/test) dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,0); inkubację przeprowadzano w 30 °C przez 5 minut.

4.2.2.2 Wpływ jonów dwuwartościowych na aktywność lipaz kiełkujących nasion *C. abyssinica* i *C. sativa*

W kolejnych badaniach testowano wpływ jonów dwuwartościowych na aktywność lipaz frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion *C. sativa* i z kiełkujących nasion *C. abyssinica*. Wykorzystano w nich trzy rodzaje buforów inkubacyjnych: 0,1 M HEPES (pH 7), 0,1 M HEPES (pH 7) z 5 mM MgCl_2 i 0,1 M HEPES (pH 7) z 5 mM CaCl_2 . Wykazano w nich, że dodatek jonów Mg^{2+} tylko nieznacznie stymulował aktywność lipaz (zawartych w testowanych frakcjach mikrosomalnych) w stosunku do tri- ^{14}C]18:1-TAG. Stymulacja ta była jednak statystycznie nieistotna. Dodatek jonów Ca^{2+} istotnie zwiększał zaś hydrolizę egzogenego [^{14}C]TAG. Ilość zhydrolizowanych [^{14}C] kwasów tłuszczowych była około

dwukrotnie większa w testach z dodatkiem tego jonu w porównaniu do testów bez jego dodatku (Tabela 13).

Tabela 13. Wpływ jonów Ca^{2+} i jonów Mg^{2+} na aktywność lipaz z kiełkujących nasion *C. sativa* i z kiełkujących nasion *C. abyssinica* w stosunku do tri- ^{14}C]18:1-TAG

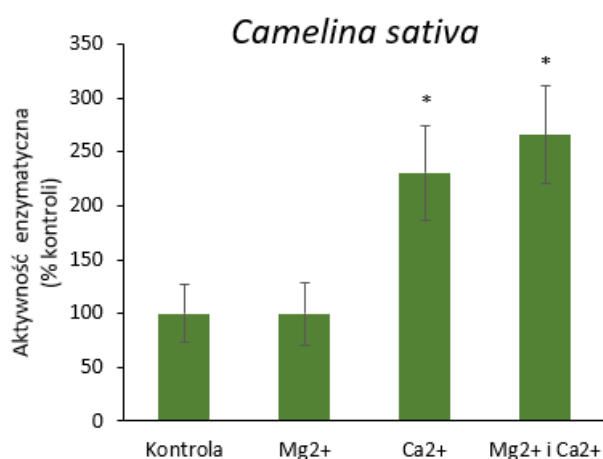
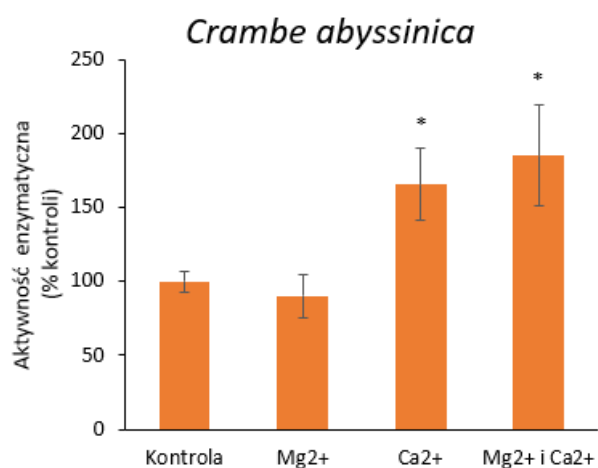
Zhydrolizowany ^{14}C]18:1 (% dodanej radioaktywności)					
<i>C. sativa</i>			<i>C. abyssinica</i>		
0,1 M bufor HEPES	0,1 M bufor HEPES + 5 mM MgCl_2	0,1 M bufor HEPES + 5 mM CaCl_2	0,1 M bufor HEPES	0,1 M bufor HEPES + 5 mM MgCl_2	0,1 M bufor HEPES + 5 mM CaCl_2
$15,5 \pm 1,7$	$17,1 \pm 1,6$	$35,9^a \pm 5,5$	$3,5 \pm 0,8$	$5,3 \pm 0,5$	$6,5^a \pm 1,0$

Wyniki przedstawiają wartość średnią \pm odchylenie standardowe, $n \geq 2$. ^a – statystycznie istotna różnica pomiędzy testami bez dodatku jonów a testami z ich dodatkiem w dwustronnym teście różnic średnich przy $\alpha = 0,05$.

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w 6. dniu kiełkowania lub *C. sativa* w 3. dniu kiełkowania, substrat (20 nmol ^{14}C]TAG/test) dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,0) bez lub z dodatkiem jonów dwuwartościowych; inkubację przeprowadzano w 30 °C przez 5 minut.

Ponieważ w badaniach wstępnych (Tabela 13) dotyczących wpływu jonów dwuwartościowych na aktywność lipaz kiełkujących nasion *C. sativa* i *C. abyssinica*, jony magnezu wykazywały pewien stymulujący wpływ na aktywność tych enzymów, lecz nie w sposób statystycznie istotny, badania te powtórzono stosując warunki testu zbliżone do optymalnych warunków dla aktywności badanych lipaz (podane w opisie warunków reakcji; Rycina 23). Badania te potwierdziły, że aktywność lipaz kiełkujących nasion *C. sativa* i *C. abyssinica* była stymulowana przez jony wapnia. Dodatek tych jonów do testów z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. sativa* stymulował ich aktywność ponad dwukrotnie, a w przypadku testów z kiełkujących nasion *C. abyssinica* o około 80% i były to wartości zbliżone do tych uzyskanych w badaniach wstępnych. W testach tych nie stwierdzono jednak stymulującego wpływu jonów magnezu na aktywność badanych lipaz. Potwierdzono więc, że lipazy te różnią się od lipaz kiełkujących nasion *jojoba*, których aktywność była

stymulowana przez jony magnezu. Dodatek do mieszaniny reakcyjnej jonów magnezu i wapnia w stężeniu 2,5 mM każdy, zwiększało nieco aktywność badanych lipaz w porównaniu do testów z dodatkiem tylko jonów wapnia, jednakże w sposób statystycznie nieistotny (**Rycina 23; Tabela S9**).

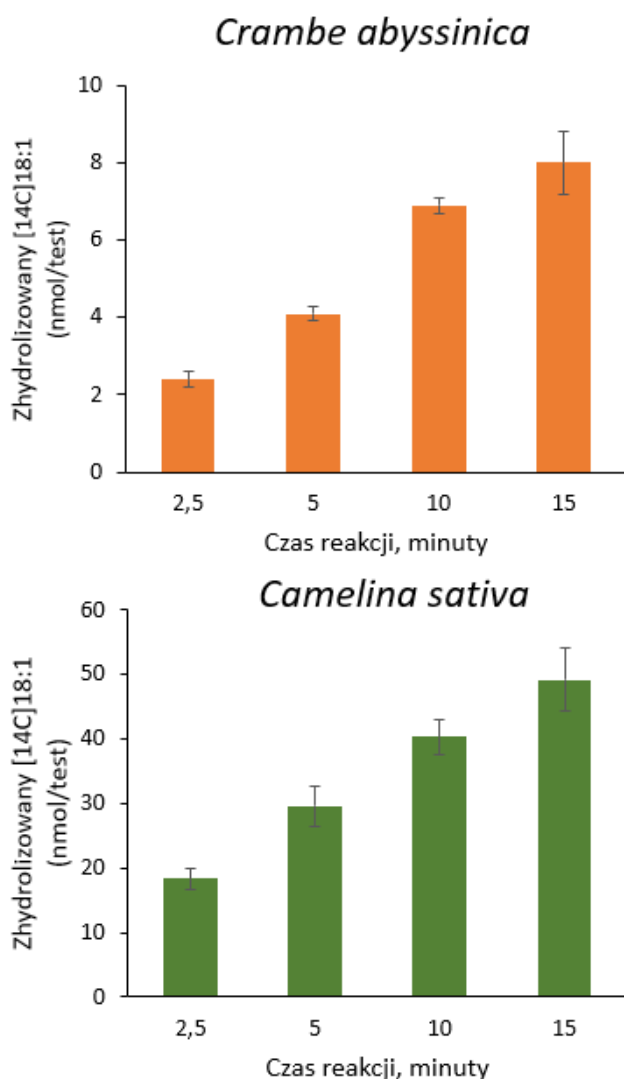


Rycina 23. Wpływ jonów dwuwartościowych na aktywność lipaz kiełkujących nasion *C. abyssinica* (górny panel) i *C. sativa* (dolny panel). Jako substrat zastosowano tri-¹⁴C]18:1-TAG. Aktywność mierzono ilością uwalnianych [¹⁴C]18:1-FA i pokazano jako % aktywności enzymatycznej w odniesieniu do kontroli. Kontrolę stanowiła aktywność lipaz w testach z buforem inkubacyjnym (0,1 M HEPES, pH 7,5) bez dodatku jonów. Na wykresach przedstawiono wartości średnie ± odchylenie standardowe, n ≥ 4. * – statystycznie istotna różnica pomiędzy testami bez dodatku jonów a testami z ich dodatkiem w dwustronnym teście różnic średnich przy α = 0,05

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w 6. dniu kiełkowania lub *C. sativa* w 3. dniu kiełkowania, substrat {30 (*C. sativa*) lub 25 (*C. abyssinica*) nmol [¹⁴C]TAG/test} dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,5) bez żadnych dodatków (kontrola), z dodatkiem 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, lub 2,5 mM CaCl₂ + 2,5 mM MgCl₂; inkubację przeprowadzano przez 5 minut w 60 °C (*C. abyssinica*) lub 2,5 minuty w 55 °C (*C. sativa*).

Po ustaleniu, że jony Ca²⁺ stymulują aktywność testowanych lipaz, powtórzono doświadczenia dotyczące ilości egzogenego [¹⁴C]TAG wysycającej reakcje hydrolizy, stosując jako bufor inkubacyjny 0,1 M HEPES (pH 7) z dodatkiem 5 mM CaCl₂. Wykazano,

że są to ilości zbliżone do 30 nmol tri- ^{14}C 18:1-TAG/test (**Tabela S9**); podobnie jak to ustalono wcześniej stosując 0,1 M HEPES bez dodatku jonów wapnia (**Tabela 12**). Największą szybkość hydrolizy egzogenego ^{14}C TAG (przy zastosowaniu jego ilości zbliżonych do wysycających reakcje hydrolizy) odnotowano w pierwszych 2,5 minutach reakcji i nieco tylko mniejszą w następnych 2,5 minutach; reakcja przebiegała w sposób prawie liniowy w tym czasie, szczególnie w testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. abyssinica*. W kolejnych minutach reakcji hydroliza egzogenego ^{14}C TAG przebiegała dalej, jednakże już w sposób nieliniowy (**Rycina 24**).



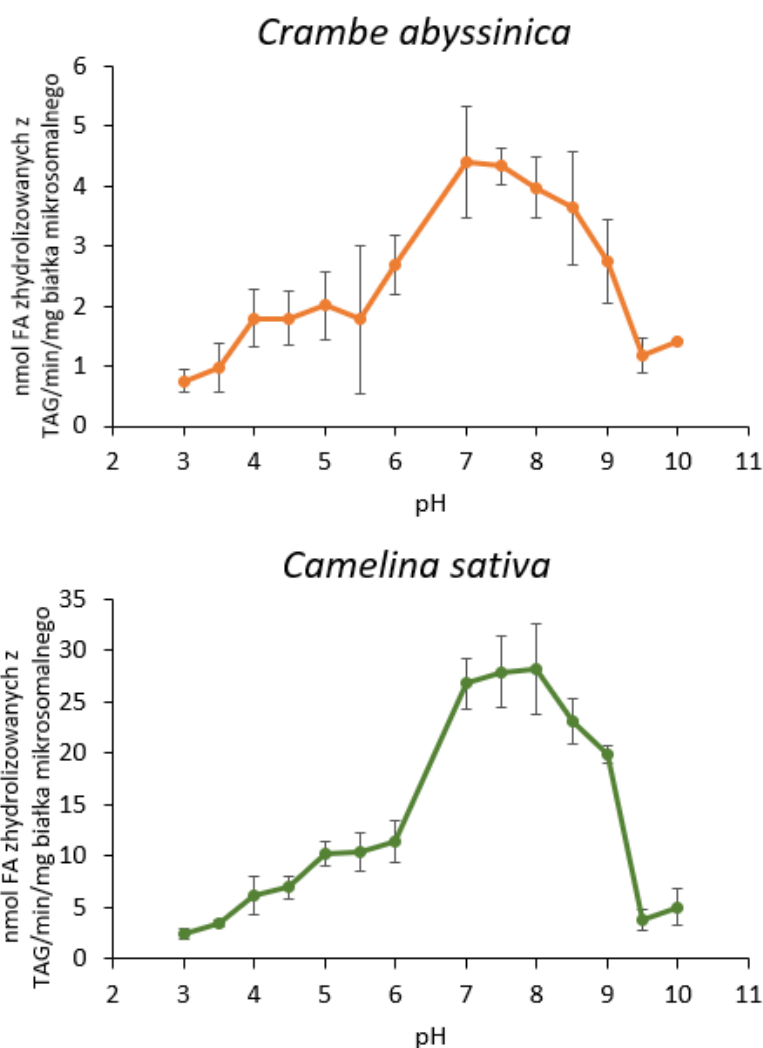
Rycina 24. Zależność szybkości hydrolizy egzogenego tri-[¹⁴C]18:1-TAG od czasu reakcji (w testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. abyssinica* [górny panel] i z kiełkujących nasion *C. sativa* [dolny panel]). Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n ≥ 2.

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholino) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w 6. dniu kiełkowania lub *C. sativa* w 3. dniu kiełkowania, substrat {30 (*C. sativa*) lub 25 (*C. abyssinica*) nmol [¹⁴C]TAG/test} dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,0) z dodatkiem 5 mM CaCl₂; inkubację przeprowadzano w 30 °C.

4.2.2.3 Wpływ pH na aktywność lipaz kiełkujących nasion *C. abyssinica* i *C. sativa*

Dalsza część charakterystyki biochemicznej badanych lipaz dotyczyła wpływu pH na ich aktywność. W testach zastosowano trzy bufony inkubacyjne: 0,1 M bufor cytrynianowy (zakres pH 3 do 6), 0,1 M HEPES (zakres pH 7 do 8) i 0,1 M Tris-HCl (zakres pH 8,5 do 10). Wszystkie z wykorzystywanych buforów inkubacyjnych zawierały 5 mM CaCl₂. Reakcje

prowadzono w 30°C przez okres 5 minut. Wykazano, że lipazy kiełkujących nasion *C. abyssinnica* i *C. sativa* są aktywne wobec tri-[¹⁴C]18:1-TAG w szerokim zakresie wartości pH (**Rycina 25**), z aktywnością enzymatyczną zaobserwowaną od pH 3 do pH 10. W przypadku obu analizowanych gatunków roślin, aktywność lipaz frakcji mikrosomalnej z kiełkujących nasion była najwyższa i kształtowała się na stosunkowo stałym poziomie przy wartościach pH od 7 do 8,5. Maksymalną aktywność enzymatyczną zaobserwowano przy pH 7 w przypadku lipaz kiełkujących nasion *C. abyssinnica* oraz pH 8 w przypadku lipaz kiełkujących nasion *C. sativa*. Aktywność enzymatyczna lipaz kiełkujących nasion obu roślin w zakresie pH od 4 do 6 wynosiła około 30-40% aktywności maksymalnej. Aktywność odnotowana dla pH 3-3,5 wynosiła dla lipaz kiełkujących nasion *C. sativa* 6-8% aktywności maksymalnej, a dla lipaz kiełkujących nasion *C. abyssinnica* około 10-20% aktywności maksymalnej. Zwiększenie pH z 9 do 9,5 drastycznie obniżało aktywność lipaz kiełkujących nasion obu gatunków; u *C. sativa* do około 10%, a u *C. abyssinnica* do około 20% aktywności maksymalnej.

