

SŁAWOMIR BOREK, AGNIESZKA GALOR

*Uniwersytet im. Adama Mickiewicza  
Wydział Biologii  
Zakład Fizjologii Roślin  
Umultowska 89, 61-614 Poznań  
E-mail: borek@amu.edu.pl*

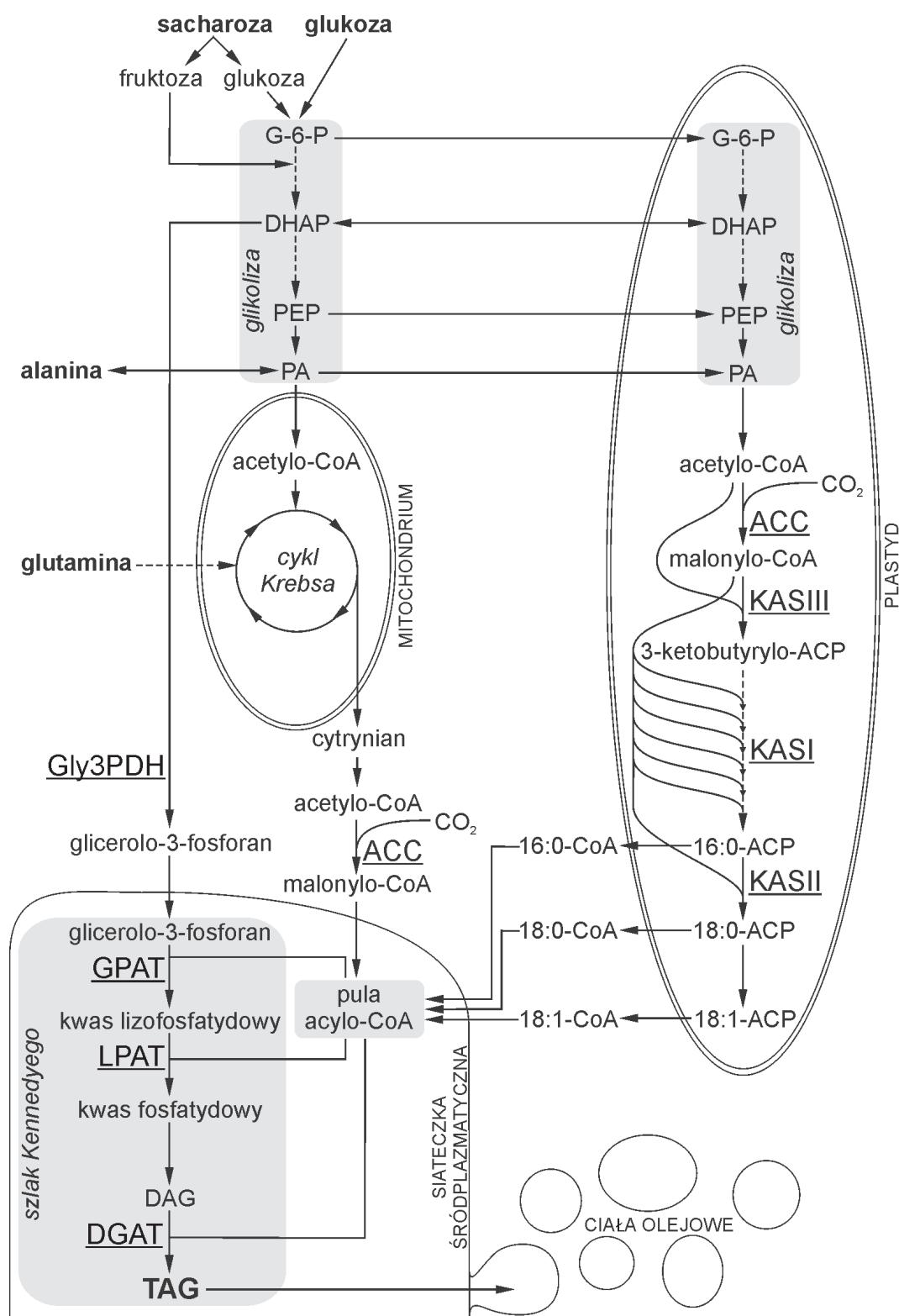
## ROŚLINY TRANSGENICZNE ŹRÓDŁEM WYSOKIEJ JAKOŚCI OLEJÓW

### WSTĘP

Rośliny o wysokiej zawartości tłuszczu w nasionach lub owocach mają dla człowieka bardzo duże znaczenie. Są przede wszystkim surowcem do produkcji olejów jadalnych. Oleje pozyskiwane z takich roślin jak słonecznik, rzepak czy soja zawierają nienasycone kwasy tłuszczowe niezbędne w prawidłowej diecie człowieka, ale mają też szerokie zastosowanie przemysłowe, między innymi w produkcji kosmetyków, rozpuszczalników, detergentów, dodatków do paliw, farb, lakierów, żywic, smarów (DYER i współaut. 2008). Rośliny akumulujące oleje w dużych ilościach, ze względu na ich powszechne wykorzystywanie, stały się obiektem zainteresowania inżynierii genetycznej. Na proces biosyntezy cząsteczki triacyloglicerolu (glicerolipidu, TAG) składa się ponad 30 reakcji, dlatego też wiele genów może kontrolować ilość oraz jakość syntetyzowanego tłuszczu (SOMERVILLE i współaut. 2000). Obecnie genomy roślin są poddawane różnym modyfikacjom. Celem tych modyfikacji może być zwiększenie produkcji oleju przez roślinę bądź też podniesienie jakości oleju poprzez zmianę składu lub wyeliminowanie z niego substancji niepożądanych. Podejmowane są również próby wykorzystania roślin jako bioreaktorów do produkcji substancji naturalnie w nich niewystępujących.

W rozwijających się nasionach zapasowy tłuszcz syntetyzowany jest przede wszystkim z cukrów (głównie sacharozy i glukozy) i z aminokwasów (głównie glutaminy i alaniny) dostarczanych przez roślinę macierzystą.

