



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Toruń, 21 listopada 2023 r.

Dr hab. Maciej Ostrowski, prof. UMK
Katedra Biochemii
Instytut Biologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Recenzja pracy doktorskiej Pana magistra Adama Kawińskiego, pt. „*Lipazy kielkujących nasion roślin oleistych, ze szczególnym uwzględnieniem nasion jojoba – jedynej rośliny akumulującej woski*”

Ocena formalna rozprawy

Przedstawiona do oceny praca doktorska powstała pod kierunkiem Prof. dr hab. Antoniego Banasia w Zakładzie Biochemii Roślin Międzynarodowego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Praca jest napisana w języku polskim w formie klasycznej rozprawy doktorskiej z zachowaniem prawidłowej kolejności rozdziałów. Rozprawa, uwzględniając suplement, liczy 158 stron. Proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są prawidłowe. Spis literatury obejmuje 83 pozycje prac, głównie oryginalnych artykułów opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym w okresie starszym niż ostatnie 10 lat. Wybór takich prac jest zrozumiały zważywszy na dobrze poznane i opisane w literaturze wcześniejszej zagadnienia dotyczące budowy i kiełkowania nasion, cyklu glioksalowego, glukoneogenezy, charakterystyki chemicznej wosków, czy funkcji ciał olejowych. Praca została napisana poprawnym językiem, zauważono tylko drobne potknięcia literowe. Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na niepoprawne określenie *kotyledon*, które po polsku powinno brzmieć *liścień*. W spisie literatury zapis tytułów czasopism powinien być ujednolicony (skrót lub pełna nazwa).

Tematem rozprawy była charakterystyka biochemiczna lipaz kielkujących nasion wybranych trzech roślin oleistych (jojoba, Inicznik siewny, katran abisyński). Badania te



wpisują się w część międzynarodowego projektu, którego celem jest wytworzenie roślin transgenicznych produkujących oleje bogate w woski jako magazyn substratu energetycznego. **Uważam, że podjęcie tego tematu jest w pełni uzasadnione ze względu na fakt, że lipazy potencjalnych roślin transgenicznych są dotychczas słabo scharakteryzowane. Podjęte w niniejszej pracy badania są jak najbardziej aktualne i mają duże znaczenie dla biotechnologii roślin.**

Ocena poszczególnych części rozprawy

Wstęp liczący 27 stron omawia znaczenie przemysłowe tłuszczów, charakterystykę roślin oleistych użytych w badaniach, budowę i powstawanie nasion. Szczególną uwagę poświęcono materiałom zapasowym nasion, a zwłaszcza tłuszczów, ale omówiono też białka i polisacharydy zapasowe. Dla urozmaicenia czytanego tekstu przydałoby się więcej rycin, np. schematu cyklu glioksalowego podczas omawiania metabolizmu triacylogliceroli (str. 36). Szczegółowo omówiono budowę i właściwości wosków jako głównego przedmiotu pracy.

Kolejna część: „Wprowadzenie i cel pracy” jest obszernym uzasadnieniem tematu podjętych badań. Niektóre fragmenty można było pominąć (np. szczegóły przemian cyklu glioksalowego, które bardzo dobrze zaprezentowano we Wstępie). Kluczowym procesem dla mobilizacji kwasów tłuszczowych z tłuszczów zapasowych jest hydroliza katalizowana przez lipazy. Autor zwrócił uwagę na różnice w wykorzystaniu produktów hydrolizy triacylogliceroli (kwas tłuszczowy + glicerol) i wosków (kwas tłuszczowy + alkohol długołańcuchowy). Magister Kawiński podkreślił fakt, że metabolizm wosków jest bardzo słabo poznany i z tego względu do badań użyto nasiona trzech roślin oleistych. Cel pracy został jasno sformułowany, chociaż dla większej przejrzystości można było wyraźnie (w punktach) wyodrębnić zadania badawcze do realizacji tego celu.

Rozdział „Materiał i metody” zawiera dokładny opis odczynników oraz roślin i warunków ich uprawy, które zostały użyte w badaniach. Następnie skrupulatnie przedstawiono metody badawcze. Rozdział ten umożliwi precyzyjne odtworzenie warunków doświadczeń przez innego eksperymentatora. Zwróciłbym jedynie uwagę, że charakterystyka biochemiczna lipaz została opisana ogólnie, natomiast szczegółowe warunki konkretnych reakcji, podano dopiero pod tabelami i rycinami w części „Wyniki”. Moim zdaniem, opis ten mógłby znaleźć się już w „Materiałach i metodach”.



Rozdział „Wyniki” rozpoczęto od przedstawienia procesów związanych z mobilizacją lipidów (jako profil względnej zawartości kwasów tłuszczowych i alkoholi), białek i polisacharydów podczas kiełkowania nasion jojoba. W tym miejscu nasuwają się pytania:

1. Dlaczego do pomiaru zawartości skrobi i glukozy wybrano tylko nasiona akcesji 147, a zawartość acylolipidów i białek analizowano w nasionach z czterech akcesji ?

2. Dlaczego wyniki mobilizacji białek, cukrów i lipidów przedstawiono dla maksymalnie 26 dni kiełkowania, a do analizy aktywności lipaz, hydrolizujących lipidy, wybrano frakcje mikrosomalne izolowane z nasion kiełkujących przez 14, 35 i 50 dni ?

Analizie immunochemicznej poddano zawartość oleozyn. Do tego badania użyto ekstrakty białkowe pozyskane z kiełkujących nasion, frakcji mikrosomalnych oraz ciał lipidowych wyizolowanych z dojrzałych nasion jojoba. W tym ostatnim przypadku brakuje mi opisu sposobu otrzymania ciał lipidowych.