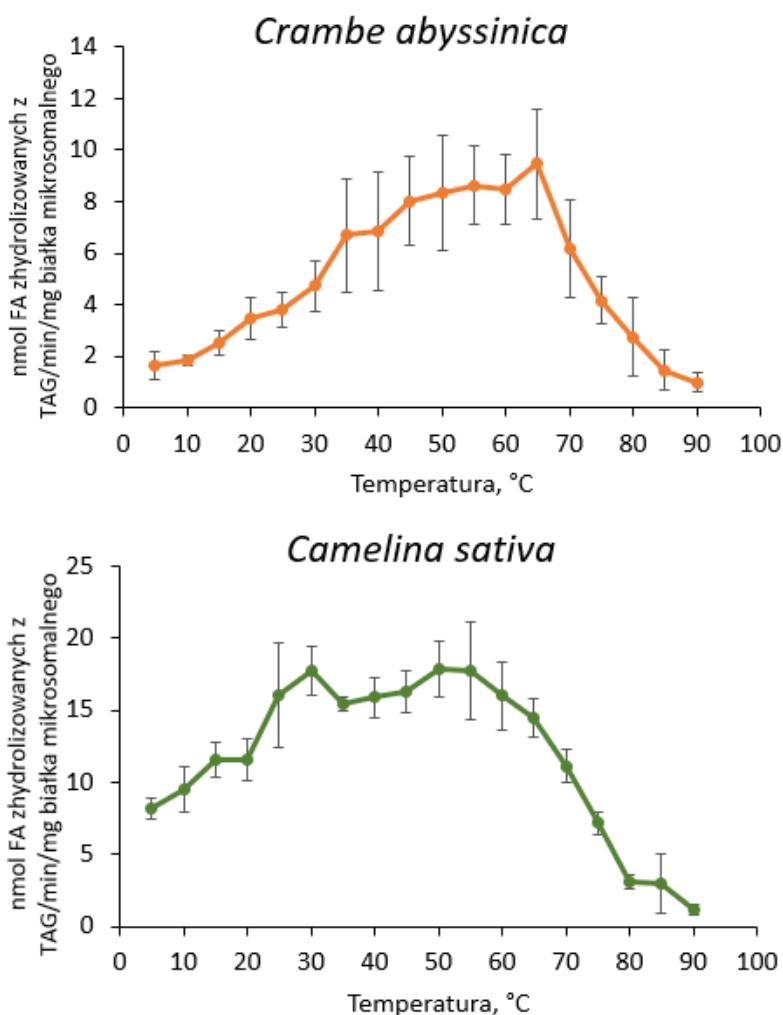


Rycina 25. Wpływ pH na aktywność lipaz kiełkujących nasion *Crambe abyssinica* (panel górny) i *Camelina sativa* (panel dolny) w stosunku do triacyloglicerolu (tri- ^{14}C]18:1-TAG). Na wykresach przedstawiono wartości średnie \pm odchylenie standardowe, $n \geq 2$. FA: kwas tłuszczowy

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w 6. dniu kiełkowania lub *C. sativa* w 3. dniu kiełkowania, substrat {30 (*C. sativa*) lub 25 (*C. abyssinica*) nmol ^{14}C]TAG/test} dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl buforu inkubacyjnego; inkubację przeprowadzano w 30 $^{\circ}\text{C}$ przez okres 5 minut. Jako bufor inkubacyjny zastosowano 0,1 M bufor cytrynianowy (zakres pH 3 do 6), 0,1 M HEPES (zakres pH 7 do 8) i 0,1 M Tris-HCl (zakres pH 8,5 do 10). Wszystkie z wykorzystywanych buforów inkubacyjnych zawierały 5 mM CaCl_2 . Przy przeliczaniu aktywności na mg białka mikrosomalnego stosowano przelicznik: 1 nmol mikrosomalnej fosfatydylocholiny = 4,4 μg białka mikrosomalnego.

4.2.2.4 Wpływ temperatury na aktywność lipaz kiełkujących nasion *C. abyssinica* i *C. sativa*

Kolejnym etapem charakterystyki biochemicznej testowanych lipaz było określanie wpływu temperatury na ich aktywność. W przeprowadzonych testach zastosowano, jako bufor inkubacyjny 0,1 M HEPES (pH 7,5) z dodatkiem 5 mM CaCl₂. Aktywność lipaz kiełkujących nasion kataranu abisyńskiego (*Crambe abyssinica*) i lnicznika siewnego (*Camelina sativa*) w stosunku do tri-[¹⁴C]18:1-TAG badano w zakresie temperatur od 5 °C do 90 °C, zwiększając temperaturę reakcji każdorazowo o 5 °C. W przypadku testów z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. abyssinica* zaobserwowano stopniowy wzrost aktywności lipaz przy wzroście temperatury reakcji od 5 °C do 65 °C. Dalszy wzrost temperatury do 90 °C skutkował stopniowym obniżeniem aktywności enzymatycznej aż do około 10% aktywności maksymalnej odnotowanej dla temperatury 65 °C (**Rycina 26**, panel górny). W przypadku testów z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. sativa* obserwowano również stopniowy wzrost aktywności enzymatycznej lipaz, ale tylko w zakresie temperatur od 5 °C do 30 °C. W zakresie temperatur od 30 °C do 60 °C aktywność enzymatyczna lipaz utrzymywała się na podobnym poziomie, po czym stopniowo zaczynała spadać wraz z dalszym wzrostem temperatury i w 90 °C wynosiła już tylko około 10% aktywności maksymalnej (**Rycina 26**, panel dolny). W najniższej z testowanych temperatur (5 °C) lipazy kiełkujących nasion *C. sativa* zachowywały około 50% aktywności maksymalnej, zaś lipazy kiełkujących nasion *C. abyssinnica* tylko około 10% aktywności maksymalnej (**Rycina 26**). Po 15-minutowej preinkubacji (przed liofilizacją) testowanych frakcji mikrosomalnych w 90 °C, lipazy zarówno kiełkujących nasion *C. sativa*, jak i *C. abyssinnica* traciły całkowicie swoją aktywność enzymatyczną (**Rycina S1**).



Rycina 26. Wpływ temperatury na aktywność lipaz kiełkujących nasion *Crambe abyssinica* (górny panel) i *Camelina sativa* (dolny panel) w stosunku do tri- ^{14}C]18:1-TAG. Na wykresach przedstawiono wartości średnie \pm odchylenie standardowe, $n \geq 2$. FA: kwas tłuszczowy, TAG: triacyloglicerol

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholin) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w 6. dniu kiełkowania lub *C. sativa* w 3. dniu kiełkowania, substrat ($\{30$ (*C. sativa*) lub 25 (*C. abyssinica*) nmol ^{14}C]TAG/test)) dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,5) z 5 mM CaCl_2 ; inkubację przeprowadzano przez 5 minut (*C. abyssinica*) lub 2,5 minuty (*C. sativa*) w odpowiednich temperaturach. Przy przeliczaniu aktywności na mg białka mikrosomalnego stosowano przelicznik: 1 nmol mikrosomalnej fosfatydylocholin = 4,4 μg białka mikrosomalnego.

4.2.2.5 Specyficzność substratowa lipaz kiełkujących nasion *Camelina sativa* i *Crambe abysinnica*

W badaniach wstępnych próbowano ustalić, jakie lipidy mogą być substratami badanych lipaz. W przypadku frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion *C. sativa*

do testów wykorzystano [^{14}C]TAG, [^{14}C]MAG, [^{14}C]WE, [^{14}C]PE (**Tabela 14**) i [^{14}C]DAG (**Rycina S2**; dane nie pokazane w Tabeli 13, ponieważ warunki reakcji odbiegały nieco od tych zastosowanych dla pozostałych substratów). Oprócz znakowanej fosfatydyloetanolaminy (sn-1-18:1-sn-2-[^{14}C]18:1-PE) wszystkie pozostałe substraty były wykorzystywane przez badane lipazy. Najlepiej z badanych substratów (w zastosowanych warunkach reakcji) wykorzystywany był tri-[^{14}C]18:1-TAG (**Tabela 14**) i di-[^{14}C]18:1-DAG (podobny stopień wykorzystania; **Rycina S2**). Nieco słabiej wykorzystywany był sn-2-[^{14}C]18:1-MAG (około 60% wydajności odnotowanej dla [^{14}C]TAG) i najsłabiej 18:1-OH-[^{14}C]18:1-WE (około 1/3 wydajności odnotowanej dla [^{14}C]TAG). Badania te pokazały, więc że lipazy kiełkujących nasion *C. sativa* wykazują nieco podobną preferencję w stosunku do badanych substratów jak lipazy kiełkujących nasion jojoba. W obu przypadkach substratem preferencyjnie wykorzystywanym przez badane lipazy były triacyloglicerole. Woski hydrolyzowane były z około 1/3 efektywności wykazywanej w stosunku do TAG, a lipidy polarne nie były hydrolyzowane lub hydrolyzowane w śladowych ilościach (**Tabele 4 i 14**).

W testach z frakcją mikrosomalną z kiełkujących nasion *C. abyssinica* do testów wykorzystano [^{14}C]TAG, [^{14}C]MAG, [^{14}C]WE (**Tabela 15**) i [^{14}C]DAG (**Rycina S2**; dane nie pokazane w Tabeli 14, jako że test został wykonany w jednym powtórzeniu). W testach tych zastosowano już optymalną temperaturę reakcji i optymalny skład buforu inkubacyjnego. Pomimo to odnotowane aktywności badanych lipaz w stosunku do tri-[^{14}C]18:1-TAG były niższe niż te odnotowane dla lipaz z kiełkujących nasion *C. sativa* w stosunku do tego substratu, natomiast w stosunku do sn-2-[^{14}C]18:1-MAG i di-[^{14}C]18:1-DAG były nawet wyższe niż te odnotowane dla lipaz kiełkujących nasion *C. sativa* (**Tabele 14 i 15**; **Rycina S2**). Co się tyczy wykorzystywania wosków przez lipazy kiełkujących nasion *C. abyssinica* to, mimo iż generalnie aktywność tych enzymów w stosunku do wosków była niższa niż ich odpowiedników z kiełkujących nasion jojoba (**Rycina 20**) czy *C. sativa* (**Tabela 14**),

to stosunek intensywności hydrolizy TAG do intensywności hydrolizy wosków był lepszy w przypadku lipaz kiełkujących nasion *C. abyssinica*. W tym ostatnim przypadku aktywność lipaz w stosunku do wosków wynosiła około 50% aktywności w stosunku do TAG, podczas gdy w przypadku lipaz kiełkujących nasion jojoba i *C. sativa* było to nieco powyżej 30%. W badaniach prezentowanych w **Tabeli 15** ilość stosowanych w testach wosków była mniejsza niż ilość stosowanych triacylogliceroli, jednakże badania prezentowane w kolejnym akapicie tego rozdziału, dotyczące wpływu ilości dodawanego wosku wykazują, że procent jego hydrolizy nie był zbyt zależny od ilości dodawanego do reakcji wosku (**Tabela 16**), tak więc wydaje się, że przeprowadzone porównanie jest zasadne.

Tabela 14. Aktywność lipaz frakcji mikrosomalnej z kiełkujących nasion lnicznika siewnego (*Camelina sativa*) w stosunku do różnych substratów

Aktywność lipaz	[¹⁴ C] substrat (10 nmol/reakcja)			
	Tri-[¹⁴ C]18:1-TAG	Sn-2-[¹⁴ C]18:1-MAG	18:1-OH-[¹⁴ C]18:1-WE	Sn-1-18:1-sn-2-[¹⁴ C]18:1-PE
% [¹⁴ C]18:1 substratów we frakcji FA	49,5 ± 1,3	29,8 ± 1,7	13,4 ± 1,6	Ilości śladowe

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n ≥ 2.

Warunki reakcji: zawiesiny frakcji mikrosomalnych (zawierające 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowane z kiełkujących nasion *C. sativa* w 3. dniu podkiełkowania; substraty dodawano do wysuszonych na zimno ('freeze-dried') mikrosomów rozpuszczone w 19 µl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 µl 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,2); inkubowano przez 5 minut w 35 °C. FA, wolne kwasy tłuszczowe.

Tabela 15. Aktywność lipaz frakcji mikrosomalnej z kiełkujących nasion katroanu abisyńskiego (*Crambe abyssinica*) w stosunku do różnych substratów

Aktywność lipaz	[¹⁴ C] substrat (TAG i MAG, 20 nmol/reakcja; WE, 2,5 nmol/reakcja)		
	Tri-[¹⁴ C]18:1-TAG	Sn-2-[¹⁴ C]18:1-MAG	18:1-OH-[¹⁴ C]18:1-WE
% [¹⁴ C]18:1 substratów we frakcji FA	14,5 ± 1,0	44,5 ± 1,5	7,7 ± 2,3

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n ≥ 2. FA, wolne kwasy tłuszczowe.

Warunki reakcji: zawiesiny frakcji mikrosomalnych (zawierające 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowane z kiełkujących nasion *C. abyssinica* w 6. dniu podkiełkowania; substraty dodawano do wysuszonych na zimno ('freeze-dried') mikrosomów rozpuszczone w 19 µl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 µl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,5) z dodatkiem 5 mM CaCl₂; inkubacje przeprowadzano w 60 °C przez 10 minut.

W dalszych badaniach dotyczących specyficzności substratowej lipaz kiełkujących nasion *C. abyssinica* oraz *C. sativa* skupiono się na badaniach specyficzności tych enzymów w stosunku do różnych wosków. Podobnie jak w badaniach dotyczących specyficzności substratowej lipaz kiełkujących nasion jojoba, nie uwzględniano różnych rodzajów

triacylogliceroli, tj. cząsteczek TAG z różnymi kwasami tłuszczowymi. Ponieważ ilość znakowanych węglem [^{14}C] wosków była limitowana (stosunkowo trudna i kosztowna synteza; brak dostępności komercyjnej), badania rozpoczęto od sprawdzenia wpływu ilości dodawanego do testu [^{14}C]wosku na efektywność jego hydrolizy (% zhydrolizowanego wosku w czasie trwania reakcji z taką samą ilością frakcji mikrosomalnej). W badaniach wykorzystano 12:0-OH- ^{14}C 18:1-WE oraz frakcje mikrosomalne z kiełkujących nasion *C. sativa* oraz kiełkujących nasion *C. abyssinica*. W każdym z testów zagęszczenie frakcji mikrosomalnych było takie samo (2,5 nmol endogennego PC/test) natomiast zmieniała się ilość dodawanych wosków: 2,5 nmol/test, 5 nmol/test, 10 nmol/test oraz 20 nmol/test. Reakcje prowadzono przez okres 5 i 10 minut w optymalnych temperaturach. Ilość zhydrolizowanego wosków w testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. sativa* po 5 minutach reakcji wahała się od około 11,3% do około 13,3% i nie była skorelowana z ilością wosku dodawanego do reakcji. Po 10 minutach reakcji ilość ta wynosiła około 20,6% w testach z dodatkiem 2,5 nmol wosku i zmniejszała się nieco wraz z ilością dodawanego do testu wosku; przy 20 nmol dodanego wosku było to około 18%. W testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. abyssinica* ilość zhydrolizowanego wosku po 5 minutach reakcji wahała się od około 12,6% do około 14,4%, jednakże nie zaobserwowano wyraźnych korelacji pomiędzy ilością dodawanego wosku, a procentową wartością jego hydrolizy. Po 10 minutach reakcji ilość zhydrolizowanego wosku wahała się od około 22,9% do około 25,1% (**Tabela 16**). Uznano, więc że w dalszych badaniach dotyczących specyficzności badanych lipaz w stosunku do różnych wosków dodawanie po 2,5 nmol [^{14}C] wosku/test będzie wystarczająco reprezentatywne.