Proces biosyntezy TAG jest wieloetapowy i składają się na niego reakcje zachodzące w cytoplazmie, plastydach, mitochondriach i siateczce śródplazmatycznej. Miejscem deponowania TAG w komórkach roślinnych są struktury zwane ciałami olejowymi (oleosomami). Proces biosyntezy zapasowego tłuszczu został w bardzo dużym uproszczeniu przedstawiony na Ryc. 1. Dostarczane przez roślinę macierzystą cukry ulegają glikolizie zachodzącej zarówno w cytoplazmie, jak i w plastydach. Na terenie plastydów z cukrów powstaje acetylo-CoA, który jest bezpośrednim substratem do biosyntezy kwasów tłuszczowych. W kolejnych krokach kwasy tłuszczowe ulegają wydłużeniu zawsze o 2 atomy węgla. Dostarczycielem 2-węglowych fragmentów jest malonylo-CoA. Malonylo-CoA syntetyzowany jest z acetylo-CoA i CO<sub>2</sub> w reakcji katalizowanej przez plastydową karboksylazę acetylo-CoA (ang. acetyl-CoA carboxylase, ACC). W procesie wydłużania łańcuchów węglowych uczestniczy kompleks kilku enzymów zwany syntazą kwasów tłuszczowych (ang. fatty acid synthase, FAS). Jednym z elementów tego kompleksu są trzy izoformy syntazy 3-ketoacylo-ACP (ang. 3-ketoacyl-ACP synthase, KAS I-III). KAS I syntetyzuje kwasy tłuszczowe zawierające maksymalnie 16 atomów węgla, KAS II wydłuża je do związków 18-węglowych, a KAS III inicjuje cały proces wydłużania łańcuchów węglowych. Wydłużające się łańcuchy węglowe kwasów tłuszczowych połączone są z tzw. białkiem przenoszącym acyle (ang. acyl carrier protein, ACP).



Ryc. 1. Uproszczony schemat biosyntezy triacyloglicerolu u roślin.

ACC – karboksylaza acetylo-CoA, ACP – białko przenoszące acyle, DAG – diacyloglicerol, DAGAT – acylotransferaza diacyloglicerolu, DHAP – 3-fosfo-dihydroksyaceton, G-6-P – glukoza-6-fosforan, Gly3PDH – dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanu, GPAT – acylotransferaza glicerolo-3-fosforanu, KAS – syntaza 3-ketoacylo-ACP, LPAT – acylotransferaza kwasu lizofosfatydowego, PA – pirogronian, PEP – fosfoenolpirogronian, TAG – triacyloglicerol

W plastydach powstają tylko najbardziej typowe kwasy tłuszczowe takie jak palmitynowy (16:0), stearynowy (18:0) i oleinowy (18:1 $\Delta^9$ )\*. Dalsze wydłużanie i inne modyfikacje kwasów tłuszczowych zachodzą już w siateczce śródplazmatycznej. Tam również zachodzi biosynteza TAG z glicerolo-3-fosforanu (3-fosfoglicerynianu) i kwasów tłuszczowych. Glicerolo-3-fosforan powstaje w cytoplazmie z 3-fosfo-dihydroksyacetonu (DHAP)

w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glicerolo-3-fosforanu (Gly3PDH). W siateczce śródplazmatycznej, w procesie zwanym szlakiem Kennedyego, glicerolo-3-fosforan ulega estryfikacji kwasami tłuszczowymi kolejno w pozycji *sn-1*, *sn-2* i *sn-3* dając TAG, który jest akumulowany w ciałach olejowych (BAUD i współaut. 2008, BAUD i LEPINIEC 2010, LI-BEISSON i współaut. 2010).

#### ZWIĘKSZENIE ILOŚCI AKUMULOWANEGO OLEJU

Uzyskanie możliwie największej ilości oleju z rośliny uprawnej jest najbardziej korzystne z punktu widzenia rolnika i jest też istotne dla zastosowań przemysłowych. Efekt zwiększonej produkcji oleju przez roślinę można uzyskać w różny sposób. Jednym z nich jest modyfikacja szlaku jego biosyntezy na etapach zachodzących w plastydach (biosynteza kwasów tłuszczowych). Innym natomiast są zmiany w stadiach zlokalizowanych w cytoplazmie i siateczce śródplazmatycznej (biosynteza TAG).

Za początek szlaku biosyntezy kwasów tłuszczowych przyjmuje się powstanie malonylo-CoA w reakcji katalizowanej przez ACC (Ryc. 1). Enzym ten podlega restrykcyjnym mechanizmom regulacyjnym, a reakcja karboksylacji acetylo-CoA jest uważana za najważniejszy punkt kontrolny szlaku biosyntezy tłuszczów *de novo* (BAUD i współaut. 2008, BAUD i LEPINIEC 2010). Podjęto więc próby „ominięcia” mechanizmów regulacyjnych dla plastydowej ACC. Transformacji poddano rzepak (*Brassica napus*). Stworzono chimeryczny konstrukt składający się z trzech elementów: genu kodującego cytoplazmatyczną ACC u *Arabidopsis* (cytoplazmatyczna ACC nie podlega plastydowym mechanizmom regulacyjnym), plastydowego peptydu tranzytowego i promotora genu dla napinowego białka zapasowego z rzepaku. Skutkiem transformacji rzepaku była nadekspresja ACC w plastydach, która w konsekwencji podniosła wydajność procesu biosyntezy kwasów tłuszczowych. Zwiększona podaż kwasów tłuszczowych spowodowała wzrost poziomu akumulowanego w nasionach oleju o 5% (SOMERVILLE i współaut. 2000, DURRETT i współaut. 2008).

Znacznie lepsze rezultaty uzyskano jednak poprzez różnego rodzaju modyfikacje wprowadzane w dalszych etapach szlaku biosyntezy TAG. W związku z tym w ostatnich latach to właśnie na nich skupiają się badacze. W powstawaniu cząsteczki TAG ważną rolę pełni cytoplazmatyczna Gly3PDH, enzym syntetyzujący glicerynowe szkielety TAG (Ryc. 1) (BAUD i współaut. 2008, BAUD i LEPINIEC 2010, LI-BEISSON i współaut. 2010). Tym razem transformacji również poddano rzepak. Gen kodujący Gly3PDH (*gdp1*) u drożdży połączono z promotorem dla specyficznego dla nasion zapasowego białka napinowego. Uzyskano dwukrotny wzrost aktywności Gly3PDH, który spowodował 3-4 krotny wzrost zawartości glicerolo-3-fosforanu w rozwijających się nasionach rzepaku. Podwyższenie biosyntezy glicerolo-3-fosforanu skutkowało 40% wzrostem zawartości oleju w dojrzałych nasionach. Większa akumulacja tłuszczu w nasionach nie spowodowała obniżenia zawartości zapasowego białka (VIGOLAS i współaut. 2007).