Następnie przystąpiono do analiz kinetycznych enzymu/ów. Kolejno wyznaczono wysycenie reakcji hydrolizy oraz określono szybkość początkową (V_0) reakcji katalizowanej przez lipazy frakcji mikrosomalnej. Są to czynności nieodzowne dla dalszych badań kinetycznych enzymu.

Tabele 4 i 5 mogłyby być inaczej zaprojektowane, ponieważ niezbyt jasno prezentują wyniki.

Badanie wpływu pH na aktywność lipaz: z przedstawionych danych wynika, że badano wpływ pH zmieniając tę wartość o 1 lub 0,5 jednostki. Dla precyzyjniejszego określenia optymalnej wartości pH reakcji enzymatycznej należałoby zawęzić te wartości pomiędzy 6 a 7 co 0,1 lub 0,2 jednostki. W przeciwieństwie do hydrolazy TAG, lipaza degradująca wosk (Ryc. 15 B) prezentuje dość szeroki zakres optimum pH. **Jak Doktorant wyjaśniłby, być może w odniesieniu do innych lipaz roślinnych, ten wynik ?**

Na Ryc. 16 przedstawiono wpływ dwu buforów na aktywność lipazy TAG. **Dlaczego mimo wcześniejszego wykazania, iż zakres liniowy reakcji kończy się po 5 minutach dla określonej ilości frakcji mikrosomalnej, użytej jako źródło enzymu, inkubację prowadzono przez 15 minut ?**

W ramach charakterystyki biochemicznej lipaz zbadano także wpływ temperatury na aktywność enzymatyczną. Stwierdzono, że optymalną temperaturą dla tej reakcji jest 60°C. **Czym można wytłumaczyć tak wysokie optimum temperaturowe enzymu roślinnego ?**



Wszystkie badania biochemiczne przeprowadzono z użyciem frakcji mikrosomalnej nasion. Zakładając, że mogą być tam obecne różne enzymy i ich izoformy uczestniczące w metabolizmie lipidów, cennym byłaby próba oczyszczenia lipaz specyficznych względem wosków i triacylogliceroli i przeprowadzenie badań, np. specyficzności substratowej. Otrzymanie jednorodnego elektroforetycznie preparatu enzymu umożliwiłoby także sekwencjonowanie białka i projektowanie klonowania genu kodującego enzym. **Czy rozważał Pan takie podejście lub ewentualnie kontynuację badań w tym zakresie ?**

Oprócz reakcji hydrolizy, frakcja mikrosomalna katalizuje syntezę wosków. Dowodem potwierdzającym syntezę wosków przez lipazy mikrosomalne kiełkujących nasion jest fakt hamowania syntezy przez inhibitor lipaz – tetrahydrolipstatynę. Co ciekawe, badania wykazały, że donorem reszty kwasu tłuszczowego do syntezy wosków mogą być wolne kwasy tłuszczowe lub triacyloglicerole, lecz nie tioestry acyloCoA.

Kolejna część Wyników obejmuje rezultaty podobnych badań przeprowadzonych na nasionach katanu abisyńskiego i Inicznika siewnego. Z przyjemnością stwierdzam, że zarówno mobilizacja materiałów zapasowych, jak i właściwości biochemiczne lipaz zostały zaprezentowane przejrzystej, niż w przypadku nasion jojoba.

Dyskusja jest bardzo ciekawie napisanym rozdziałem niniejszej dysertacji świadczącym o dojrzałości naukowej Doktoranta i umiejętności krytycznego konfrontowania wyników swoich badań z pracami innych autorów. Szczególnie interesująca jest część dyskusji dotycząca hipotez rozmieszczenia lipaz i oleozyn pomiędzy ciałami olejowymi a błonami ER. Zgadzam się z Autorem, że jest to ciekawy temat i z zainteresowaniem przeczytałem hipotezy, które Doktorant stawia w kontekście lokalizacji subkomórkowej lipaz.

Równie interesująco przedyskutowano wyniki charakterystyki biochemicznej lipaz. Z zaskoczeniem skonstatowano, że mimo iż nasiona jojoba gromadzą głównie woski jako materiał zapasowy, lipazy z tych nasion wyraźnie preferowały triacyloglicerole jako substraty w degradacji hydrolitycznej. Po drugie, w przeciwieństwie do założeń, lipazy wszystkich trzech badanych roślin były, pod względem właściwości biochemicznych, podobne. Trzecim ciekawym zagadnieniem poruszonym w dyskusji jest synteza wosków przez lipazy. Jeżeli jest to, jak wskazują wyniki, reakcja katalizowana przez ten sam enzym, to interesująca jest regulacja fizjologiczna tych przeciwstawnych reakcji. **Lektura Dyskusji**



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

skłania mnie do postawienia pytania Doktorantowi, który wątek badań Autor uważa za szczególnie ciekawy i warty kontynuacji ?

Podsumowaniem pracy jest osiem prawidłowo sformułowanych wniosków.

Wniosek końcowy

Uważam że Pan magister Adam Kawiński podjął w swojej pracy doktorskiej istotny dla nauki problem badawczy. Zaprezentowane badania pozwoliły zweryfikować hipotezy sformułowane przez Autora jako cel pracy. Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo dobre opanowanie warsztatu biochemicznego związanego z analizami lipidów metodami chromatograficznymi i izotopowymi oraz, co rzadkie w dobie zaniku tradycyjnej biochemii, prawidłowe wykonanie i interpretacja badań kinetycznych enzymu.

W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pana magistra Adama Kawińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.