Tabela 16. Wpływ ilości dodawanego wosku na stopień jego hydrolizy w testach z taką samą ilością frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion *C. sativa* i z kiełkujących nasion *C. abyssinica*

Ilość dodanego wosku 12:0-OH- [¹⁴ C]18:1 [nmol/test]	% zhydrolizowanego wosku			
	<i>C. sativa</i> – czas reakcji		<i>C. abyssinica</i> – czas reakcji	
	5 minut	10 minut	5 minut	10 minut
2,5	11,7 ± 2,9	20,6 ± 0,5	14,4 ± 2,6	24,6 ± 4,3
5	13,3 ± 0,0	19,6 ± 2,9	14,9 ± 3,6	25,1 ± 0,2
10	12,7 ± 2,9	18,1 ± 2,0	12,6 ± 1,9	23,3 ± 3,1
20	11,3 ± 1,0	18,0 ± 0,5	13,5 ± 2,3	22,9 ± 0,4

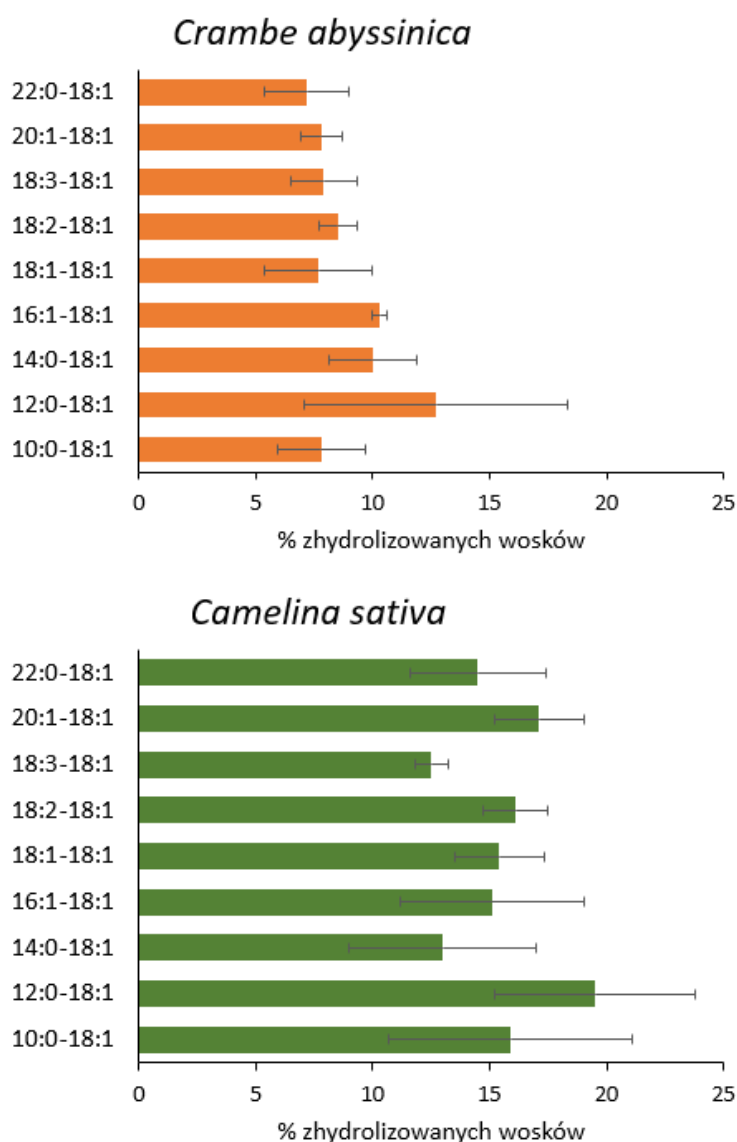
Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n ≥ 2.

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholino) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w 6. dniu kiełkowania lub *C. sativa* w 3. dniu kiełkowania, substrat (od 2,5 do 20 nmol [¹⁴C]WE/test) dodawano rozpuszczony w 19 µl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 µl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,5) z dodatkiem 5 mM CaCl₂; inkubację przeprowadzano w 60 °C (*C. abyssinica*) lub 55 °C (*C. sativa*) przez 10 minut.

W badaniach specyficzności lipaz z kiełkujących nasion *C. abyssinica* i *C. sativa* w stosunku do różnych wosków wykorzystano 9 wosków posiadających alkohole tłuszczowe o różnej długości łańcucha węglowego (10:0-OH, 12:0-OH, 14:0-OH i 22:0-OH) i różnej ilości wiązań podwójnych (16:1-OH, 18:1-OH, 18:2-OH, 18:3-OH i 20:1-OH) oraz [¹⁴C]18:1 jako kwas tłuszczowy (**Rycina 27**). Woski te zostały zsyntetyzowane w Pracowni Biochemii Roślin, jako że tego typu związki są niedostępne komercyjnie.

Wszystkie z badanych wosków były hydrolizowane przez lipazy kiełkujących nasion *C. abyssinica* oraz *C. sativa*. Generalnie lipazy z kiełkujących nasion *C. sativa* wykazywały trochę wyższą aktywność (od około 10% do 19%) w porównaniu do lipaz z kiełkujących nasion *C. abyssinica* i aktywność ta była tylko trochę niższa od aktywności odnotowanej dla lipaz z

kiełkujących nasion jojoba (**Ryciny 20 i 27**). Spośród testowanych wosków najlepiej wykorzystywany był wosk z średniołańcuchowym nasyconym alkoholem tłuszczowym – 12:0-OH-[¹⁴C]18:1. Był on hydrolizowany w testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. sativa* o około 14-64% szybciej niż pozostałe wykorzystywane do badań woski, a w testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. abyssinica* szybciej o około 72-145%. W testach z mikrosomami *C. abyssinica* woski z 14:0-OH i z 16:1-OH wykorzystywane były również nieco bardziej efektywnie (o około 17-40%) niż pozostałe testowane woski. W testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. sativa* takiej tendencji jednak nie zaobserwowano. W tych testach stosunkowo dobrze wykorzystywany był natomiast wosk „20:1-OH-[¹⁴C]18:1”, tylko o około 12% słabiej niż najlepiej wykorzystywany „12:0-OH-[¹⁴C]18:1” (**Rycina 27**).



Rycina 27. Specyficzność substratowa lipaz z kiełkujących nasion *C. abyssinica* (górny panel) i *C. sativa* (dolny panel) w stosunku do różnych nasyconych i nienasyconych wosków. Na wykresach przedstawiono wartości średnie z 2 do 6 powtórzeń \pm odchylenie standardowe. W skrótach nazw wosków (oś OY) pierwszy komponent to skrót nazwy alkoholu tłuszczowego, a drugi to skrót nazwy kwasu tłuszczowego.

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w 6. dniu kiełkowania lub *C. sativa* w 3. dniu kiełkowania, substraty (2,5 nmol [^{14}C]WE/test) dodawano rozpuszczone w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,5) z dodatkiem 5 mM CaCl_2 ; inkubację przeprowadzano w 60 $^\circ\text{C}$ (*C. abyssinica*) lub 55 $^\circ\text{C}$ (*C. sativa*) przez 10 minut.

4.2.2.6 Synteza wosków w reakcjach z mikrosomami z kiełkujących nasion *Crambe abyssinica* i *Camelina sativa*

Badania zdolności testowanych frakcji mikrosomalnych do syntezy wosków przeprowadzono wykorzystując znakowany węglem [^{14}C] kwas oleinowy ([^{14}C]18:1-FA) oraz nieznakowany alkohol oleinowy (18:1-OH). W testach, w których zastosowano jedynie [^{14}C]18:1-FA, radioaktywność lokalizująca się na płytkach TLC w miejscu lokalizacji wosków/estrów steroli była bardzo niska. W testach z mikrosomami z *C. sativa* średnio wynosiła 0,13-0,15%, a w testach z mikrosomami z *C. abyssinica* wahała się w granicach 0,17-1,3% radioaktywności dodanej (**Tabela 17**). Dodatek do buforu inkubacyjnego DTNB (związek wiążący wolny CoA; Bufor C i Bufor D) całkowicie hamowało powstawanie [^{14}C]wosku/estru steroli w testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. sativa* i nie wpływało (Bufor B i Bufor C) na powstawanie tego związku, lub stymulowało jego powstawanie (Bufor D) w testach z mikrosomami z *C. abyssinica*. W testach z tymi mikrosomami jego syntezę stymulowało także dodanie do buforu inkubacyjnego ATP (testy z Buforami B i C). Zastosowanie w testach (jako egzogennych substratów) mieszaniny [^{14}C]18:1-FA z 18:1-OH znacząco zwiększyło syntezę [^{14}C]związku lokalizująca się na płytkach TLC w miejscu lokalizacji wosków/estrów steroli. Ponieważ wszystkie pozostałe warunki reakcji pozostały takie same, należy założyć, że powstający tym razem radioaktywny produkt to głównie [^{14}C]wosk (18:1-OH-[^{14}C]18:1). W testach z mikrosomami z *C. abyssinica* ilość dodanej do testów radioaktywności lokalizującej się w tym produkcie wahała się w granicach od 4,2 do 15,2%, a w testach z mikrosomami z *C. sativa* od 1,4 do 12,1% (**Tabela 17**). Synteza ta w przypadku testów z frakcją mikrosomalną z *C. sativa* wydaje się być częściowo zależna od CoA. Dodatek tego związku zwiększał syntezę [^{14}C]wosku z około 1 nmol (5,5% radioaktywności dodanej; Bufor A) do około 2,4 nmol (12,1% radioaktywności dodanej; Bufor B). Dodatek zarówno CoA, jak i DTNB (związku wiążącego wolny CoA) równocześnie obniżał jego syntezę do poziomu odnotowanego w Buforze A (bufor bez dodatku

CoA, ATP, DTNB). Dodatek ATP nie miał wpływu na intensywność syntezy [¹⁴C]wosku w testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. sativa* (synteza ta w testach z Buforem A i Buforem C była porównywalna). Zmniejszenie ilości syntetyzowanego [¹⁴C]wosku po dodaniu tylko DTNB (Bufor D) jest trudne do wyjaśnienia, przy założeniu, że frakcja mikrosomalna nie zawiera wolnego CoA. Należałoby w tym przypadku założyć, że DTNB wpływa w inny sposób na aktywność enzymów syntetyzujących [¹⁴C]woski niż poprzez usuwanie ze środowiska reakcji wolnego CoA. To założenie potwierdzałyby również testy z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. abyssinica*. W tym przypadku dodatek DTNB wpływał jednak stymulująco na syntezę [¹⁴C]wosku, zarówno w testach z dodatkiem samego [¹⁴C]18:1-FA, jak i w testach z dodatkiem [¹⁴C]18:1-FA i 18:1-OH. Różnice były tylko w ilości syntetyzowanych wosków w obu rodzajach testów (Bufory A i D; **Tabela 17**). W odróżnieniu od testów z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. sativa*, w testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. abyssinica* dodatek wolnego CoA nie zwiększał ilości syntetyzowanego [¹⁴C]wosku (jego ilość była podobna z w testach z Buforem B, jak i Buforem C zawierającym oprócz ATP i CoA również DTNB). W przeciwieństwie również do testów z mikrosomami *C. sativa*, w testach z mikrosomami *C. abyssinica* dodatek ATP zwiększał syntezę [¹⁴C]wosku (Bufor A i Bufory B i C; **Tabela 17**).

Omówione powyżej wyniki testów wykazały, że enzymy zawarte we frakcjach mikrosomalnych z kiełkujących nasion zarówno *C. sativa*, jak i *C. abyssinica* posiadają zdolność do syntezy wosków, jednakże enzymy zaangażowane w tę syntezę podlegają różnej regulacji przez testowane kofaktory (ATP, CoA, DTNB). Aby sprawdzić, czy zaobserwowany wpływ badanych kofaktorów będzie podobny w temperaturze inkubacji innej niż optymalna dla aktywności lipaz znajdujących się w testowanych frakcjach mikrosomalnych, przeprowadzono podobne testy z zastosowaniem [¹⁴C]18:1-FA i 18:1-OH w temperaturze 30 °C. W testach tych dodatkowo sprawdzano wpływ tetrahydrolipstatyny (znanego inhibitora

lipaz) na intensywność syntezy [^{14}C]wosku. Obniżenie temperatury reakcji nie wpłynęło na ilość syntetyzowanych wosków w testach z Buforem A. Zmniejszyło jednak efektywność wpływu testowanych kofaktorów na intensywność syntezy [^{14}C]wosku, pomimo iż wpływ ten pozostał podobny do tego obserwowanego w testach z temperaturą inkubacji optymalną dla lipaz znajdujących się w badanych mikrosomach (**Tabela 17** i **Tabela 18**). W odróżnieniu od testów z mikrosomami z kiełkujących nasion jojoba, w których dodatek tetrahydrolipstatyny całkowicie hamował syntezę wosków (**Tabela 7**), jej dodatek w testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. abyssinica* i *C. sativa* jedynie spowalniał ten proces odpowiednio o około 36 i 64% (**Tabela 18**). Wydaje się jednak, że lipazy z tych nasion są jednak mniej wrażliwe na tetrahydrolipstatynę niż lipazy z kiełkujących nasion jojoba, których aktywność w testach z tri- ^{14}C 18:1-TAG była całkowicie hamowana przez ten inhibitor (**Tabela 7**). Aktywność lipaz z kiełkujących nasion *C. abyssinica* i *C. sativa* w stosunku do tri- ^{14}C 18:1-TAG była hamowana przez 20 mM tetrahydrolipstatynę jedynie w około 45% (*C. abyssinica*) i około 48% (*C. sativa*) (**Tabela 19**).

Tabela 17. Synteza wosków *in vitro* przez frakcje mikrosomalne z kiełkujących nasion *Crambe abyssinica* i *Camelina sativa* w optymalnej temperaturze dla zawartych w nich lipaz

Egzogenne substraty	Zsyntetyzowane [¹⁴ C]woski (% radioaktywności dodanej do reakcji)							
	Testy z mikrosomami z <i>C. abyssinica</i>				Testy z mikrosomami z <i>C. sativa</i>			
	Bufor A	Bufor B	Bufor C	Bufor D	Bufor A	Bufor B	Bufor C	Bufor D
[¹⁴ C]18:1-FA (20 nmol/reakcja)	0,17^b ±0,05	1,3^a ±0,4	1,2^a ±0,2	0,9^a ±0,1	0,13 ±0,04	0,15 ±0,15	0,0	0,0
[¹⁴ C]18:1-FA + 18:1-OH (20 nmol każdego/reakcja)	4,2^b ±0,1	14,4^a ±1,9	15,2^a ±0,1	8,6^a ±0,8	5,5^b ±0,8	12,1^a ±0,9	4,8^b ±0,1	1,4^{ab} ±0,10

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n ≥ 2; ^a – statystycznie istotna różnica pomiędzy aktywnością enzymatyczną w Buforze A a aktywnością odnotowaną w pozostałych buforach, ^b – statystycznie istotna różnica pomiędzy aktywnością enzymatyczną w Buforze B a aktywnością odnotowaną w pozostałych buforach, w dwustronnym teście różnic średnich przy $\alpha = 0,05$

Bufor A: 0,1 M HEPES (pH 7,5) z 5 mM CaCl₂

Bufor B: bufor A z dodatkiem 0,3 μmol CoA i 0,3 μmol ATP/reakcja

Bufor C: bufor A z dodatkiem 0,3 μmol CoA, 0,3 μmol ATP i 0,7 μmol DTNB/reakcja

Bufor D: bufor A z dodatkiem 0,7 μmol DTNB/reakcja

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholino) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w 6. dniu kiełkowania lub *C. sativa* w 3. dniu kiełkowania, egzogenne substraty (20 nmol/test) dodawano rozpuszczone w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl buforu inkubacyjnego; inkubację przeprowadzano w 60 °C (*C. abyssinica*) lub 55 °C (*C. sativa*) przez 10 minut.

Tabela 18. Synteza wosków *in vitro* przez frakcje mikrosomalne z kiełkujących nasion *Crambe abyssinica* i *Camelina sativa* w 30 °C

Mikrosomy wykorzystane w testach	Zsyntetyzowane [¹⁴ C]woski z egzogennych substratów: [¹⁴ C]18:1-FA + 18:1-OH (20 nmol każdego/reakcja)				
	[% radioaktywności dodanej do reakcji]				
	Bufor A	Bufor B	Bufor C	Bufor D	Bufor E
Testy z mikrosomami z <i>C. abyssinica</i>	5,3 ±0,3	6,2 ±1,2	7,5 ±1,4	6,8 ±1,0	3,4^{ab} ±0,3
Testy z mikrosomami z <i>C. sativa</i>	5,2^b ±0,9	8,9^a ±0,4	7,0^b ±0,7	4,6^b ±0,9	1,9^{ab} ±0,3

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n ≥ 2; ^a – statystycznie istotna różnica pomiędzy aktywnością enzymatyczną w Buforze A i aktywnością odnotowaną w pozostałych buforach, ^b – statystycznie istotna różnica pomiędzy aktywnością enzymatyczną w Buforze B a aktywnością odnotowaną w pozostałych buforach w dwustronnym teście różnic średnich przy $\alpha = 0,05$

Bufor A: 0,1 M HEPES (pH 7,5) z 5 mM CaCl₂

Bufor B: bufor A z dodatkiem 0,3 μmol CoA i 0,3 μmol ATP/reakcja

Bufor C: bufor A z dodatkiem 0,3 μmol CoA, 0,3 μmol ATP i 0,7 μmol DTNB/reakcja

Bufor D: bufor A z dodatkiem 0,7 μmol DTNB/reakcja

Bufor E: bufor A z dodatkiem 20 mM tetrahydrolipstatyny

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w 6. dniu kiełkowania lub *C. sativa* w 3. dniu kiełkowania, egzogenne substraty (20 nmol/test) dodawano rozpuszczone w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl buforu inkubacyjnego; inkubację przeprowadzano w 30 °C przez 10 minut.