Kolejnym enzymem kontrolującym ilość syntetyzowanego TAG jest acylotransferaza glicerolo-3-fosforanu (GPAT). Enzym ten katalizuje pierwszą reakcję w szlaku Kennedyego (acyluje glicerolo-3-fosforan do kwasu lizofosfatydowego, LPA) (BAUD i współaut. 2008, BAUD i LEPINIEC 2010, LI-BEISSON i współaut. 2010). Do transformacji *Arabidopsis* użyto genu *ctpgpat* kodującego GPAT u szafrańca (*Crocus*). W wyniku takiej transformacji zaobserwowano w nasionach *Arabidopsis* wzrost poziomu akumulowanego oleju od 10 do 21%. Transformacja rośliny zmodyfikowanym genem (*ctpgpat-tp*, dodanie plastydowej sekwencji tranzytowej) zaowocowała jeszcze

\*Liczby przed dwukropkiem oznaczają atomy węgla w cząsteczce kwasu tłuszczowego, liczby po dwukropku wskazują wiązania podwójne w cząsteczce kwasu tłuszczowego a liczby po greckiej literze  $\Delta$  określają miejsce występowania podwójnego wiązania licząc od grupy karboksylowej.

większą akumulacją oleju w nasionach sięgającą ponad 22%. *Arabidopsis* poddano również transformacji genem *plsB* kodującym GPAT u *Escherichia coli*. W tym przypadku wzrost poziomu oleju w nasionach wyniósł około 15%. Modyfikacja genu *plsB* polegająca na dodaniu sekwencji tranzytowej do siateczki śródplazmatycznej zaowocowała 18% wzrostem akumulacji oleju w nasionach (JAIN i współaut. 2000).

Poziom akumulowanego TAG limitowany może również być wydajnością acylotransferazy kwasu lizofosfatydowego (LPAT, LPAAT). Badania prowadzono na zarodkach somatycznych soi, które poddano transformacji genami kodującymi LPAT. Do zarodków wprowadzono drożdżowy gen *SLC1*. Ekspresja tego genu następowała w soi pod kontrolą specyficznego dla nasion promotora dla fazeoliny. W efekcie uzyskano wzrost zawartości TAG w transgenicznym zarodkach somatycznych o 1,5%, a w nasionach maksymalnie o 3,2%. Skład oleju nie uległ zmianie (RAO i HILDEBRAND 2009).

Bardzo intensywnie badanym w ostatnich latach enzymem kontrolującym ilość i jakość akumulowanego oleju jest acylotransferaza diacyloglicerolu (DGAT, DAGAT). Enzym ten katalizuje acylację *sn*-1,2-diacyloglicerolu (DAG) do TAG (BAUD i współaut. 2008, BAUD i LEPINIEC 2010, LI-BEISSON i współaut. 2010). Jest to bardzo istotny etap w biosyntezie zapasowego tłuszczu, gdyż DAG jest też substratem wykorzystywanym do biosyntezy fosfolipidów (BAUD i LEPINIEC 2010, LI-BEISSON i współaut. 2010). Fosfolipidy z kolei mają negatywny wpływ na jakość oleju i są z niego usuwane w procesie zwanym odśluzowaniem lub odgumowaniem (ang. degumming) (DIJKSTRA 2009). Aktywność DGAT wykazują trzy różne, niepowiązane ze sobą białka. Dwa z nich (DGAT1 i DGAT2) są białkami błonowymi zlokalizowanymi w siateczce śródplazmatycznej, natomiast trzecie (DGAT3) jest białkiem cytoplazmatycznym (LI-BEISSON i współaut. 2010). Nadekspresja

cdNA kodującego DGAT (pod kontrolą promotora napinowego) w *Arabidopsis* powodowała wzrost zawartości oleju w nasionach od 3 do 8% (JAKO i współaut. 2001). Natomiast nadekspresja *DGAT1* w rzepaku podniosła zawartość oleju w nasionach maksymalnie o 7% (TAYLOR i współaut. 2009). Ekspresja (pod kontrolą promotora napinowego) *DGAT1* z *Arabidopsis* w rzepaku dała wzrost zawartości oleju w nasionach od 3 do 6% (SHARMA i współaut. 2008). Inne badania prowadzone na tym samym gatunku pokazały, że nadekspresja *DGAT1* może podwyższyć zawartość oleju w nasionach o 14% (WESSELAKE i współaut. 2008). Uznano, że nadekspresja *DGAT1* usprawnia przepływ węgla w szlaku biosyntezy zapasowego tłuszczu w nasionach rzepaku. Nadekspresja tego genu wydaje się też być bardzo dobrą strategią w uzyskaniu odmian rzepaku charakteryzujących się zwiększoną akumulacją oleju w nasionach (TAYLOR i współaut. 2009). Jeszcze lepsze rezultaty uzyskano w badaniach prowadzonych na kukurydzy. Insercja fenyloalaniny do DGAT w pozycji 469 spowodowała wzrost zawartości tłuszczu w nasionach o 41% (ZHENG i współaut. 2008). Wzmożenie produkcji oleju w nasionach udało się również uzyskać poprzez manipulacje w ekspresji genu kodującego DGAT2. Gen *UtdGAT2A* pozyskany z grzyba glebowego *Umbelopsis ramanniana* poddano ekspresji w soi pod kontrolą specyficznego dla nasion promotora 7S- $\alpha$  prime. Aktywność DGAT w nasionach wzrosła 10-20 krotnie, lecz poziom oleju w nasionach podniósł się zaledwie o 1,5%. Zważywszy jednak na duży w skali całego świata areal uprawy soi już tak niewielki wzrost poziomu oleju może przynieść ogromne korzyści finansowe (LESSIRE i współaut. 2009). U transgenicznej soi zaobserwowano jeszcze inną bardzo pozytywną zależność, mianowicie, nie stwierdzono powszechnej u motylkowatych negatywnej relacji w akumulacji zapasowego tłuszczu i białka (LARDIZABAL i współaut. 2008).

#### MODYFIKACJE SKŁADU OLEJU KORZYSTNE DLA DIETY CZŁOWIEKA

Modyfikacje metabolizmu tłuszczu pozwalają, oprócz zwiększania lub obniżania zawartości produkowanych substancji, na syntezę związków normalnie niewystępujących w danym gatunku. Rośliny wyższe mogą syntetyzować ponad 300 rodzajów kwasów tłuszczowych. Jednak tylko 5 z nich występuje

powszechnie w tkankach roślinnych. Są to: kwas palmitynowy (16:0), stearynowy (18:0), oleinowy (18:1 $\Delta^9$ ), linolowy (LA, 18:2 $\Delta^{9,12}$ ) i  $\alpha$ -linolenowy (ALA, 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ ). Z tego względu wszystkie pozostałe kwasy tłuszczowe można by uznać za związki mniej lub bardziej nietypowe. Zdecydowana większość