Tabela 19. Wpływ tetrahydrolipstatyny na aktywność lipaz frakcji mikrosomalnych wyizolowanych z kiełkujących nasion *Crambe abyssinica* i *Camelina sativa*

Warunki testu	% [¹⁴ C] w wolnych kwasach tłuszczowych	
	Testy z mikrosomami z <i>C. abyssinica</i>	Testy z mikrosomami z <i>C. sativa</i>
Tri-[¹⁴ C]18:1-TAG (20 nmol/test)	10,4 ± 1,0	29,7 ± 1,4
Tri-[¹⁴ C]18:1-TAG (20 nmol/test) + 20 mM tetrahydrolipstatyna	5,7 ^a ± 0,4	15,7 ^a ± 4,5

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n ≥ 2; ^a – statystycznie istotna różnica pomiędzy kontrolą a testami z dodatkiem tetrahydrolipstatyny w dwustronnym teście różnic średnich przy α = 0,05

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w 6. dniu kiełkowania lub *C. sativa* w 3. dniu kiełkowania, tri-[¹⁴C]18:1-TAG (20 nmol/test) dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl buforu inkubacyjnego {0,1 M HEPES (pH 7,5) z 5 mM CaCl₂} bez dodatku lub z dodatkiem 20 mM tetrahydrolipstatyny i inkubowano w 30 °C przez 10 minut.

4.3 Mobilizacji lipidów zapasowych w kiełkujących nasionach *Camelina sativa* linii transgenicznych magazynujących woski

Po wykazaniu, że zarówno lipazy kiełkujących nasion *Crambe abyssinica*, jak i *Camelina sativa* są zdolne do hydrolizy wosków w warunkach *in vitro*, kolejnym etapem badań było sprawdzenie, czy lipazy te mogą hydrolizować również woski znajdujące się w nasionach transgenicznych linii tych gatunków zdolnych do ich syntezy i magazynowania. Linie takie zarówno *C. abyssinica*, jak i *C. sativa* zostały wytworzone w ramach międzynarodowego projektu ICON finansowanego częściowo przez Unię Europejską, którego częścią były również badania prezentowane w ramach niniejszej pracy. W ramach współpracy Pracownia Biochemii Roślin MWB UG i GUMed otrzymała 2 linie nasion transgenicznych odmian *Camelina sativa*. Obie linie zostały transformowane genami sklonowanymi z jojoba (*Simmondsia chinensis*) odpowiedzialnymi za syntezę wosków, tj. genem kodującym reduktazę kwasów tłuszczowych i genem kodującym syntazę wosków. W wyniku transformacji tymi genami roślin *C. sativa* odmiany „Suneson” (pracownia prof. Eda Cahoon; USA) otrzymano rośliny, które w swoich nasionach jako materiał zapasowy, poza triacyloglicerolami, magazynowały również woski. Otrzymana linia o nr. 365 posiadała ich około 20% spośród lipidów zapasowych nasion a druga linia o nr. 3414 około 18%. Nasiona tych linii, z morfologicznego punktu widzenia, nie różniły się od nasion typu dzikiego *Camelina sativa*. W toku prac eksperymentalnych zaobserwowano jednak, że rozwijające się z nich siewki różniły się morfologicznie od siewek roślin typu dzikiego i rozwijały się nieco wolniej od nich. Transgeniczne linie *C. abyssinica* akumulujące woski wytworzone zostały w pracowni prof. Stena Stymne (Szwecja). Naukowcy z tej grupy badawczej posiadali jednak możliwość przeprowadzenia badania mobilizacji wosków podczas kiełkowania nasion tych transgenicznych linii *C. abyssinica* i postanowili wykonać je w obrębie swojego zespołu badawczego. W związku z tym nie były one przekazane do naszej Pracowni do przeprowadzenia odpowiednich testów.

Podkiełkowanie nasion otrzymanych transgenicznych linii *C. sativa* prowadzono na szalkach Petriego wyłożonych bibułą filtracyjną zwilżoną wodą destylowaną. Podobnie jak to miało miejsce w przypadku nasion *C. sativa* typu dzikiego (**Tabela 10**), podkiełkowanie prowadzono przez okres 5 dni. Badania rozpoczęto od linii „365”. W dniu „0” i w kolejnych dniach podkiełkowania do analiz pobierano po 10 nasion lub po wykształceniu się siewek kotyledony z 10 siewek. Uzyskane ekstrakty chloroformowe zawierające lipidy rozdzielano na płytkach TLC stosując, jako układ rozwijający „heksan: eter di-etylowy: kwas octowy; 70:30:1”. W wyniku rozdziału wydzielono następujące klasy lipidów: lipidy polarne (jako jedna klasa), diacyloglicerole (DAG), wolne kwasy tłuszczowe (FA), triacyloglicerole (TAG) i woski (WE). Zawartość kwasów tłuszczowych/alkoholi tłuszczowych w wydzielonych klasach lipidów analizowana była metodą chromatografii gazowej (dokładny opis w Materiałach i Metodach). Oprócz badań wstępnych, doświadczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach biologicznych, a ich wyniki przedstawiono w **Tabeli 20** i na **Rycinie 28**. Głównymi klasami lipidów w analizowanych ekstraktach były triacyloglicerole (TAG) i woski (WE). W chwili rozpoczęcia kiełkowania lokalizowało się w nich odpowiednio około 67% i około 19,5% wszystkich kwasów tłuszczowych/alkoholi tłuszczowych występujących w acylolipidach badanych nasion. Wraz z czasem podkiełkowania zarówno zawartość TAG, jak i WE w analizowanych nasionach/kotyledonach zaczynała się zmniejszać; zostawała zużywana do procesów związanych z rozwojem siewek. Mobilizacja TAG następowała szybciej niż mobilizacja WE. Już po 1. dniu podkiełkowania ich ilość zmniejszyła się do około 61% wartości początkowej, po 2. dniu do 29%, po 3. dniu do około 18%, po 4. dniu do około 8% a po 5. dniu do około 2% wartości początkowej (**Tabela 20; Rycina 28**). W ciągu 1. dnia kiełkowania ilość WE zmniejszyła się jedynie do około 96% ich wartości początkowej. Po 2. dniu zmalała do około 83%, po 3. dniu do około 68%, po 4. dniu do około 26%, a po 5. dniu do około 18% wartości początkowej (**Tabela 20; Rycina 28**). Bezwzględna zawartość

pozostałych klas lipidów nie podlegała tak wyraźnym zmianom. Zawartość lipidów polarnych (stanowiły one około 8% acylolipidów analizowanych nasion w chwili rozpoczęcia kiełkowania) po 2. i 3. dniu kiełkowania ulegała pewnemu zwiększeniu i dopiero po 5. dniu kiełkowania odnotowano wyraźne ich zmniejszenie. Zawartość DAG (około 4% acylolipidów analizowanych nasion w chwili rozpoczęcia kiełkowania) ulegała zmniejszeniu (z pewnymi wahaniami) wraz z czasem kiełkowania, a zawartość FA (w chwili rozpoczęcia kiełkowania śladowe ilości) zwiększała się nieznacznie do 4. dnia kiełkowania (do około 4 nmol/nasiono) i po 5. dniu kiełkowania ulegała ponownemu zmniejszeniu. Na analizowanych płytkach TLC nie znajdowano wolnych alkoholi tłuszczowych.

Analizę zmian zawartości poszczególnych klas lipidów podczas kiełkowania nasion transgenicznej linii „3414” *C. sativa* rozpoczęto od 2. dnia kiełkowania. W tym czasie skład poszczególnych klas lipidów w kiełkujących nasionach analizowanej linii był podobny do składu acylolipidów kiełkujących nasion linii „365” (**Tabele 20 i 21**). Pomiędzy 2. a 3. dniem kiełkowania zawartość TAG obniżyła się w tej linii o około 45% wartości z 2. dnia kiełkowania, a zawartość WE tylko o około 14% (podobnie jak to odnotowano dla linii „365”). Od 3. dnia kiełkowania szybkość mobilizacji wosków zaczynała się zbliżać do szybkości mobilizacji TAG, podobnie jak to odnotowano wcześniej dla kiełkujących nasion linii „365” (**Tabele 20 i 21**).

Tabela 20. Zawartości poszczególnych klas acylolipidów w kiełkujących nasionach transgenicznej linii „365” (akumulującej woski) *Camelina sativa*

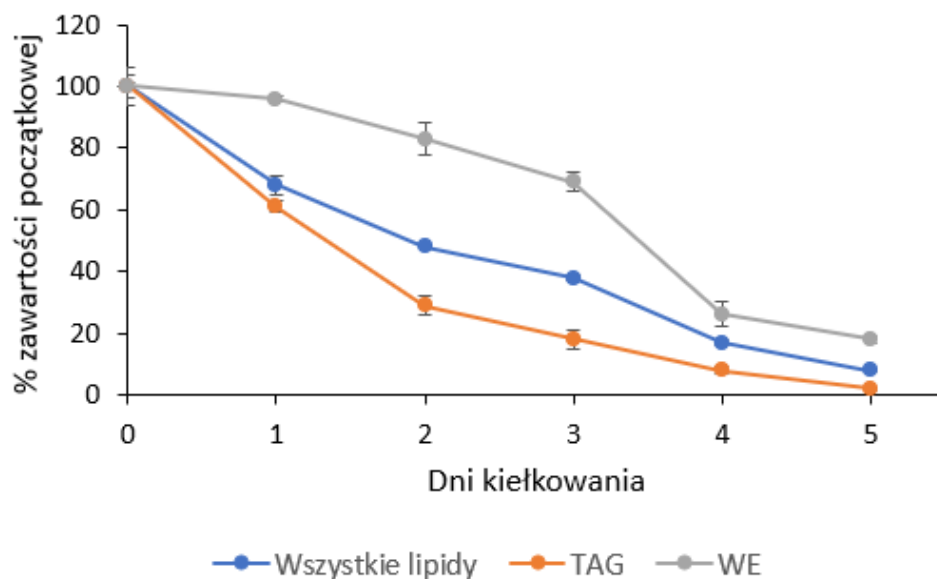
Dni kiełkowania	Σ nmol FA + FA-OH/nasiono					
	Wszystkie lipidy	Lipidy polarne	DAG	FA	TAG	WE
0	1093 ±12	95 ±2	47 ±7	0,0	737 ±30	213 ±13
1	746 ±23	80 ±2	11 ±1	1,6 ±0,1	450 ±22	204 ±2
2	529 ±30	137 ±14	25 ±1	1,4 ±0,3	219 ±6	176 ±10
3	418 ±32	128 ±16	6 ±1	3,2 ±0,4	134 ±8	147 ±7
4	187 ±9	60 ±1	5 ±3	4,5 ±3,2	62 ±10	55 ±9
5	92 ±5	32 ±3	5 ±1	0,8 ±1,0	71 ±1	38 ±2

Wyniki przedstawiają wartości średnie ± odchylenie standardowe z dwóch powtórzeń biologicznych (rozdzielano ekstrakty z 10 nasion/kotyledonów z każdego dnia kiełkowania); DAG, diacyloglicerole; FA, wolne kwasy tłuszczowe; TAG, triacyloglicerole; WE, woski

Tabela 21. Zawartości poszczególnych klas acylolipidów w kiełkujących nasionach transgenicznej linii „3414” (akumulującej woski) *Camelina sativa*

Dni kiełkowania	Σ nmol FA + FA-OH/nasiono					
	Wszystkie lipidy	Lipidy polarne	DAG	FA	TAG	WE
2	526 ±5	94 ±5	12 ±3	1,0 ±0,1	259 ±7	160 ±6
3	390 ±4	95 ±3	13 ±2	1,1 ±0,1	143 ±5	138 ±3
4	203 ±3	58 ±1	5 ±1	0,8 ±0,2	63 ±1	75 ±2
5	83 ±1	30 ±1	1,5 ±0,3	0,5 ±0,1	17 ±1	35 ±2

Wyniki przedstawiają wartości średnie ± odchylenie standardowe z dwóch powtórzeń biologicznych (rozdzielano ekstrakty z 10 nasion/kotyledonów z każdego dnia kiełkowania); DAG, diacyloglicerole; FA, wolne kwasy tłuszczowe; TAG, triacyloglicerole; WE, woski



Rycina 28. Zmiany całkowitej zawartości acylolipidów, triacylogliceroli (TAG) i wosków (WE) w kiełkujących nasionach transgenicznej linii (akumulującej woski) *Camelina sativa* o nr. 365

Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm odchylenie standardowe z dwóch powtórzeń biologicznych (rozdzielano ekstrakty z 10 nasion/kotyledonów z każdego dnia kiełkowania).

5 DYSKUSJA

Badania prezentowane w niniejszej pracy były częścią międzynarodowego projektu o akronimie ICON, którego głównym celem było wytworzenie (opracowanie warunków do takiego wytwarzania) roślin oleistych mogących stanowić dla przemysłu źródło olei (inne niż olej z nasion jojoba, *Simmondsia chinensis*) zawierających woski. Do potencjalnych roślin mogących produkować tego typu oleje, po odpowiednich manipulacjach genetycznych, wytypowano między innymi katroń abisyński (*Crambe abyssinica*) i lnicznik siewny (*Camelina sativa*). Ponieważ brak było danych dotyczących możliwości mobilizacji wosków podczas kiełkowania nasion tego typu potencjalnych nowych transgenicznych gatunków roślin, jednym z celów projektu było scharakteryzowanie właściwości lipaz występujących w kiełkujących nasionach *C. abyssinica* i *C. sativa* i porównanie tych właściwości z właściwościami lipaz występujących w kiełkujących nasionach jojoba.

Jojoba to jedyna poznana roślina, której zapasowym materiałem w nasionach są woski (ang. *wax esters*). Podczas kiełkowania nasion jojoba, zawarte w nich woski są hydrolizowane, a komponenty powstałe po hydrolizie (kwasy tłuszczowe i alkohole tłuszczowe) dalej metabolizowane i przekształcane w procesie glukoneogenezy do węglowodanów wykorzystywanych w dalszych procesach rozwojowych siewek (Moreau i Huang, 1981). Mimo iż głównym celem niniejszej pracy była charakterystyka lipaz kiełkujących nasion roślin oleistych potencjalnie magazynujących/ magazynujących woski, badania rozpoczynano od charakterystyki mobilizacji materiałów zapasowych nasion podczas procesu kiełkowania. Intensywność mobilizacji lipidów podczas procesu kiełkowania została prześledzona w wszystkich trzech badanych gatunkach (*S. chinensis*, *C. abyssinica*, *C. sativa*), ponieważ uznano, że jest ona istotna dla określenia aktywności endogennych lipaz występujących w tych nasionach. Dodatkowo w kiełkujących nasionach jojoba badano zmiany w zawartości białek i wybranych cukrowców. W badaniach przeprowadzonych na kiełkujących nasionach jojoba

wskazano, że podczas pierwszych 26 dni kiełkowania nasion zawartość acylolipidów w nich zawartych, wśród których ponad 95% stanowiły woski) spadała o około 60-70%. Taka obserwacja jest generalnie zgodna ze wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi dotyczącymi mobilizacji wosków w kiełkujących nasionach jojoba (Moreau i Huang, 1977; Rost i in., 1978). Obecne badania wykazują jednak, że profil hydrolizy wosków nie był jednakowy w nasionach pochodzących z różnych akcesji jojoba (rośliny pochodzące z jednego naturalnego miejsca ich występowania, uprawiane dalej z nasion pochodzących z wyselekcjonowanej rośliny, niemające jednak statusu podgatunku czy linii hodowlanej). Przy porównaniach mobilizacji materiałów zapasowych w kiełkujących nasionach jojoba uzyskiwanych w różnych laboratoriach należy, więc uwzględniać również pochodzenie badanych nasion. Niezależnie jednak od analizowanej akcesji, największy spadek zawartości acylolipidów/wosków następował po 7. dniu od rozpoczęcia kiełkowania. Mobilizacja acylolipidów w nasionach *C. abyssinica* oraz *C. sativa* również przebiegała według nieco podobnego wzoru. W pierwszych 3 dniach kiełkowania nasion *C. abyssinica* ilość acylolipidów w nich zawartych zmniejszyła się o około 10%, zaś w trzech następnych dniach o około 24%. W przypadku nasion *C. sativa* ilość acylolipidów w pierwszym dniu kiełkowania zmniejszyła się o około 9%, zaś w następnym dniu o około 38%. Wykorzystanie acylolipidów nasion dla potrzeb rozwijających się siewek wydaje się, więc zależeć od wielkości nasion; po 26. dniu kiełkowania w nasionach jojoba pozostawało ciągle około 30-40% acylolipidów, w nasionach *C. abyssinica* po 14. dniu kiełkowania pozostało ich jeszcze około 40%, zaś w nasionach *C. sativa* po 5. dniu kiełkowania pozostało ich już tylko około 5%. Intensywność mobilizacji acylolipidów zbiegała się z aktywnością lipaz obecnych we frakcjach mikrosomalnych wyizolowanych z kiełkujących nasion w kolejnych dniach ich podkiełkowania; przynajmniej w przypadku mobilizacji lipidów nasion jojoba i *C. abyssinica*. Badania tego typu nie zostały przeprowadzone w stosunku do kiełkujących nasion *C. sativa* jednakże aktywność

lipaz wyizolowanych w 3. dniu podkiełkowania, w czasie intensywnej mobilizacji ich acylolipidów, była wysoka.