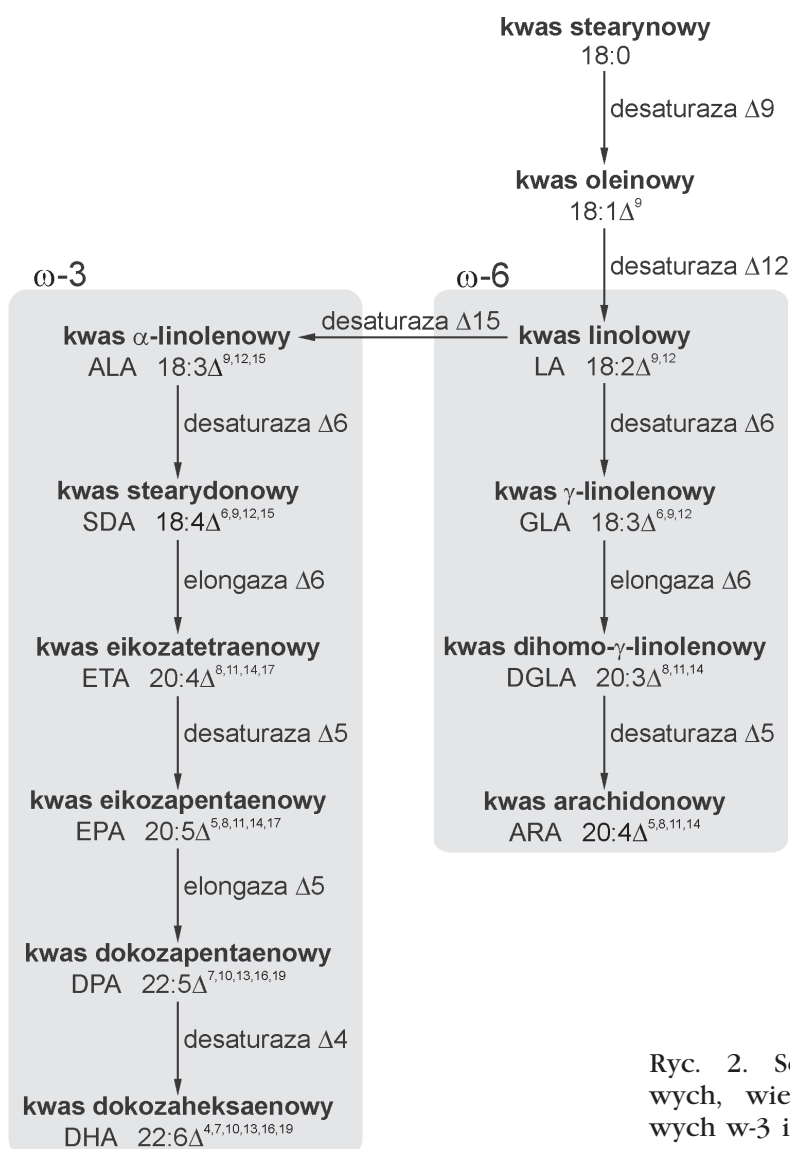
nietypowych kwasów tłuszczowych znajdująca jest w nasionach. Ich biosynteza zachodzi w rozwijających się tkankach nasion i są one akumulowane w TAG. Warto jeszcze nadmienić, że gatunki syntetyzujące różne nietypowe kwasy tłuszczowe to w zdecydowanej większości rośliny nieuprawne (NAPIER 2007).

#### BIOSYNTETA DŁUGOŁAŃCUCHOWYCH WIELONIENASYCONYCH KWASÓW $\omega$ -3 I $\omega$ -6

Do ważnych dla zdrowia człowieka długołańcuchowych (minimum 20 atomów węgla), wielonienasyconych (minimum 2 wiązania wielokrotne) kwasów tłuszczowych  $\omega$ -3 należą m.in. kwas eikozapentaenowy (EPA,  $20:5\Delta^{5,8,11,14,17}$ ), kwas dokozapentaenowy (DPA,  $22:5\Delta^{7,10,13,16,19}$ ) oraz kwas dokozaheksaenowy (DHA,  $22:6\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ ). Do kwasów  $\omega$ -6 zalicza się np. kwas arachidonowy (ARA,  $20:4\Delta^{5,8,11,14}$ ) (NAPIER 2007, VRINTEN i współaut. 2007, DYER i współaut. 2008, SAYANOVA i NAPIER 2011). Z chemicznego punktu widzenia są to kwasy tłuszczowe mające kilka wiązań wielokrotnych, z których ostatnie znajduje się przy trzecim ( $\omega$ -3) lub przy szóstym ( $\omega$ -6) licząc od końcowego, metylowanego atomu węgla. Kwasy  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 są w naturze produkowane przez bakterie i mikroalgi morskie, którymi żywią się morskie ryby i ssaki. Prowadzi to do akumulacji kwasów  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 w tkance tłuszczowej i wątrobie tych zwierząt. Z nich właśnie związki te są pozyskiwane i przetwarzane na potrzeby człowieka (NAPIER 2007, DYER i współaut. 2008, LESSIRE i współaut. 2009, SAYANOVA i NAPIER 2011). Spożywanie długołańcuchowych, wielonienasyconych kwasów  $\omega$ -3 korzystnie wpływa na wiele schorzeń. Przykładami mogą być choroba niedokrwienna serca, nadciśnienie tętnicze, zakrzepica, miażdżyca, nowotwory, egzema, zapalenie jelita, otyłość, cukrzyca, depresja, choroba Alzheimera (WCISŁO i ROGOWSKI 2006, VRINTEN i współaut. 2007, SAYANOVA i NAPIER 2011). We współczesnej diecie Zachodu stosunek kwasów  $\omega$ -6 do  $\omega$ -3 wynosi 25:1, podczas gdy czasach zamierzchłych ten stosunek wynosił 2:1. Mamy więc obecnie duży niedobór kwasów  $\omega$ -3 w diecie (SAYANOVA i NAPIER 2011). Jednakże zaspokojenie zwiększającego się zapotrzebowania w ostatnich latach na produkty zawierające długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe napotyka na pewne przeszkody. Z powodu narastającego zanieczyszczenia środowiska wodnego dochodzi do akumulacji np. metali ciężkich, dioksyn czy DDT w

tłuszczu rybim, a wzmożony odłów ryb morskich zaburza naturalną równowagę w wodnym ekosystemie (VRINTEN i współaut. 2007, DAMUDE i KINNEY 2008a, SAYANOVA i NAPIER 2011). Dlatego też naukowcy dążą do opracowania metody umożliwiającej syntezę długołańcuchowych kwasów z grupy  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 przez rośliny nasienne.