Miejszem działania lipaz hydrolizujących acylolipidy są najprawdopodobniej ciała olejowe. Jednakże już w badaniach wcześniejszych, Moreau i Huang (1977) wykazali, że 40% aktywności lipaz w siewkach jojoba po 20 dniach od rozpoczęcia kiełkowania przypadało na ciała woskowe/lipidowe, 40% na frakcję lipidów błonowych/mikrosomalnych a pozostałe 20% na frakcję lipidów rozpuszczalnych. Aktywność lipaz we frakcji błonowej/mikrosomalnej została przypisana pozostałościom błon z ciał woskowych/lipidowych, które pozostały po etapie mobilizacji wosków lub które powstały na skutek uszkodzenia tych organelli w procesie subkomórkowego frakcjonowania (Moreau i Huang, 1977).

Jednymi z najbardziej charakterystycznych białek związanych z membraną otaczającą ciała tłuszczowe (oleosomy) są oleozyny. W niniejszej pracy wykazano, że w nasionach jojoba występują, co najmniej dwie izoformy oleozyn: o masie cząsteczkowej 17 oraz 19,5 kDa. Wyniki te wskazują, więc że jojoba podobnie jak inne gatunki roślin okrytonasiennych posiada oleozyny należące do dwóch klas: wysoko- i niskocząsteczkowych oleozyn (Tzen i in., 1990). Analiza transkryptomyczna rozwijających się nasion jojoba wykazała, że oleozyny akumulowane w jej nasionach mogą być kodowane przez sześć genów, z których cztery ulegały wysokiej ekspresji w kotyledonach rozwijających się nasion (Sturtevant i in., 2020). W niniejszej pracy wykazano, że zawartość oleozyn w takiej samej ilości białek ekstrahowanych z dojrzałych nasion jojoba i z frakcji ciałek tłuszczowych wyizolowanych z dojrzałych nasion, jest o wiele wyższa w tych ostatnich ekstraktach, co pośrednio potwierdza, że ciała tłuszczowe są głównym miejscem ich lokalizacji. Podczas kiełkowania nasion jojoba zawartość oleozyn w ekstraktach białkowych uzyskiwanych z tych nasion ulegała znacznemu zmniejszeniu, szczególnie po 7. i 16. dniu kiełkowania, co dobrze koreluje z obserwacjami

dotyczącymi mobilizacji lipidów/wosków w tym okresie kiełkowania nasion jojoba. Taka stopniowa degradacja oleozyn podczas kiełkowania nasion została wcześniej odnotowana dla innych gatunków roślin, między innymi rzepaku (Murphy i in., 1989), słonecznika (Sadeghipour i Bhatla 2002) czy sezamu (Tzen 1997). W tym samym czasie, w którym następował spadek całkowitej zawartości oleozyn w ekstraktach z kiełkujących nasion jojoba, następował wzrost ich zawartości we frakcjach mikrosomalnych izolowanych z tych nasion. Tym spostrzeżeniem potwierdzone zostało, więc sugerowane wcześniej przez Moreau i Huang (1977), że część membran pochodzących z degradowanych oleosomów zostaje wchłaniana przez membrany frakcji mikrosomalnej (głównie zawierającej membrany ER). Razem z membranami oleosomów, do frakcji mikrosomalnej inkorporowane byłyby, prawdopodobnie również lipazy związane z tymi membranami. Dotychczas nie ustalono, jaka jest rola fizjologiczna lipaz przeniesionych do frakcji mikrosomalnej. Ponieważ są one dalej aktywnymi enzymami, być może jakaś część hydrolizy wosków pochodzących z degradowanych ciałek lipidowych jest nadal przeprowadzana na tych membranach. Kwestia ta pozostaje jednak do rozstrzygnięcia w ewentualnych badaniach wychodzących poza ramy obecnej rozprawy doktorskiej. Jakakolwiek by nie była jednak rola lipaz znajdujących się w membranach frakcji mikrosomalnych, frakcja ta stanowi dogodne źródło tych enzymów do badania ich właściwości biochemicznych oraz ich specyficzności substratowej. Badania dotyczące oleozyn w nasionach dwóch pozostałych gatunków wykorzystywanych w niniejszej pracy, tj. *C. abyssinica* i *C. sativa* nie zostały przeprowadzone. Nie ma również danych na ten temat w dostępnej literaturze. Ponieważ jednak aktywność lipaz we frakcjach mikrosomalnych izolowanych z kiełkujących nasion tych gatunków była stosunkowo wysoka i korelowała w pewnym stopniu z intensywnością mobilizacji lipidów w tych nasionach, można założyć, że podobnie jak to wykazano dla kiełkujących nasion jojoba, również i w tych nasionach źródłem tych lipaz we frakcjach mikrosomalnych mogą być fragmenty membran z degradowanych ciałek

olejowych. Hipoteza ta wymaga jednak potwierdzenia eksperymentalnego w przyszłych badaniach.

Równocześnie ze spadkiem zawartości wosków w kiełkujących nasionach jojoba, obserwowano wzrost zawartość w nich glukozy oraz skrobi. Jest to zgodne z założeniem, że komponenty zhydrolizowanych wosków są wykorzystywane, jako substraty w procesie glukoneogenezy (Moreau i Huang, 1977). Nadmiar glukozy może zaś być czasowo magazynowany w formie skrobi. W przypadku białek zawartych w nasionach jojoba, największą intensywność ich mobilizacji zaobserwowano podczas pierwszego tygodnia kiełkowania. Podobny schemat mobilizacji białek obserwuje się również w kiełkujących nasionach innych gatunków roślin (Müntz, 1996; Tan-Wilson i Wilson 2012). Badania dotyczące zmian w zawartości białek i cukrowców w kiełkujących nasionach dwu pozostałych testowanych gatunków (*C. abyssinica* i *C. sativa*) nie zostały przeprowadzone w ramach niniejszej pracy.

W badaniach przeprowadzonych przez Huanga i wsp. (1978) dotyczących specyficzności substratowej lipaz kiełkujących nasion jojoba wykazano, że charakteryzują się one wysoką specyficznością w stosunku do wosków i stosunkowo niską w stosunku do triacylogliceroli. Przystępując, więc do badań specyficzności substratowej lipaz kiełkujących nasion jojoba, w naszym systemie eksperymentalnym, zakładaliśmy uzyskanie podobnych wyników. Rezultaty naszych doświadczeń były jednak dla nas dużym zaskoczeniem; lipazy kiełkujących nasion jojoba hydrolizowały o wiele efektywniej triacyloglicerole niż woski. Triacyloglicerole są wprawdzie obecne w nasionach jojoba, ale ich występowanie ogranicza się głównie do osi embrionalnej (ang. *embryonic axis*) nasion jojoba i stanowi tylko niewielki procent lipidów zapasowych omawianych nasion (Sturtevant i in., 2020; Van Boven i in., 2000). Tak więc, należy raczej założyć, że wysoka specyficzność lipaz kiełkujących nasion jojoba może być związana z hipotetyczną obecnością triacylogliceroli

w nasionach przodków tego gatunku. Różnice w specyficzności lipaz kiełkujących nasion jojoba uzyskane w niniejszej pracy i w badaniach wcześniejszych przeprowadzonych przez Huanga i wsp. (1978) należy, więc raczej tłumaczyć warunkami przeprowadzanych doświadczeń. Huang i wsp. (1978) stosowali inny system wprowadzania substratów do mieszanin reakcyjnych oraz wykorzystywali metody fluorometryczne i kolorometryczne do detekcji produktów aktywności badanych lipaz. Oprócz naturalnych substratów jak: monoacyloglicerole, diacyloglicerole czy triacyloglicerole, w wielu doświadczeniach stosowali również syntetyczny substytut wosku „N-methylindoxylmyristate”. Wspomniani powyżej autorzy oprócz różnic w specyficzności substratowej badanych lipaz w porównaniu do wyników uzyskanych w niniejszej pracy odnotowali również inną ich tolerancję na temperaturę. W ich doświadczeniach 5-minutowa preinkubacja lipaz w temperaturze 60 °C powodowała utratę przez nie aktywności. W naszych badaniach wykazaliśmy zaś, że preinkubacja w 60 °C nie tylko nie dezaktywuje aktywności badanych lipaz, ale prowadzi nawet do zwiększenia ich aktywności enzymatycznej. Hydroliza zaś triacylogliceroli w 60 °C w testach z mikrosomami z kiełkujących nasion jojoba była wprawdzie najintensywniejsza w pierwszych 5 minutach reakcji, ale przebiega dalej, co najmniej do 15 minut (bufor HEPES), co jest dowodem, że lipazy nie utraciły swojej aktywności. Wspomniani autorzy wykazywali również, że lipazy kiełkujących nasion jojoba są najbardziej aktywne w środowisku alkalicznym (pH 8,5-9) podczas gdy w niniejszej pracy największą aktywność lipaz odnotowaliśmy w przedziale pH od 6 do 7 w przypadku triacylogliceroli oraz od 6,5 do 8 w przypadku wosków. Przy wyjaśnieniu różnic w uzyskanych wynikach, oprócz różnic metodycznych zastosowanych w obu pracowniach do charakterystyki lipaz kiełkujących nasion jojoba należy, więc jeszcze rozważyć, czy rzeczywiście badane były takie same izoformy lipaz jojoba w obu przypadkach, jako że ilość odnotowanych różnic jest stosunkowo duża. W niniejszej pracy do badań wykorzystywano frakcje mikrosomalne, w których jako

źródło lipaz uważane są fragmenty membran otaczających ciała olejowe, inkorporowane do tej frakcji po rozpadzie tych struktur (patrz poprzednia część dyskusji). W badaniach Huanga i wsp. (1978) jako źródło lipaz wykorzystywane były membrany pozostałe po ekstrakcji wosków z ciałek olejowych. Jeżeli przyjąć, że źródłem lipaz we frakcjach mikrosomalnych są fragmenty membran otaczających ciała olejowe wraz z zaadsorbowanymi na nich lipazami, izoformy lipaz występujące w ciałkach olejowych i w frakcjach mikrosomalnych powinny być identyczne. Teoretycznie można jednak rozważać, że do frakcji mikrosomalnej włączane są jedynie fragmenty membran otaczających ciała olejowe zawierające oleozyny, nie zawierające jednak (lub w niewielkiej ilości) lipaz. Dalej można rozważać, że lipazy są nadal syntetyzowane w kiełkujących nasionach, a ponieważ oleozyny (stanowiące port dla lipaz) występują teraz w membranach ER, nowo syntetyzowane lipazy są kierowane do tych membran. W takim przypadku mogłyby to być inne izoformy lipaz niż te pierwotnie znajdujące się na ciałkach olejowych. Dopóki jednak geny kodujące lipazy nasion jojoba nie zostaną sklonowane, nie można będzie stwierdzić, czy w różnych etapach kiełkowania nasion jojoba syntetyzowane są ewentualne różne izoformy oleozyn.

Zanim rozpoczęto badania prezentowane w niniejszej pracy zakładano, że lipazy innych gatunków roślin oleistych będą różniły się znacznie od tych występujących w kiełkujących nasionach jojoba, i będą bardzo mało (lub w ogóle) specyficzne w stosunku do wosków. Uzyskane wyniki były również zaskoczeniem. Lipazy kiełkujących nasion *C. abyssinica* i *C. sativa* wykazywały zdolność hydrolizy wosków, podobną jak lipazy występujące w kiełkujących nasionach jojoba. W przypadku lipaz kiełkujących nasion *C. abyssinica* stosunek intensywności hydrolizy wosków do intensywności hydrolizy triacylogliceroli był nawet wyższy (wynosił około 0,5) niż ten odnotowany do lipaz z kiełkujących nasion jojoba (wynoszący około 1/3). Pomimo istnienia wielu opracowań dotyczących lipaz, dostępne są jedynie pojedyncze prace opisujące ich aktywność hydrolityczną w stosunku do wosków.

Zdolność hydrolizy wosków w warunkach *in vitro* odnotowano np. dla oczyszczonej szczurzej lipazy trzustkowej, świńskiej lipazy karboksyloestrowej i lipazy *Pseudomonas fluorescens* (Tsujiita i wsp. 1999). Lipazy izolowane z roślin akumulujących triacyloglicerole nie są zazwyczaj badane pod kątem ich aktywności hydrolitycznej w stosunku do wosków (Barros i in., 2010). Jakkolwiek, aktywność hydrolazy wosków wykryto w oczyszczonych ekstraktach z korzeni gorczycy białej (*Sinapis alba* L.), (Kalinowska i Wojciechowski, 1985). Autorzy nie podają jednak, czy enzym zawarty w tych ekstraktach był również zdolny do hydrolizy triacylogliceroli. Biorąc jednak pod uwagę wyniki cytowanych powyżej prac oraz wyniki uzyskane podczas przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej, wydaje się, że zdolność do hydrolizy wosków jest raczej bardziej powszechną cechą lipaz zdolnych do hydrolizy triacylogliceroli niż dotychczas sądzono.

Przy charakterystyce biochemicznej lipaz kiełkujących nasion badanych gatunków (*S. chinensis*, *C. abyssinica*, *C. sativa*) rozpatrywano, między innymi, wpływ różnych temperatur, wpływ pH oraz wpływ jonów dwuwartościowych na ich aktywność. Pomimo wielu podobieństw, lipazy wszystkich trzech testowanych gatunków charakteryzowały się nieco odmiennymi właściwościami. W stosunku do temperatury otoczenia lipazy kiełkujących nasion *jojoba* zachowywały nieco podobny wzór odpowiedzi jak lipazy kiełkujących nasion *katranu abisyńskiego* (*C. abyssinica*). Najwyższą aktywność odnotowano w obu przypadkach około temperatury 60 °C. Również przyrost aktywności pomiędzy najniższymi z testowanych temperatur (5 czy 10 °C) a temperaturą optymalną był zbliżony (około 5-, 6-krotny). Lipazy kiełkujących nasion *linicznika siewnego* (*C. sativa*) uzyskiwały zaś swoją maksymalną aktywność już około 30 °C i aktywność ta utrzymywała się na podobnym poziomie aż do około 60°C. Ponadto wzrost aktywności lipaz kiełkujących nasion *linicznika* pomiędzy 10 °C a 30 °C był tylko około dwukrotny. Można więc stwierdzić, że lipazy tego gatunku są bardziej przystosowane do niskich i umiarkowanych temperatur w porównaniu do lipaz kiełkujących

nasion jojoba czy katroanu. Podobne preferencje temperaturowe jak lipazy kiełkujących nasion lnicznika wykazywały lipazy nasion *Brassica napus* oraz *Jatropha curcas*. Maksymalną aktywność tych lipaz odnotowano w temperaturze 37°C (Sana i in., 2004; Abigor i in., 2002). Lipazy nasion *Amygdalus communis* (Yeşiloğlu i in., 2008) oraz *Heliantus annuus* (Sagiroglu i in., 2005) wykazywały zaś maksymalną aktywność w temperaturach wyższych niż 50 °C, nieco podobnie jak lipazy nasion jojoba i katroanu. Dane te pokazują, więc że lipazy nasion roślin oleistych są mocno zróżnicowane w swoich preferencjach temperaturowych. Co się tyczy wpływu jonów dwuwartościowych (w niniejszej pracy testowano wpływ jonów Ca^{2+} i jonów Mg^{2+}), to lipazy kiełkujących nasion testowanych gatunków również reagowały na nie, nieco odmiennie. Lipazy kiełkujących nasion jojoba stymulowane były zarówno przez jony wapnia jak i magnezu, zaś lipazy katroanu i lnicznika tylko przez jony wapnia. Lipazy nasion jojoba reagowały więc nieco podobnie jak lipazy nasion *J. curcas* (jony Ca^{2+} zwiększały ich aktywność o około 130%, a jony Mg^{2+} o około 30%; Abigor i in., 2002) a lipazy nasion pozostałych dwu gatunków jak lipazy nasion *B. napus*; jony Ca^{2+} zwiększały ich aktywność o około 64% (Sana i in., 2004). Tak, więc i w tym przypadku widzimy zróżnicowanie lipaz nasion roślin oleistych. Największe podobieństwo lipaz nasion wszystkich trzech badanych gatunków dotyczyło ich reakcji na pH środowiska. Wszystkie wykazywały najwyższą aktywność w środowisku reakcji o pH w granicach 7-8. Chociaż i w tym przypadku aktywność w środowisku o pH niższym lub wyższym od optymalnego była w pewnym stopniu zależna od testowanego gatunku. Lipazy nasion testowanych w niniejszej pracy gatunków zachowywały się, jeżeli chodzi o pH środowiska, podobnie do lipaz obecnych w nasionach innych gatunków roślin oleistych. Optymalne pH dla większości tych lipaz mieściło się w granicach 7-8 (Barros i in., 2010).

W testach określających specyficzność substratową badanych lipaz w stosunku do różnych typów wosków, lipazy kiełkujących nasion wszystkich trzech badanych gatunków

roślin oleistych (*S. chinensis*, *C. abyssinica*, *C. sativa*) wykazywały podobną specyficzność. Wszystkie testowane woski hydrolizowane były z podobną intensywnością. W testach z mikrosomami z kiełkujących nasion jojoba procent zhydrolizowanych wosków mieścił się w granicach 16-22% (oprócz nasyconego długołańcuchowego wosku – 22:0-OH-16:0-FA, który hydrolizowany był tylko w około 5% w warunkach przeprowadzanych testów). W testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. sativa* było to 13-19%, a w testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. abyssinica* 7-12% dodanych wosków. Testowane woski różniły się jednak znacznie jedynie długością i stopniem nasycenia komponentu alkoholowego. W testach z mikrosomami z nasion *C. abyssinica* i *C. sativa* wszystkie typy badanych wosków były estrami kwasu oleinowego (18:1), a te wykorzystywane w testach z mikrosomami z nasion jojoba były estrami kwasu palmitynowego (16:0) i oleinowego. Sądząc jednak po wynikach badań dotyczących mobilizacji naturalnych wosków w kiełkujących nasionach jojoba, to właśnie komponent kwasowy wosków mógł mieć wpływ na stopień ich wykorzystania. W badaniach tych zaobserwowano bowiem spadek względnej zawartości kwasu eikozenowego (20:1) w lipidach/woskach kiełkujących nasion co sugeruje, że woski zawierające ten kwas tłuszczowy były mobilizowane bardziej efektywnie w porównaniu z estrami wosków zawierającymi kwasy 18:1 czy 22:1 jako reszty acylowe. Brak jednak możliwości syntezy egzogennych znakowanych wosków zawierających ten kwas tłuszczowy uniemożliwił porównanie szybkości ich hydrolizy w warunkach *in vitro* z szybkością hydrolizy wykorzystywanych w badaniach wosków. Przeprowadzenie takich testów i ewentualne potwierdzenie sugestii o szybszej mobilizacji wosków zawierających 20:1 jako reszty acylowe, pozostaje sprawą przyszłych badań

Badane lipazy różniły się pod względem reakcji na znany inhibitor lipaz: tetrhydrolipstatynę. W testach z dodatkiem tego inhibitora w stężeniu 20 mM, lipazy kiełkujących nasion jojoba traciły całkowicie swoją aktywność (zarówno w testach z TAG, jak

i WE). W testach z tri- ^{14}C]18:1-TAG, aktywność lipaz kiełkujących nasion *C. sativa* była hamowana w około 45%, a aktywność lipaz kiełkujących nasion *C. abyssinica* o około 48%. Wpływ tetrahydrolipstatyny na aktywność lipaz kiełkujących nasion *C. sativa* i *C. abyssinica* w testach z egzogennymi woskami nie był testowany. Badano jedynie jej wpływ na aktywność syntezy wosków przez badane lipazy. W testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. sativa* była ona hamowana o około 64%, a w testach z mikrosomami z *C. abyssinica* o około 36%, podczas gdy w testach z mikrosomami z kiełkujących nasion jojoba zahamowanie syntezy wosków było całkowite, tak samo jak zdolność tych lipaz do hydrolizy wosków czy triacylogliceroli. W tym przypadku podobieństwo lipaz nasion jojoba było wyższe w stosunku do lipaz nasion *C. sativa* niż lipaz nasion *C. abyssinica*.

Lipazy kiełkujących nasion wszystkich trzech badanych w niniejszej pracy gatunków roślin oleistych (*S. chinensis*, *C. abyssinica*, *C. sativa*) wykazywały zdolność nie tylko do hydrolizy wosków, ale i do ich syntezy. Zdolność syntezy wosków przez lipazy zawarte w frakcjach mikrosomalnych z kiełkujących nasion jojoba potwierdzona została w testach z egzogennymi alkoholami i różnymi donorami grup acylowych: wolnymi kwasami tłuszczowymi, triacyloglicerolami, diacyloglicerolami oraz endogennymi/mikrosomalnymi lipidami. Zdolność syntezy wosków przez lipazy zawarte w frakcjach mikrosomalnych z kiełkujących nasion dwu pozostałych gatunków wykazana została zaś w testach z wolnym alkoholem oleinowym (18:1-OH) i wolnym kwasem oleinowym (^{14}C]18:1). W testach z mikrosomami z nasion jojoba synteza wosków nie następowała, gdy donorem kwasów tłuszczowych był kwas tłuszczowy połączony z CoA (acylo-CoA) lub gdy donorami kwasów tłuszczowych były fosfolipidy. Tak jak wspomniano wyżej dodatek tetrahydrolipstatyny (znany inhibitor lipaz) w stężeniu 20 mM, całkowicie hamował syntezę wosków przeprowadzaną przez lipazy nasion jojoba (tak jak i hamował ich hydrolityczną aktywność). Natomiast dodatek DTNB (związek wiążący wolny CoA, i tym samym niedopuszczający do powstawania acylo-

CoA) nie zmniejszał (lecz nawet nieco zwiększał) ilości syntetyzowanych wosków, co dodatkowo sugeruje, że synteza ta katalizowana była przez lipazy, a nie przez syntazy wosków, które w przeprowadzanej przez siebie reakcji wymagają acylo-CoA jako donorów grup acylowych. Na intensywność syntezy wosków w testach z różnymi alkoholami tłuszczowymi i wolnym kwasem oleinowym, wpływała długość łańcucha alkoholu tłuszczowego; alkohole tłuszczowe o łańcuchu węglowym krótszym niż 18C były wykorzystywane słabiej niż te o łańcuchu 18C i dłuższym. W preferencjach hydrolitycznych lipaz jojoba takiej tendencji nie zaobserwowano: woski z średniołańcuchowymi alkoholami tłuszczowymi hydrolizowane były z podobną intensywnością jak te z długołańcuchowymi. W testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. abyssinica* i *C. sativa* badano oprócz wpływu DTNB na intensywność syntezy wosków z wolnego 18:1-OH i wolnego [¹⁴C]18:1-FA również wpływ dodatku wolnego CoA i ATP. W testach z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. abyssinica* dodatek DTNB mocno stymulował syntezę wosków (o wiele silniej niż to odnotowano w testach z mikrosomami z nasion jojoba) i wydaje się, że stymulacja ta była niezależna od wiązania wolnego CoA. Syntezę tą stymulował też dodatek ATP. Dodatek wolnego CoA nie wpływał zaś na intensywność syntezy wosków; w testach z dodatkiem wolnego CoA i ATP oraz w testach z dodatkiem wolnego CoA, ATP i DTNB (które związało wolny CoA) intensywność syntezy była podobna). Odwrotnie do syntezy wosków przez lipazy frakcji mikrosomalnej z nasion *C. abyssinica* i nasion jojoba, gdzie dodatek DTNB zwiększał intensywność syntezy wosków, dodatek tego związku hamował tę syntezę w testach z frakcją mikrosomalną z nasion *C. sativa*. W tym przypadku synteza ta była zaś stymulowana przez wolny CoA i nie wpływał na jej intensywność dodatek ATP. Wpływ badanych kofaktorów był bardziej wyeksponowany w wyższych temperaturach reakcji, bardziej optymalnych dla aktywności lipaz (przynajmniej jeżeli chodzi o lipazy nasion *C. abyssinica*). Przeprowadzone testy sugerują, że wszystkie lipazy z badanych kiełkujących nasion roślin oleistych są zdolne

nie tylko do hydrolizy wosków, ale również do ich syntezy. Regulacja intensywności tej syntezy może jednak podlegać odmiennym mechanizmom, zależnym od badanego gatunku. Dokładne poznanie mechanizmów tej regulacji pozostaje jednak kwestią przyszłych badań.

Zdolność do syntezy wosków w warunkach *in vitro* odnotowano również dla lipaz pochodzących z innych organizmów między innymi dla szczurzej lipazy trzustkowej, świńskiej lipazy karboksyloestrowej, lipazy z *Pseudomonas fluorescens* (Tsujita i in., 1999) czy lipazy *Candida* sp. 99–125 (Deng i in., 2011). Dostępne są również komercyjne preparaty lipaz, takie jak Novozym 435 (immobilizowana lipaza B z *Candida antarctica*) czy Lipozyme IM (immobilizowana lipaza z *Rhizomucor miehei*) które skutecznie katalizują reakcję estryfikacji pomiędzy długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi i alkoholami tłuszczowymi (Kuo i in., 2012; Steinke i in., 2001). Tsujita i in. (1999) zaproponowali następujący mechanizm reakcji syntezy wosków przez lipazy. Inkubacja lipaz z triacyloglicerolami lub kwasami tłuszczowymi prowadzi do tworzenia produktu pośredniego, którym jest acylowany enzym. Jeżeli w otoczeniu takiego acylowanego enzymu znajdą się alkohole tłuszczowe, to następuje przekazanie grupy acylowej właśnie na nie, jako że alkohole tłuszczowe są wydajniejszymi akceptorami grup acylowych niż woda, co skutkuje syntezą wosków. Pomimo iż w warunkach *in vitro* lipazy posiadają zdolność syntezy wosków, to nie ma jednakże dowodów eksperymentalnych wskazujących na to, że katalizowana przez lipazy synteza wosków zachodzi w kielkujących nasionach *in vivo*. Dotyczyłoby to oczywiście tylko kielkujących nasionach jojoba, jako że w innych gatunkach brak jest długołańcuchowych alkoholi tłuszczowych, które mogłyby posłużyć do syntezy wosków. W przypadku kielkujących nasion jojoba takiej ewentualności nie można jednak wykluczyć. Mechanizm taki mógłby być zabezpieczeniem przed czasową/miejscową nadprodukcją wolnych kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych. W ten sposób byłyby one znowu czasowo magazynowane i uwalniane dopiero po obniżeniu stężenia wolnych kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych.

Potwierdzenie/zaprzeczenie tej ewentualności jest jednak sprawą dalszych badań wychodzących poza ramy obecnej rozprawy doktorskiej. Wydaje się, że lipazy badanych gatunków, szczególnie lipazy kiełkujących nasion jojoba i *C. abyssinica* mogłyby być użyteczne w produkcji przemysłowej wosków ze względu na swoją stabilność i zdolność do wykorzystywania w reakcji syntezy wosków, długo- i bardzo długołańcuchowych alkoholi. Aby to nastąpiło należałoby jednak najpierw sklonować geny odpowiedzialne za syntezę tych lipaz. Pozostaje to jednak również sprawą przyszłych badań.

Badania dotyczące mobilizacji wosków podczas kiełkowania nasion transgenicznych linii *C. sativa* pokazały, że również w warunkach *in vivo* lipazy tego gatunku mogą skutecznie hydrolizować woski oraz, że produkty ich rozkładu są dalej skutecznie metabolizowane (nie zaobserwowano gromadzenia się wolnych kwasów tłuszczowych ani wolnych alkoholi tłuszczowych). Intensywna mobilizacja wosków rozpoczynała się jednak później niż mobilizacja triacylogliceroli. Podobne spostrzeżenie poczynione zostało również dla transgenicznych linii *C. abyssinica* (Li i in., 2019). Intensywniejsza mobilizacja wosków następowała dopiero około 10 dnia podkiełkowywania i znaczna ilość wosków pozostawała w siewkach ciągle po 30. dniu od rozpoczęcia kiełkowania. Autorzy próbują przypisywać tej wolniejszej mobilizacji wosków lub ich samej obecności słabszy rozwój siewek linii transgenicznych w tych pierwszych dniach kiełkowania w porównaniu z rozwojem siewek *C. abyssinica* typu dzikiego. W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy (jak również z informacji otrzymanych od profesora E. Cahoon; USA) rozwój siewek transgenicznych linii *C. sativa* również był słabszy niż ich odpowiedników kontrolnych. Ten słabszy rozwój siewek transgenicznych linii *C. abyssinica* i *C. sativa* akumulujących woski nie wydaje się jednak być powiązany z właściwościami lipaz występujących w ich nasionach. Właściwości biochemiczne lipaz kiełkujących nasion tych gatunków nie różniły się znacząco od właściwości lipaz występujących w nasionach jojoba, u której woski są skutecznie

wykorzystywane, jako źródło węgla i energii dla rozwijających się siewek w procesie kiełkowania. Przyczyn należy, więc upatrywać raczej gdzie indziej. Jak dotychczas nie została np. ustalona lokalizacja wosków zapasowych w tych transgenicznym liniach. Nie jest też pewne czy występują one w ciałkach olejowych razem z triacyloglicerolami, czy też zlokalizowane są w oddzielnych ciałkach tłuszczowych lub czy w ogóle występują w ciałkach tłuszczowych czy też jako wolne krople tłuszczowe zlokalizowane w cytozolu. Rozwiązanie problemu przyczyn słabszego rozwoju siewek powstających z nasion linii transgenicznych roślin oleistych akumulujących woski pozostaje, więc sprawą przyszłych badań. Wydaje się jednak, jak to już wspomniano, że nie jest ono powiązane z właściwościami lipaz występujących w tych gatunkach roślin.

6 WNIOSKI

1. Aktywność lipaz frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion roślin oleistych jest w pewnym stopniu skorelowana z intensywnością mobilizacji lipidów zapasowych w tych nasionach. Czyni to frakcje mikrosomalne dogodnym źródłem tych lipaz do badania ich właściwości biochemicznych i specyficzności substratowej.
2. Lipazy znajdujące się we frakcjach mikrosomalnych z kiełkujących nasion roślin oleistych pochodzą prawdopodobnie z resztek membran otaczających ciała olejowe. Dowodem na to może być obecność w tych frakcjach oleozyn (badania z kiełkującymi nasionami jojoba), białek typowych dla ciałek olejowych.
3. Lipazy kiełkujących nasion jojoba, jedynej rośliny magazynującej woski jako materiał zapasowy, nie są unikalne co do zdolności hydrolizy wosków. Zdolność taką wykazują też inne lipazy, między innymi lipazy kiełkujących nasion *Crambe abyssinica* i *Camelina sativa*, badane w niniejszej pracy.
4. Pomimo iż nasiona jojoba jako główny materiał zapasowy magazynują woski, lipazy kiełkujących nasion jojoba wykazują wyższe preferencje w stosunku do triacylogliceroli niż w stosunku do wosków, podobnie jak lipazy kiełkujących nasion *Crambe abyssinica* i *Camelina sativa*.
5. Lipazy kiełkujących nasion wszystkich trzech badanych w niniejszej pracy gatunków roślin oleistych (*S. chinensis*, *C. abyssinica*, *C. sativa*) posiadają również zdolność syntezy wosków. Taką zdolność odnotowano również dla lipaz z innych organizmów niebadanych w niniejszej pracy; może więc to być uniwersalna cech lipaz.
6. Pod względem właściwości biochemicznych, lipazy kiełkujących nasion roślin oleistych testowanych w niniejszej pracy wykazywały zarówno podobieństwa, jak i różnice. Lipazy każdego z testowanych gatunku posiadały jednak specyficzny tylko dla siebie sposób reakcji na zmieniające się warunki środowiska.

7. Wszystkie testowane lipazy były najbardziej aktywne w środowisku reakcji o pH w granicach 7-8. Różnic można się jednak doszukać w aktywności lipaz w niższym i wyższym pH. Wszystkie były też aktywowane przez jony Ca^{2+} ; jony Mg^{2+} stymulowały jednak tylko aktywność lipazy nasion jojoba. Lipazy kiełkujących nasion jojoba i *C. abyssinica* wykazywały najwyższą aktywność w temperaturze około 60 °C, zaś lipazy nasion *C. sativa* maksimum aktywności osiągały już w temperaturze 30 °C. Dodatkowe różnice występowały w ich aktywności w temperaturach niższych i wyższych od optymalnych.
8. Problemy w kiełkowaniu i początkowym rozwoju siewek transgenicznych roślin *C. sativa* (testowane w niniejszej pracy) i *C. abyssinica* (dane literaturowe) magazynujących woski, wydają się nie być związane z właściwościami lipaz występujących w tych nasionach. Lipazy te wykazują bowiem bardzo wysokie podobieństwo w zdolności do hydrolizy wosków do lipaz nasion jojoba.