Biosynteza długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych u roślin została schematycznie przedstawiona na Ryc. 2. Kwasy nienasycone powstają w wyniku działania desaturaz katalizujących odcięcie dwóch atomów wodoru i wytworzenie podwójnego wiązania między sąsiadującymi atomami węgla. Zarówno w tkankach roślinnych, jak i zwierzęcych występuje desaturaza  $\Delta 9$  odpowiedzialna za wytworzenie wiązania podwójnego między 9 a 10 atomem węgla w kwasie stearynowym. Syntetyzuje ona kwas oleinowy, z którego w wyniku działania desaturazy  $\Delta 12$  powstaje LA ( $\omega$ -6). Z LA z udziałem desaturazy  $\Delta 6$  syntetyzowany jest kwas  $\gamma$ -linolenowy (GLA,  $18:3\Delta^{6,9,12}$ ,  $\omega$ -6), a po jego wydłużeniu katalizowanym przez elongazę  $\Delta 6$  powstaje kwas dihomogamma-linolenowy (DGLA,  $20:3\Delta^{8,11,14}$ ,  $\omega$ -6). Po kolejnej desaturacji katalizowanej przez desaturazę  $\Delta 5$  tworzy się ARA. Z kwasu oleinowego powstaje również ALA ( $\omega$ -3). Jego biosynteza katalizowana jest przez desaturazę  $\Delta 15$ . Konwersja ALA do EPA wymaga aktywności wspomnianych już wyżej enzymów, tj. desaturazy  $\Delta 6$ , elongazy  $\Delta 6$  i desaturazy  $\Delta 5$ . Biosynteza DHA z EPA wymaga dodatkowo działania elongazy  $\Delta 5$  i desaturazy  $\Delta 4$ . Desaturazy i elongazy nie wykazują specyficzności substratowej, ich efektywność jest taka sama w stosunku do wielu intermediatów szlaków biosyntezy  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 (NAPIER 2007, VRINTEN i współaut. 2007, MALEPSZY i współaut. 2009, SAYANOVA i NAPIER 2011). Wspomniane wyżej desaturazy  $\Delta 12$  i  $\Delta 15$  występują wyłącznie u roślin. Umożliwiają więc one roślinom syntezę LA i ALA, które z kolei są prekursorami długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z grupy  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6. Desaturazy  $\Delta 12$  i  $\Delta 15$  nie występują natomiast u ssaków. Z tego powodu człowiek nie jest zdolny do biosyntezy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych takich jak LA i ALA. Kwasy te muszą być pozyskiwane z pożywienia i określane są mianem „niezbędnych kwasów tłuszczowych” (NKT). Do grupy NKT należą wszystkie związki, które nie są produkowane przez organizm człowieka, a jednocześnie są potrzebne do prawidłowe-



Ryc. 2. Schemat biosyntezy długołańcuchowych, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych ω-3 i ω-6 u roślin.

go funkcjonowania i muszą być pobierane z pożywienia. Zalicza się do nich wszystkie kwasy z grupy ω-3 i ω-6 (MALEPSZY i współaut. 2009). W organizmie człowieka biosynteza EPA i DHA może zachodzić z przyjmowanych z pożywieniem LA i ALA, lecz jest to proces wysoce niewydajny. Zaledwie 0,1% ALA może być przekształcone do EPA i 0,4% EPA może ulec konwersji do DHA. EPA i DHA są efektywniej syntetyzowane u kobiet niż u mężczyzn (SAYANOVA i NAPIER 2011).

Poznanie poszczególnych etapów biosyntezy długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych u bakterii i mikroalg morskich (również niektórych mszaków i grzybów) stworzyło szansę ukierunkowanej modyfikacji gatunków roślin modelowych i użytkowych. Uzyskano rośliny transgeniczne, do których wprowadzono kluczowe geny

odpowiedzialne za syntezę kwasów tłuszczowych w komórkach glonów. Wykorzystano do tego celu mikroalgi *Isochrysis galbana*, z których wyizolowano gen dla elongazy Δ9. Gen ten wprowadzono do *Arabidopsis* i zbadano efektywność procesu biosyntezy długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Okazało się, że roślina w organach wegetatywnych syntetyzowała i akumulowała w znacznych ilościach kwas eikozadienowy (EDA, 20:2Δ<sup>11,14</sup>, ω-6) i eikozatrienowy (ETriA, 20:3Δ<sup>11,14,17</sup>, ω-3). Kwasy te stanowiły ok. 15% wszystkich związków tłuszczowych (MALEPSZY i wsp. 2009). *Arabidopsis* poddano również jednoczesnej transformacji trzema genami: elongazy Δ9 z *Isochrysis galbana*, desaturazy Δ8 z *Euglena gracilis* i desaturazy Δ5 z grzyba *Mortierella alpina*. Ich ekspresja w roślinie zaowocowała syntezą wieloniena-

syconych kwasów tłuszczowych w organach wegetatywnych. Zawartość EPA w liściach wyniosła 3% a zawartość ARA 6,6% (DAMUDE i KINNEY 2008a).

Pozytywne rezultaty badań wykonanych na roślinie modelowej skierowały uwagę badaczy na rośliny użytkowe. Olej otrzymany z tradycyjnej uprawy rzepaku zawiera około 26% wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Nie zawiera on jednak kwasu stearidonowego (SDA, 18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$ ,  $\omega$ -3), który może być doskonałym ekwiwalentem EPA w diecie człowieka. Udało się jednak uzyskać genetycznie zmodyfikowane odmiany rzepaku zawierające ten kwas w nasionach. Do genomu rzepaku wprowadzono geny dla desaturazy  $\Delta 6$  i  $\Delta 12$  z *Mortierella alpina*. Dodatkowo wywołano nadekspresję desaturazy  $\Delta 15$ . Takie połączenie trzech genów i wprowadzenie ich w jednym wektorze spowodowało syntezę SDA na maksymalnym poziomie 23%. W kolejnych pokoleniach poziom SDA sięgał 16%, a całkowita zawartość kwasów  $\omega$ -3 (ALA + SDA) wynosiła ponad 60%. Natomiast zawartość kwasów  $\omega$ -6 (LA + GLA) wahała się wokół 20% (URSIN 2003). W innych badaniach wykorzystywano desaturazę  $\Delta 6$  z ogórecznika lekarskiego (*Borago officinalis*). Badania prowadzono na kilku gatunkach (w tym tytoniu i soi). Akumulacja GLA i SDA sięgała 40%. Co ciekawe, zawartość GLA była taka sama (lub nawet wyższa) jak zawartość tego kwasu w roślinach, z których pobrano geny do transformacji (NAPIER 2007). Ekspresja u transgenicznej soi genu desaturazy  $\Delta 6$  z *Mortierella alpina* spowodowała akumulację SDA w nasionach na poziomie ponad 20%. Zawartość SDA wzrosła do 30%, gdy w transgenicznej soi wywołano jednoczesną ekspresję genu desaturazy  $\Delta 6$  z ogórecznika i genu desaturazy  $\omega$ -3 z *Arabidopsis*. W 2008 r. biotechnologiczna firma Monsanto rozpoczęła przygotowania do wprowadzenia na rynek genetycznie zmodyfikowanej soi wytwarzającej olej zawierający SDA. Jest to pierwszy komercyjnie dostępny z rośliny transgenicznej olej o podwyższonej zawartości wielonienasyconych kwasów  $\omega$ -3 (DAMUDE i KINNEY 2008b).

Podjęto także próby uzyskania transgenicznego tytoniu (wysoka zawartość LA) oraz lnu (wysoka zawartość ALA) produkującego długołańcuchowe kwasy  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6. Oczekiwano wzmożonej syntezy ARA u tytoniu i EPA u lnu. Do roślin tych wprowadzono desaturazę  $\Delta 6$  z glonów i elongazę z mchów. Niestety, wyniki nie były zadowalające. W na-

sionach transgenicznych roślin poziom ARA i EPA wzrósł nieznacznie, bo jedynie do 1%. Wynik taki był zaskakujący również z tego powodu, że produkty desaturazy  $\Delta 6$  kumulowały się na wysokim poziomie i stanowiły do 25% wszystkich związków tłuszczowych, jednak ich dalsza przemiana w ARA i EPA nie zachodziła. Późniejsze szczegółowe badania dowiodły, że metabolity pośrednie lokalizowane były w dużych ilościach w fosfolipidach. Większym sukcesem zakończyły się próby uzyskania transgenicznej soi i gorzycy (*Brassica juncea*). W tym przypadku także użyto desaturazy  $\Delta 6$  z glonów i elongazy z mchów oraz dodatkowo do soi i gorzycy wprowadzono desaturazę  $\Delta 12$  i desaturazę  $\omega$ -3. Otrzymano rośliny o zawartości EPA w nasionach osiagającej 15–20% (NAPIER 2007). W innych badaniach do zarodków somatycznych soi wprowadzono desaturazę  $\Delta 5$ , desaturazę  $\Delta 6$  i elongazę z *Mortierella alpina* oraz dodatkowo wyciszono gen desaturazy  $\Delta 15$ . W tak transformowanych roślinach stwierdzono występowanie GLA, EDA, DGLA i ARA, kwasów, które normalnie nie są przez soję wytwarzane. Kwasy te w zarodkach somatycznych stanowiły 11%, a w dojrzałych nasionach 8,4% wszystkich kwasów tłuszczowych (CHEN i współaut. 2006). Transgeniczne rośliny produkujące relatywnie duże ilości EPA posłużyły do dalszych modyfikacji pozwalających na syntezę DHA (poprzez wprowadzenie dodatkowej desaturazy i elongazy). Uzyskane rezultaty pokazały, że akumulacja DHA była znacznie niższa niż produkcja wcześniej wspomnianych kwasów. Zawartość DHA u transgenicznej *Arabidopsis* wyniosła 0,5%, u *Brassica juncea* 1,5% a u soi 3,3%. Biosynteza DHA u transgenicznej soi możliwa była dzięki ekspresji desaturazy  $\Delta 5$ , desaturazy  $\Delta 6$  i elongazy  $\Delta 6$  z *Mortierella alpina* oraz elongazy  $\Delta 5$  z glonu *Pavlova*, desaturazy  $\Delta 4$  z grzyba *Schizochytrium aggregatum* i desaturazy  $\Delta 17$  z *Schizochytrium diclina* (NAPIER 2007, VRINTEN i współaut. 2007, SAYANOVA i NAPIER 2011).

#### RYŻ SYNTETYZUJĄCY SKONIUGOWANY KWAS LINIOWY

Do niezbędnych kwasów tłuszczowych zalicza się także skoniugowany kwas linolowy (CLA, kwas rumenowy, sprzężony kwas linolowy, 18:2). Odkąd udokumentowane zostało jego silne działanie antykancerogenne, antymiażdżycowe oraz jego pozytywny wpływ na układ immunologiczny i metabolizm tłuszczu jest bardzo pożądanym w diecie

człowieka. Naturalnie występuje w tłuszczu mleka i wołowinie. Posiada dwa sprzężone wiązania podwójne i występuje najczęściej w dwóch formach izometrycznych: 9-*cis* 11-*trans* i 10-*trans* 12-*cis*. Jego prozdrowotne działanie zawdzięczane jest izomerowi 10-*trans* 12-*cis*. Geny kodujące izomery zdolne do przekształcania kwasu linolowego (9-*cis* 12-*cis*) do jego formy skoniugowanej (10-*trans* 12-*cis*) uzyskano z bakterii *Propionibacterium acnes*. Geny te wykorzystano do transformacji ryżu. Stosując różne, specyficzne dla nasion promotory, uzyskiwano rośliny o zmiennej efektywności biosyntezy formy 10-*trans* 12-*cis*. W przypadku zastosowania promotora globuliny CLA stanowił zaledwie 0,01% wszystkich kwasów tłuszczowych. Natomiast wprowadzenie promotora oleozyny spowodowało zwiększenie zawartości CLA do 1,3%. Ponadto 70% izomeru 10-*trans* 12-*cis* CLA znajdowało się we frakcji triacylogliceroli a 28% we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych (KOHNO-MURASE i współaut. 2006).

#### SOJA O OBNIŻONEJ ZAWARTOŚCI KWASÓW NIENASYCONYCH I WIELONIASYCONYCH

Czynnikami regulującymi poziom wielonienasyconych kwasów tłuszczowych są desaturazy zlokalizowane w siateczce śródplazmatycznej. Przykładem takich desaturaz może być desaturaza  $\Delta 12$  i desaturaza  $\Delta 15$ , które u *Arabidopsis* kodowane są przez geny *FAD2* i *FAD3* (BAUD i współaut. 2008, BAUD i LEPINIEC 2010). Analogiczne geny zostały zidentyfikowane również u soi. Supresja desaturazy  $\Delta 12$  (desaturaza kwasu oleinowego) spowodowała u soi wzrost zawartości kwasu oleinowego z mniej niż 10% do ponad 85% wszystkich kwasów tłuszczowych. Związek ten jest kwasem nienasyconym jednak dużo bardziej stabilnym niż kwas linolowy i  $\alpha$ -linolenowy (DYER i współaut. 2008). Wprowadzona supresja spowodowała dodatkowo spadek zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych takich jak: palmitynowego (16:0) i stearynowego (18:0) z 15% do mniej niż 5%. Taki skład otrzymanego oleju jest korzystny dla diety człowieka, ponieważ spożywanie kwasów nasyconych powinno być ograniczone. Kwas palmitynowy podwyższa poziom całkowitego cholesterolu w osoczu i poziom cholesterolu u frakcji lipoproteiny niskiej gęstości (LDL) u zwierząt i ludzi (STIEWE i współaut. 2010). Skutkiem transformacji soi było też obniżenie zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych,

które wprawdzie są korzystne dla człowieka, ale szybko się utleniają oraz są niestabilne w wysokich temperaturach i nie powinny być składnikiem oleju, służącego głównie do smażenia. Oleje o obniżonej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych są też trwalsze. W olejach o bardzo dobrej jakości smażenia szczególnie korzystna jest wysoka zawartość kwasu oleinowego, gdyż takie oleje mają stabilność cieplną równoważną tłuszczom nasyconym (STIEWE i współaut. 2010).