7 SPIS LITERATURY

Abigor RD, Uadia PO, Foglia TA, Haas MJ, Scott K, Savary BJ. Partial purification and properties of lipase from germinating seeds of *Jatropha curcas* L. *J Am Oil Chem Soc.* 2002; 79:1123–6.

Al-Obaidi JR, AlKhalifah NS, Asanar S, Al-Soqeer AA, Attia MF. A review on plant importance, biotechnological aspects, and cultivation challenges of jojoba plant. *Biol Res.* 2017;50:25.

Barros M, Fleuri LF, Macedo GA. Seed lipases: sources, applications and properties - a review. *Braz J Chem Eng.* 2010;27:15-29.

Baud S, Lepiniec L. Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Prog Lipid Res.* 2010;49(3):235-249.

Becraft PW, Yi G. Regulation of aleurone development in cereal grains. *J Exp Bot.* 2011;62(5):1669-1675.

Benzioni A, Van Boven M, Ramamoorthy S, Mills D. Dynamics of fruit growth, accumulation of wax esters, simmondsins, proteins and carbohydrates in jojoba. *Ind Crops Prod.* 2007;26(3):337-344.

Bewley JD, Black MB. 1985. *Seeds: Physiology of Development and Germination* 1.5. Seed storage reserves; 2.3. Deposition of reserves within storage tissues; 7.1. Mobilization of stored seed reserves. New York.

Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37(8):911-917.

Borroto K, Dure L III. The globulin seed storage proteins of flowering plants are derived from two ancestral genes. *Plant Mol Biol.* 1987;8:113-131.

Buckeridge MS, dos Santos HP, Tiné MAS. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiol Biochem.* 2000;38(1–2):141-156.

Budzyński W, Zajac T, 2010. *Rośliny oleiste uprawa i zastosowanie*. Poznań: Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, s.187-195.

Buléona A, Colonna P, Planchota V, Ball S. Starch granules: structure and biosynthesis. *Int J Biol Macromol.* 1998; 23(2):85-112.

Byszewski W, 1972. *Surowce roślinne*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe.

Carlsson AS. Plant oils as feedstock alternatives to petroleum- A short survey potential oil crop platforms. *Biochimie.* 2009;91:665-670.

Czerwiński W, 1976. *Fizjologia roślin*. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Naukowe.

Deng L, Wang X, Nie K, Wang F, Liu J, Wang P, Tan T. Synthesis of Wax Esters by Lipase-catalyzed Esterification with Immobilized Lipase from *Candida* sp. 99–125. *Chin J Chem Eng.* 2011;19:978-982.

Falasca SL, Flores N, Lamas MC, Carballo SM, Anschau A. *Crambe abyssinica*: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. *Int J Hydrogen Energy*. 2010;35:5808-5812.

Frandsen GI, Mundy J, Tzen JTC. Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiol Plant*. 2001;112(3):301-307.

Furmanek T, Banaś W. Embryogenic callus formation by cotyledon and leaf explants of *Crambe abyssinica* seedlings. *J Biotechnol Comput Biol Bionanotechnol*. 2011;92(2),109-113.

Grzesiuk S, Kulka K. 1981. *Fizjologia i Biochemia Nasion*. 3.2. Morfologia części składowych nasion. 4.2. Skład chemiczny nasion dojrzałych. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. str. 60-76, 83-144 .

Hejnowicz Z. 1980. *Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych*. Wydawnictwo Naukowe PWN.

Huang AHC, Moreau RA, Liu KDF. Development and Properties of a Wax Ester Hydrolase in the Cotyledons of *Jobba* Seedlings. *Plant Physiol*. 1978;61(3):339-341.

IENICA- Interactive European Network for Industrial Crops and their Applications, 2005. *Crambe (Abyssinian mustard)*. Springdale Crop Synergies Ltd (CSL). <http://www.ienica.net/crops/crambe.pdf>

Iven T, Herrfurth C, Hornung E, Heilmann M, Hofvander P, Stymne S, et al. Wax ester profiling of seed oil by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods*. 2013;9(1):1-14.

Jahson R. 2003. Seed Development- Germination. W: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Oxford: Elsevier, str. 1298-1304.

Jankowski K, Budzyński W. Potencjał energetyczny roślin oleistych. *Problemy Ekologii*. 2004;1:31-38.

Jankowski KJ, Sokólski MM, Dubis B, Załuski D, Szempliński W. Sweet sorghum - Biomass production and energy balance at different levels of agricultural inputs. A six-year field experiment in north-eastern Poland. *European Journal of Agronomy*. 2020;119:126119.

Jardinaud MF, Petitprez M. 2003. Seed Development – Embryogenesis. W: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Oxford: Elsevier, str. 1225-1232.

Kalinowska M, Wojciechowski ZA. Characterization of wax-ester hydrolase from roots of white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Acta Biochim Pol*. 1985;32:259-269.

Kalscheuer R, Stolting T, Steinbuchel A. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Microbiol*. 2006;152:2529-2536.

Kączkowski J. 1992. *Biochemia roślin. Przemiany typowe*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.

Kermode AR. 2003. Seed Development – Physiology of Maturation. W: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Oxford: Elsevier, str. 1261-1279.

- Kinney AJ, 2003. Primary Products- Oils. W: Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Oxford: Elsevier, str. 889-889.
- Kopcewicz J, Lewak S. 2002. Fizjologia Roślin, Warszawa: Wydaw. Naukowe PWN. str. 485-497.
- Klińska S, Jasieniecka-Gazarkiewicz K, Banaś A. Acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferases (LPCATs) of *Camelina sativa*: biochemical properties and function. *Planta*. 2019;250 (5):1655-1670.
- Kopcewicz J., 2012. Podstawy biologii roślin. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Krishnan HB, Okita TW. Structural Relationship among the Rice Glutelin Polypeptides. *Plant Physiol*. 1986;81:748-753.
- Kuo CH, Chen HH, Chen JH, Liu YC, Shieh CJ. High Yield of Wax Ester Synthesized from Cetyl Alcohol and Octanoic Acid by Lipozyme RMIM and Novozym 435. *Int J Mol Sci*. 2012;13:11694-11704.
- Lalas S, Gortzi O, Athanasiadis V, Dourtoglou E, Dourtoglou V. Full Characterisation of *Crambe abyssinica* Hochst. Seed Oil. *J Am Oil Chem Soc*. 2012; 89:2253-2258.
- Li X, Guan R, Fan J, Zhu L-H. Development of Industrial Oil Crop *Crambe abyssinica* for Wax Ester Production through Metabolic Engineering and Cross Breeding. *Plant Cell Physiol*. 2019;60:1274-1283.
- Lityński M. 1970. *Biologia nasion i nasiennictwo*. Poznań: Państwowe Wydawnictwo Naukowe.
- Mandal S, Mandal RK. Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering. *Cur Sci*. 2000;79(5):576-589.
- Mayer AM, Shain Y. Control of Seed Germination. *Ann Rev Plant Physiol*. 1974;25(1):167-193.
- Miklaszewska M, Dittrich-Domergue F, Banaś A, Domergue F. 2018. Wax synthase MhWS2 from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*: substrate specificity and biotechnological potential for wax ester production *Appl Microbiol Biotechnol*. 102(9):4063-4074.
- Miwa TK. Jojoba oil wax esters and derived fatty acids and alcohols: Gas chromatographic analyses. *J Am Oil Chem Soc*. 1971;48(6):259-264.
- Moreau RA, Huang AHC, 1977. Gluconeogenesis from Storage Wax in the Cotyledons of Jojoba Seedlings. *Plant Physiol*. 1977;60(2):329-333.
- Moreau RA, Huang AHC. Enzymes of wax ester catabolism in jojoba. W: *Methods in Enzymology*. Elsevier; 1981; str. 804-813.
- Murphy DJ, Cummins I, Kang AS. Immunocytochemical and biochemical studies of the mobilisation of storage oil-bodies and proteins in germinating cotyledons of oilseed rape, *Brassica napus*. *J Sci Food Agric*. 1989;48:209-223.

- Murphy DJ, 2003. Seed Development – Oil Deposition. W: Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Oxford: Elsevier, str. 1256-1261.
- Müntz K. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. *J Exp Bot.* 1996;47: 605-622.
- Müntz K. Deposition of storage proteins. *Plant Mol Biol.* 1998;38:77-99.
- Müntz K, Belozersky MA, Dunaevsky YE, Schlereth A, Tiedemann J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J Exp Bot.* 2001;52(362):1741-1752.
- Perdue RE. Vernonia: bursting with potential. *Agric Eng.* 1989;70:11-13.
- Rost TL, Simper AD, Schell P, Allen S. Anatomy of Jojoba (*Simmondsia chinensis*) seed and the utilization of liquid wax during germination. *Econ Bot.* 1977;31:140-147.
- Rajangam AS, Gidda SK, Craddock C, Mullen RT, Dyer JM, Eastmond PJ. Molecular Characterization of the Fatty Alcohol Oxidation Pathway for Wax-Ester Mobilization in Germinated Jojoba Seeds. *Plant Physiol.* 2013;161(1):72-80.
- Ruiz-Lopez N, Broughton R, Usher S, Salas JJ, Haslam RP, Napier JA, Beaudoin F. Tailoring the composition of novel wax esters in the seeds of transgenic *Camelina sativa* through systematic metabolic engineering. *Plant Biotechnol.* 2017;15:837-849.
- Sadeghipour HR, Bhatla SC. Differential Sensitivity of Oleosins to Proteolysis During Oil Body Mobilization in Sunflower Seedlings. *Plant Cell Physiol.* 2002;43:1117-1126.
- Sana NK, Hossin I, Haque EM, Shaha RK. Identification, Purification and Characterization of Lipase from Germinating Oil Seeds (*Brassica napus* L.). *Pak J Biol Sci.* 2004;7:246-252.
- Sagiroglu A, Arabaci N. Sunflower Seed Lipase: Extraction, Purification, and Characterization. *Prep Biochem Biotech.* 2005;35:37-51.
- Sánchez M, Nicholls DG, Brindley DN. The relationship between palmitoyl coenzyme A synthetase activity and esterification of sn-glycerol 3-phosphate in rat liver mitochondria. *Biochem J.* 1973;132:697–706.
- Schmid KM, Ohlrogge JB, 2002. Lipid metabolism in plants. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th edition. Elsevier, str. 93-126.
- Shewry PR, Napier JA, Tatham AS. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell.* 1995;7(7):945-956.
- Shewry PR, Halford NG. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot.* 2002;53(370):947-958.
- Shewry PR. 2003. Primary Products – Proteins. W: Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Oxford: Elsevier, str. 889-896.
- Shimada TL, Hara-Nishimura I. Oil-Body-Membrane Proteins and Their Physiological Functions in Plants. *Biol Phar Bull.* 2010;33(3):360-363.

- Smith SM, Denyer K. 2003. Primary Products- Starch. W: Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Oxford: Elsevier, str. 896-905.
- Somerville C, Browse J, Jaworski JG, Ohlrogge JB. 2000. Lipids. W: RB Buchanan, W Gruissem, RL Jones, eds, Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, str. 456-527.
- Steinke G, Weitkamp P, Klein E, Mukherjee KD. High-Yield Preparation of Wax Esters via Lipase-Catalyzed Esterification Using Fatty Acids and Alcohols from Crambe and Camelina Oils. J Agric Food Chem. 2001;49: 647-651.
- Sturtevant D, Lu S, Zhou Z-W, Shen Y, Wang S, Song J-M, et al. The genome of jojoba (*Simmondsia chinensis*): A taxonomically isolated species that directs wax ester accumulation in its seeds. Sci Adv. 2020;6:eaay3240.
- Szweykowska A. 1993. Botanika i systematyka. Wydawnictwo Naukowe PWN
- Szweykowska A, Szweykowski J. 2003. Słownik botaniczny. Warszawa: Wiedza Powszechna.
- Tan-Wilson AL, Wilson KA. Mobilization of seed protein reserves. Physiol Plant. 2012; 145:140-153.
- Tsujita T, Sumiyoshi M, Okuda H. Wax ester-synthesizing activity of lipases. Lipids. 1999;34:1159-1166.
- Tzen JTC, Lai Y-K, Chan K-L, Huang AHC. Oleosin Isoforms of High and Low Molecular Weights Are Present in the Oil Bodies of Diverse Seed Species. Plant Physiol. 1990;94:1282-1289.
- Tzen JTC, Peng C-C, Cheng D-J, Chen ECF, Chiu JMH. A New Method for Seed Oil Body Purification and Examination of Oil Body Integrity Following Germination. J Biochem. 1997;121:762-768.
- Van Boven M, Holser RA, Cokelaere M, Decuypere E, Govaerts C, Lemey J. Characterization of triglycerides isolated from jojoba oil. J Am Oil Chem Soc. 2000;77:1325-1329.
- Van de Loo FJ, Fox BG, Somerville C. 1993. Unusual fatty acids. W: Lipid Metabolism in Plants. CRC Press, str. 91-126.
- Vaughan JG, Judd PA. 2003. The Oxford book of health foods. Oxford: Oxford University Press
- Wenning L, Yu T, David F, Nielsen J, Siewers V. Establishing very long-chain fatty alcohol and wax ester biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng. 2017;114(5):1025-1035.
- Wenning L, Ejsing CS, David F, Sprenger RR, Nielsen J, Siewers V. Increasing jojoba-like wax ester production in *Saccharomyces cerevisiae* by enhancing very long-chain, monounsaturated fatty acid synthesis. Microb Cell Fact. 2019;18(1):1-17.
- Yeşiloğlu Y, Başkurt L. Partial Purification and Characterization of Almond Seed Lipase. Prep Biochem Biotech. 2008;38:397-410.

Zhu LH, Krens F, Smith MA, Li X, Qi W, Van Loo EN, et al. Dedicated industrial oilseed crops as metabolic engineering platforms for sustainable industrial feedstock production. *Sci Rep.* 2016;6(1):22181.

Zweytick D, Athenstaedt K, Daum G. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1469:101-120.

8 SUPLEMENT

Tabela S1. Względna zawartości kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych acylolipidów kiełkujących nasion jojoba akcesji „144” (A), akcesji „145” (B), akcesji „146” (C) i akcesji „147” (D)

(A) “144” Dni kiełkowania	Mol %								
	16:0	18:1	20:1	22:1	24:1	18:1-OH	20:1-OH	22:1-OH	24:1-OH
0	0,9 ±0,1	6,5 ±0,6	35,9 ±0,4	6,0 ±0,3	0,7 ±0,2	0,7 ±0,1	23,7 ±1,4	22,0 ±1,1	3,6 ±0,4
7	1,3 ±0,29	7,6 ±1,0	34,0 ±0,9	6,4 ±0,5	0,6 ±0,2	0,5 ±0,2	21,8 ±2,1	23,4 ±1,4	4,3 ±0,9
16	1,4 ±0,5	8,3 ±2,1	32,9 ±2,9	6,4 ±0,3	1,0 ±0,4	0,4 ±0,2	20,2 ±2,3	24,3 ±1,2	5,1 ±1,2
26	1,6 ±0,3	10,5 ±1,6	30,6 ±1,5	6,7 ±1,5	0,9 ±0,3	0,6 ±0,1	22,8 ±3,6	22,3 ±2,2	4,1 ±1,4

(B) “145” Dni kiełkowania	Mol %								
	16:0	18:1	20:1	22:1	24:1	18:1-OH	20:1-OH	22:1-OH	24:1-OH
0	0,7 ±0,1	5,9 ±0,7	37,3 ±0,3	5,6 ±0,7	0,6 ±0,2	0,6 ±0,1	25,4 ±2,8	20,7 ±1,9	3,2 ±1,0
7	0,6 ±0,0	5,4 ±0,5	37,4 ±0,7	5,9 ±0,3	0,6 ±0,1	0,5 ±0,0	23,3 ±0,4	22,5 ±0,4	3,8 ±0,2
16	0,9 ±0,1	8,3 ±0,9	34,6 ±1,8	5,6 ±0,9	0,6 ±0,2	0,5 ±0,2	26,2 ±1,9	20,3 ±1,6	3,0 ±0,6
26	0,8 ±0,1	8,5 ±1,0	33,7 ±0,6	6,3 ±0,6	0,8 ±0,3	0,3 ±0,1	25,3 ±2,9	20,9 ±2,0	3,5 ±1,0

(C) “146” Dni kiełkowania	Mol %								
	16:0	18:1	20:1	22:1	24:1	18:1-OH	20:1-OH	22:1-OH	24:1-OH
0	0,9 ±0,1	7,1 ±0,9	35,8 ±0,7	5,7 ±0,5	0,5 ±0,2	0,6 ±0,1	25,1 ±2,5	21,2 ±1,8	3,1 ±0,7
7	1,0 ±0,2	7,6 ±1,3	36,2 ±0,9	4,8 ±0,5	0,3 ±0,1	0,9 ±0,2	28,7 ±2,1	18,3 ±1,8	2,2 ±0,5
16	1,1 ±0,3	8,1 ±0,9	35,0 ±0,8	5,4 ±1,1	0,5 ±0,2	0,6 ±0,3	26,9 ±2,8	19,9 ±2,2	2,6 ±1,0
26	0,9 ±0,1	8,7 ±1,3	32,2 ±0,7	7,3 ±1,0	1,2 ±0,4	0,4 ±0,0	22,7 ±3,6	22,3 ±2,2	4,3 ±1,3

(D) “147” Dni kiełkowania	Mol %								
	16:0	18:1	20:1	22:1	24:1	18:1-OH	20:1-OH	22:1-OH	24:1-OH
0	0,8 ±0,2	8,3 ±2,4	35,5 ±1,3	4,9 ±1,1	0,4 ±0,2	0,8 ±0,3	27,3 ±4,5	19,3 ±3,8	2,6 ±1,0
7	1,0 ±0,1	8,4 ±0,4	35,2 ±0,5	5,0 ±0,6	0,4 ±0,1	0,8 ±0,3	27,7 ±2,1	19,0 ±1,7	2,6 ±0,6
16	1,3 ±0,2	9,1 ±1,4	34,2 ±2,0	5,0 ±0,5	0,4 ±0,1	0,9 ±0,1	28,4 ±1,1	18,4 ±0,8	2,4 ±0,3
26	1,1 ±0,1	11,9 ±1,9	30,6 ±2,6	6,0 ±1,7	0,7 ±0,2	0,6 ±0,2	27,2 ±3,7	19,0 ±2,7	3,0 ±1,2

Wyniki przedstawiają wartości średnie z czterech powtórzeń biologicznych ± odchylenie standardowe. Pełne nazwy kwasów i alkoholi tłuszczowych podano w wykazie skrótów.

Tabela S2. Wpływ ilości egzogenego tri- ^{14}C]18:1-TAG na ilość zhydrolizowanych kwasów tłuszczowych w testach z taką samą ilością frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion jojoba

Zhydrolizowany ^{14}C]18:1 (nmol/test)			
tri- ^{14}C]18:1-TAG (nmol/test)			
1	5	10	20
0,84 ± 0,06	4,26 ± 0,39	7,13 ± 0,53	11,04 ± 0,90

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n ≥ 2.

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholino) wyizolowanych z nasion jojoba w 40. dniu kiełkowania, substrat (^{14}C]TAG) dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,2); inkubację przeprowadzano przez 5 minut w 35 °C.

Tabela S3. Wpływ czasu reakcji na ilość zhydrolizowanych kwasów tłuszczowych egzogenego tri- ^{14}C]18:1-TAG w testach z taką samą ilością frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion jojoba.

tri- ^{14}C]18:1-TAG (nmol/test)	Zhydrolizowany ^{14}C]18:1 (nmol/test)		
	Czas inkubacji (minuty)		
	2,5	5	10
5	2,50 ± 0,35	3,25 ± 0,01	5,66 ± 0,32
10	4,54 ± 0,22	6,76 ± 0,49	6,78 ± 0,33
20	6,69 ± 1,77	10,29 ± 1,65	11,37 ± 1,95

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n ≥ 2.

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholino) wyizolowanych z nasion jojoba w 35. dniu kiełkowania, substrat (^{14}C]TAG) dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,2); inkubację przeprowadzano w 35 °C.

Tabela S4. Wpływ temperatury inkubacji na ilość zhydrolizowanych kwasów tłuszczowych egzogenego tri- ^{14}C 18:1-TAG (20 nmol/test) w testach z taką samą ilością frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion jojoba.

Zhydrolizowany ^{14}C 18:1 (nmol/test)					
Temperatura inkubacji					
25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	50 °C	60 °C
4,47 ± 0,45	6,60 ± 0,36	8,82 ± 0,30	11,10 ± 0,36	12,31 ± 0,37	15,09 ± 2,01

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n ≥ 2.

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion jojoba w 40. dniu kiełkowania, substrat (20 nmol ^{14}C TAG/test) dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,2); inkubację przeprowadzano przez 5 minut w różnych temperaturach.

Tabela S5. Aktywność lipaz frakcji mikrosomalnych, przygotowanych z kiełkujących nasion katranu abisyńskiego (*Crambe abyssinica*) w kolejnych dniach podkiełkowania, w stosunku do tri- ^{14}C 18:1-TAG

Czas inkubacji	Zhydrolizowany ^{14}C 18:1 (% ^{14}C dodanego tri- ^{14}C 18:1-TAG)				
	Dni podkiełkowania				
	0	3	6	10	14
15 minut	0,2	3,9	30,2	38,0	26,6
30 minut	0,5	6,7	39,8	54,0	37,9
60 minut	0,8	11,0	55,6	54,7	49,9

Wyniki przedstawiają dane z pojedynczych testów

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w kolejnych dniach kiełkowania, substrat (2,5 nmol ^{14}C TAG/test) dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,2); inkubację przeprowadzano w 30 °C. TAG, triacyloglicerol

Tabela S6. Aktywność lipaz frakcji mikrosomalnych, przygotowanych z kiełkujących nasion katranu abisyńskiego (*Crambe abyssinica*) w kolejnych dniach podkiełkowania, w stosunku do 18:1-OH- ^{14}C 18:1-WE

Czas inkubacji	Zhydrolizowany ^{14}C 18:1 (% dodanego 18:1-OH- ^{14}C 18:1-WE)				
	Dni podkiełkowania				
	0	3	6	10	14
60 minut	0,0	38,2 $\pm 2,4$	68,8 $\pm 4,1$	56,0 $\pm 2,9$	43,1 $\pm 3,2$

Wyniki przedstawiają wartość średnią \pm odchylenie standardowe, n = 2

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w kolejnych dniach kiełkowania, substrat (2,5 nmol ^{14}C WE/test) dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,2); inkubację przeprowadzano w 30 °C. WE, воск (ang. *wax ester*)

Tabela S7. Wpływ ilości egzogennej [¹⁴C]TAG na ilość zhydrolizowanych kwasów tłuszczowych w testach z taką samą ilością frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion *C. abyssinica*

Zhydrolizowany [¹⁴ C]18:1 (nmol/test)					
Ilość dodanego tri-[¹⁴ C]18:1-TAG [nmol/test]					
2,5	5	7,5	10	20	30
0,47	0,88	1,06	1,28	2,25	1,76
± 0,19	± 0,08	± 0,27	± 0,02	± 0,15	± 0,14

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n = 2.

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z kiełkujących nasion *C. abyssinica* (mieszanina frakcji izolowanych w 6., 10. i 14. dniu kiełkowania), substrat (od 2,5 do 30 nmol [¹⁴C]TAG/test) dodawano rozpuszczony w 19 µl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 µl 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,2); inkubację przeprowadzano w 30 °C przez 5 minut.

Tabela S8. Wpływ czasu reakcji i zastosowanego buforu inkubacyjnego na ilość zhydrolizowanych kwasów tłuszczowych egzogennej tri-[¹⁴C]18:1-TAG w testach z taką samą ilością frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion *C. abyssinica*

Bufor inkubacyjny	Zhydrolizowany [¹⁴ C]18:1 (nmol/test)				
	Czas inkubacji (minuty)				
	1,5	5	10	15	30
p-bufor pH 7,2	0,88 ± 0,03	2,25 ± 0,15	3,36 ± 0,12	5,55 ± 0,51	7,47 ± 0,51
HEPES pH 7,0	1,50 ± 0,01	4,47 ± 0,33	8,22 ± 0,60	10,66 ± 0,02	14,37 ± 1,17

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n = 2.

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z kiełkujących nasion *C. abyssinica* (mieszanina frakcji izolowanych w 6., 10. i 14. dniu kiełkowania), substrat (20 nmol [¹⁴C]TAG/test) dodawano rozpuszczony w 19 µl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 µl 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,2) lub buforu HEPES (pH 7); inkubację przeprowadzano w 30 °C.

Tabela S9. Wpływ ilości egzogenego [¹⁴C]TAG na ilość zhydrolizowanych kwasów tłuszczowych w testach z taką samą ilością frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion *C. sativa* i z kiełkujących nasion *C. abyssinica*

Ilość dodanego tri- ¹⁴ C]18:1-TAG [nmol/test]	Zhydrolizowany [¹⁴ C]18:1 (nmol/test)	
	<i>C. sativa</i>	<i>C. abyssinica</i>
10	6,67 ± 0,26	1,65 ± 0,06
15	17,02 ± 0,17	2,48 ± 0,45
20	20,58 ± 0,54	3,13 ± 0,05
30	22,86 ± 0,81	4,14 ± 0,45
35	22,42 ± 0,68	3,99 ± 0,63

Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, n = 2.

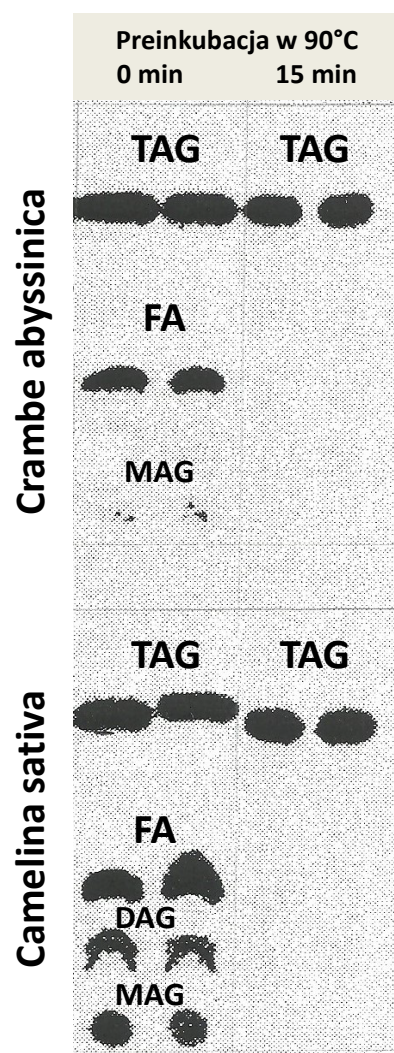
Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w 6. dniu kiełkowania lub *C. sativa* w 3. dniu kiełkowania, substrat (od 10 do 35 nmol [¹⁴C]TAG/test) dodawano rozpuszczony w 19 µl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 µl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,0) z dodatkiem 5 mM CaCl₂; inkubację przeprowadzano w 30 °C przez 5 minut.

Tabela S10. Wpływ jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} na aktywność lipaz z kiełkujących nasion *C. sativa* i z kiełkujących nasion *C. abyssinica* w stosunku do tri- ^{14}C]18:1-TAG

Zhydrolizowany [^{14}C]18:1 (% dodanej radioaktywności) – pierwszy rząd							
% aktywności w testach bez dodatku jonów – drugi rząd							
<i>C. sativa</i>				<i>C. abyssinica</i>			
0,1 M HEPES	0,1 M HEPES + 5 mM MgCl_2	0,1 M HEPES + 5 mM CaCl_2	0,1 M HEPES + 2,5 mM CaCl_2 i 2,5 mM MgCl_2	0,1 M HEPES	0,1 M HEPES + 5 mM MgCl_2	0,1 M HEPES + 5 mM CaCl_2	0,1 M HEPES + 2,5 mM CaCl_2 i 2,5 mM MgCl_2
8,5 ± 0,8	8,5 ± 2,0	19,6^a ± 3,9	22,6^a ± 3,8	4,1 ± 0,3	3,7 ± 0,6	6,8^a ± 1,0	7,6^a ± 1,4
100% ± 9	100% ± 23	231% ± 46	266% ± 45	100% ± 7	80% ± 15	166% ± 24	185% ± 34

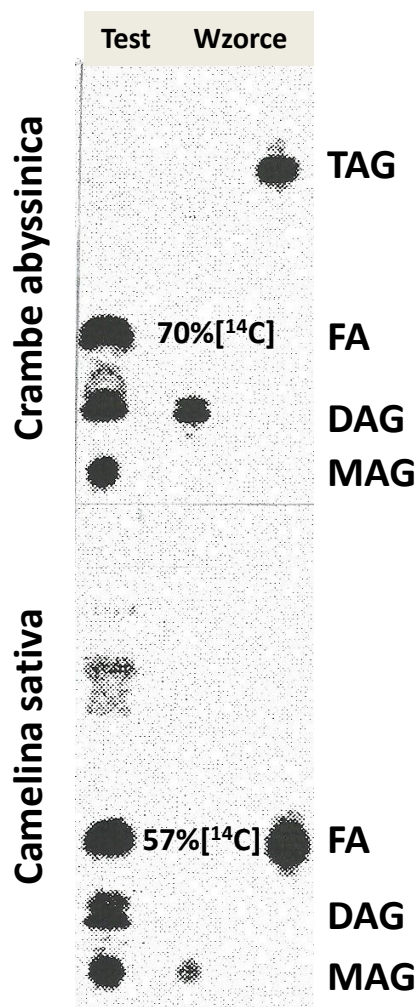
Wyniki przedstawiają wartość średnią ± odchylenie standardowe, $n \geq 4$. ^a – statystycznie istotna różnica pomiędzy testami bez dodatku jonów a testami z ich dodatkiem w dwustronnym teście różnic średnich przy $\alpha = 0,05$

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w 6. dniu kiełkowania lub *C. sativa* w 3. dniu kiełkowania, substrat {30 (*C. sativa*) lub 25 (*C. abyssinica*) nmol [^{14}C]TAG/test)} dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,5) bez lub z dodatkiem jonów dwuwartościowych; inkubację przeprowadzano przez 5 minut w 60 °C (*C. abyssinica*) lub 2,5 minuty w 55 °C (*C. sativa*).



Rycina S1. Wpływ preinkubacji mikrosomów w 90 °C (przed rozpoczęciem liofilizacji) na aktywność lipaz w nich zawartych. *Crambe abyssinica* = autoradiogram z testów z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. abyssinica*; *Camelina sativa* = autoradiogram z testów z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. sativa*

Warunki reakcji: porcje frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) poddawano preinkubacji w 90 °C przez 0 minut lub 15 minut, a następnie poddawano liofilizacji; do liofilizowanych przez noc frakcji mikrosomalnych (wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w 6. dniu kiełkowania lub *C. sativa* w 3. dniu kiełkowania), substrat ({30 (*C. sativa*) lub 25 (*C. abyssinica*) nmol [¹⁴C]TAG/test)) dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,5) z 5 mM CaCl₂; inkubację przeprowadzano przez 5 minut w 60 °C (*C. abyssinica*) lub 2,5 minuty w 55 °C (*C. sativa*).



Rycina S2. Aktywność lipaz frakcji mikrosomalnych z kiełkujących nasion *Crambe abyssinica* i *Camelina sativa* w stosunku do sn-1-sn-2-di-[^{14}C]18:1-DAG. *Crambe abyssinica* = autoradiogram z testów z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. abyssinica*; *Camelina sativa* = autoradiogram z testów z mikrosomami z kiełkujących nasion *C. sativa*. X% = % zhydrolizowanego [^{14}C]18:1 z dodanego [^{14}C]DAG

Warunki reakcji: do liofilizowanych przez noc zawiesin frakcji mikrosomalnych (zawierających 2,5 nmol endogennej fosfatydylocholiny) wyizolowanych z nasion *C. abyssinica* w 6. dniu kiełkowania lub *C. sativa* w 3. dniu kiełkowania, substrat (20 nmol [^{14}C]TAG/test) dodawano rozpuszczony w 19 μl benzenu; benzen odparowywano i dodawano 100 μl 0,1 M buforu HEPES (pH 7,5) z dodatkiem 5 mM CaCl_2 ; inkubację przeprowadzano przez 10 minut w 60 $^\circ\text{C}$ (*C. abyssinica*) lub w 55 $^\circ\text{C}$ (*C. sativa*).