#### RZEPAK O PODWYŻSZONEJ ZAWARTOŚCI KWASU OLEINOWEGO

Olej rzepakowy wytwarzany ze współcześnie uprawianych odmian (zwanych Canola) zawiera 60% kwasu oleinowego (DYER i współaut. 2008). Aby polepszyć parametry oleju pod kątem stabilności cieplnej można zwiększyć w nim zawartość kwasu oleinowego (STIEWE i współaut. 2010). Udało się uzyskać transgeniczne odmiany rzepaku akumulujące do 89% kwasu oleinowego, z jednoczesną redukcją zawartości kwasów wielonienasyconych. Wzrost akumulacji kwasu oleinowego uzyskano poprzez wywołanie supresji desaturazy  $\Delta 12$  (desaturaza kwasu oleinowego) (SCARTH i TANG 2006). Poprzez supresję desaturazy  $\Delta 12$  udało się też uzyskać odmiany słonecznika i bawełny o podwyższonej zawartości kwasu oleinowego (DYER i współaut. 2008).

#### RZEPAK O PODWYŻSZONEJ ZAWARTOŚCI KWASU STEARYNOWEGO

Oleje roślinne o wysokiej zawartości kwasów tłuszczowych nasyconych mają zastosowanie w wytwarzaniu spożywczych tłuszczów stałych, takich jak margaryna i tłuszcz piekarski. Pomiąć wtedy można etap utwardzania tłuszczu (uwodorniania) oraz uniknąć wytwarzania niepożądanych kwasów trans (DIJKSTRA 2009). Kwas stearynowy (18:0) ma przewagę nad innymi kwasami nasyconymi ponieważ redukuje lub nie podnosi poziomu cholesterolu frakcji LDL w surowicy (STIEWE i współaut. 2010). Nietransgeniczne odmiany rzepaku zawierają tylko od 1,1 do 2,5% kwasu stearynowego w oleju nasion. Poziom tego kwasu tłuszczowego udało się zwiększyć do ponad 22% poprzez ekspresję w rzepaku genu *FatA* z mangostanu właściwego (*Garcinia mangostana*). Innym sposobem na zwiększenie poziomu kwasu stearynowego jest wywołanie supresji desaturazy



$\Delta 9$  (desaturaza kwasu stearynowego, enzym syntetyzujący kwas oleinowy). Antysensowna ekspresja genu desaturazy  $\Delta 9$  z rzepy (*Brassica rapa*) spowodowała wzrost zawartości kwasu oleinowego do ponad 32% u transgenicznej rzepy i do 40% u transgenicznego rzepaku. Trzecia strategia zwiększenia zawartości kwasu stearynowego to jednoczesna manipulacja aktywnością dwóch enzymów. Nadekspresja genu tioesterazy FatA i jednoczesne obniżenie aktywności desaturazy  $\Delta 9$  zwiększyło poziom kwasu stearynowego do

45%. Ekspresja tych genów osobno dawała gorsze rezultaty. Ekspresja genu tioesterazy FatA – wzrost do 11%, a ekspresja genu desaturazy  $\Delta 9$  – 13%. Jeszcze innym sposobem na uzyskanie odmian rzepaku o zwiększonej zawartości kwasu stearynowego może okazać się wywołanie obniżonej aktywności desaturazy  $\Delta 9$  i  $\Delta 12$ . Wykazano bowiem, że wyciszenie genów dla tych dwóch enzymów spowodowało w nasionach bawełny wzrost zawartości kwasu stearynowego z 2–3% do 40% (STIEWE i współaut. 2010).

### MODYFIKACJE SKŁADU OLEJU POŻĄDANE DLA ZASTOSOWAŃ TECHNICZNYCH

Szacuje się, że z globalnej produkcji olejów roślinnych (137 milionów ton w latach 2009/2010) na potrzeby żywieniowe człowieka wykorzystywane jest 74%, jako pasza dla zwierząt 6%, a 20% znajduje zastosowania przemysłowe. W przemyśle niespożywczych oleje używane są przede wszystkim do produkcji biopaliw (METZGER 2009). Biodiesel pod względem budowy chemicznej to metylowe (lub etylowe) estry kwasów tłuszczowych. Biodiesel wprowadza do atmosfery znacznie mniej tlenu węgla i związków siarki w porównaniu do paliw kopalnych (DURRETT i współaut. 2008). Kwasy tłuszczowe, jak np. kwas laurynowy, są znakomitymi surfaktantami i dlatego wchodzi w skład różnego rodzaju mydeł i detergentów. Innym przykładem może być kwas erukowy używany do produkcji foliowych toreb spożywczych i worków na śmieci. Kwasy tłuszczowe znalazły również szerokie zastosowanie w motoryzacji i produkcji maszyn. Są bardzo dobrym materiałem do wyrobu substancji smarnych. Swoją przydatność zawdzięczają takim cechom jak obojętność chemiczna, wysoki współczynnik lepkości, wysoka temperatura zapłonu oraz niska lotność. Także woski są wykorzystywane w motoryzacji. Używa się ich do produkcji środków zapobiegających rdzewieniu oraz jako dodatek przeciwpiejący do produkcji smarów. Woski chronią części maszyn szczególnie narażone na tarcie przez jego redukcję i zapobiegają przedwczesnemu zużyciu maszyny. Kwasy tłuszczowe znalazły również zastosowanie w przemyśle papierniczym. Służą do produkcji tuszów, atramentów do drukarek oraz farb drukarskich. Także pochodne kwasów tłuszczowych mają szerokie zastosowanie. Estrы kwasów tłuszczowych są także intermediami w

produkcji alkoholi oraz wchodzi w skład rozpuszczalników i kosmetyków. Są wykorzystywane do produkcji biodiesla. Glicerol także jest cennym surowcem przemysłowym. Służą do produkcji farmaceutyków, farb, kosmetyków, żywic syntetycznych a także materiałów wybuchowych. Alkohole kwasów tłuszczowych znalazły zastosowanie w przemyśle skórzanym i papierniczym oraz jako dodatki do paliw. Przydatne są również amidy kwasów tłuszczowych, które wykorzystuje się do produkcji biocydów, surfaktantów, zmiękczaczy do tkanin. Stosuje się je również w przemyśle tekstylnym i włókienniczym a nawet przy budowie dróg. Zagęszczone oleje mają zastosowanie przy produkcji farb, lakierów i linoleum (DYER i współaut. 2008).

#### ARABIDOPSIS THALIANA SYNTEZUJĄCA NIETYPOWE KWASY TŁUSZCZOWE

Przykładem nietypowych kwasów tłuszczowych jednonienasyconych może być kwas palmitooleinowy ( $16:1\Delta^6$ ) i kwas petroselinowy ( $18:1\Delta^6$ , izomer kwasu oleinowego). Kwas palmitooleinowy występuje w dużych ilościach (około 80%) u tunbergii (*Thunbergia allata*) a kwas petroselinowy w nasionach kolendry (*Coriandrum sativum*) stanowi może 80% oleju. Oba kwasy mogą ulegać skróceniu w miejscu podwójnego wiązania, dając w ten sposób kwas adypinowy (6:0). Jest to kwas dwukarboksylowy używany do produkcji plastików i nylonów; dodawany jest także do żywności jako regulator kwasowości i środek spulchniający (E355). Poyzyskiwany jest z ropy naftowej lub syntezy chemicznej (STATHAM 2006, DYER i współaut. 2008). Zarówno kwas palmitooleinowy, jak i petroselinowy powstają dzięki desaturazom acylo-ACP spokrewnionym z powszechnie

występującą desaturazą  $\Delta 9$  (desaturaza kwasu stearynowego, enzym syntetyzujący kwas oleinowy). Desaturaza z kolendry katalizuje reakcję w pozycji  $\Delta 4$  16:0-ACP na następnie kwas tłuszczowy jest wydłużany do związku 18-węglowego z podwójnym wiązaniem w pozycji  $\Delta 6$ . Z kolei u tunbergii jest to desaturaza  $\Delta 6$  16:0-ACP. Uzyskanie roślin transgenicznych syntetyzujących kwas palmitoleinowy i petroselinowy okazało się bardzo trudne pomimo wielu prób. Transformacji poddawano *Arabidopsis*, w której udawało się uzyskać ekspresję zarówno desaturazy  $\Delta 4$  16:0-ACP z kolendry, jak i desaturazy  $\Delta 6$  16:0-ACP z tunbergii. Transformowane rośliny produkowały pożądane kwasy tłuszczowe, ale zaledwie na poziomie od 1 do 15%. Wynik okazał się niezadowolający wobec 80% poziomu badanych kwasów w gatunkach, z których pozyskano odpowiednie geny. Przypuszcza się, że wprowadzone do *Arabidopsis* enzymy nie współdziałały prawidłowo z plastydowym, natywnym aparatem enzymatycznym. Dodatkowo przyczyn niepowodzenia upatruje się w bardzo specyficznym, nie do końca poznanym szlaku biosyntezy TAG, zawierających kwas palmitoleinowy i petroselinowy. Stwierdzono bowiem, że w tym procesie wspomniane kwasy przejściowo lokalizowane są w fosfatydylocholinie (DYER i współaut. 2008).

W trakcie badań nad roślinami transgenicznymi zauważono, że u odmian syntetyzujących różne nietypowe kwasy tłuszczowe ich akumulacja była na relatywnie niskim poziomie. Rośliny te jednak akumulowały znaczne ilości kwasu oleinowego. Sugerowało to, że biosynteza nietypowych kwasów tłuszczowych w jakiś sposób upośledza desaturację kwasu oleinowego do kwasu linolowego (desaturaza  $\Delta 12$ ). Jest to dużym problemem przy uzyskiwaniu odmian syntetyzujących nietypowe kwasy tłuszczowe, których bezpośrednim prekursorem jest kwas linolowy. Przykładem takiego nietypowego kwasu tłuszczowego może być kwas wernolowy (12-epoksy-18:2 $\Delta^{9,15}$ ). Jest to 18-węglowy kwas tłuszczowy z grupą epoksydową w pozycji  $\Delta 12$ . Kwas wernolowy wykorzystywany jest do produkcji epoksydowych klejów, lakierów, farb, powłok przemysłowych i rozpuszczalników. Jest to związek pozyskiwany z nasion *Vernonia galamensis*, gatunku naturalnie występującego i uprawianego w zachodniej Afryce. Uprawa tej rośliny poza obszarem jej naturalnego występowania jest nieekonomiczna ze względu na plony złej ja-

kości. Uzyskano transgeniczne odmiany *Arabidopsis* z ekspresją genu *Cpal2* kodującego epoksygenazę  $\Delta 12$  u *Crepis palaestina*. Aby przewyciężyć jednak spadek desaturacji kwasu oleinowego do linolowego, wywołano ograniczenie aktywności innych enzymów, dla których kwas oleinowy jest substratem, oraz jednocześnie spowodowano nadekspresję desaturazy  $\Delta 12$ . W tak transformowanych roślinach akumulacja kwasu wernolowego wzrosła z 6% do 21%. Taki wynik nie jest jednak zadowolający z tego względu, gdyż zawartość kwasu wernolowego u *Crepis palaestina* może osiągać aż 60% (NAPIER 2007, DYER i współaut. 2008). Podobny układ doświadczalny wykorzystano również do transformacji bawełny. Poziom kwasu wernolowego w nasionach bawełny wyniósł 16,9% (NAPIER 2007). Ostatnie badania nad biosyntezą epoksy-pochodnych kwasów tłuszczowych pokazały, że znacznie lepsze rezultaty osiąga się jeśli u rośliny transformowanej wywoła się jednocześnie nadekspresję genu kodującego DGAT2 (LESSIRE i współaut. 2009).

#### ARABIDOPSIS THALIANA O PODWYŻSZONEJ ZAWARTOŚCI WOSKÓW

U niektórych gatunków akumulowany olej zawiera znaczne ilości płynnych wosków. Przykładem takiej rośliny może być jojoba (*Simmondsia chinensis*). Woski są to estry kwasów tłuszczowych monokarboksyłowych i wyższych alkoholi monowodorotlenowych. W biosyntezie wosków uczestniczy reduktaza kwasów tłuszczowych (przekształca kwas tłuszczowy w alkohol I-rzędowy) i syntaza wosku (estryfikuje alkoholem kwas tłuszczowy z acylo-CoA) (DYER i współaut. 2008). Oba enzymy zostały wyizolowane i oczyszczone z jojoba i na podstawie sekwencji aminokwasowej sklonowano odpowiednie geny. Transformacja *Arabidopsis* tymi genami spowodowała wysoką akumulację wosków w nasionach transgenicznych roślin (LARDIZABAL i współaut. 2000). Pomimo ogromnych potencjalnych korzyści wynikających z uzyskania roślin o zwiększonej zawartości wosków badania nie były kontynuowane.

#### RZEPAK O PODWYŻSZONEJ ZAWARTOŚCI KWASU ERUKOWEGO

Współcześnie uprawiane odmiany rzepaku zawierają niewielkie ilości kwasu erukowego (22:1 $\Delta^{13}$ ). Kwas ten jest szczególnie niepożądany w diecie człowieka, gdyż powoduje poważne schorzenia serca (SCARTH i TANG 2006). Odmiany niskoerukowe zwane

Canola (lub LEAR, ang. low erucic acid rape) powstały w wyniku intensywnych, 20-letnich badań rozpoczętych w latach 50. ubiegłego wieku. Odmiany Canola uzyskano z odmian HEAR (ang. high erucic acid rape) zawierających znaczne ilości (do 50%) kwasu erukowego. Nie stosowano wtedy technik inżynierii genetycznej, lecz krzyżowanie i selekcję. Zidentyfikowano wtedy i wykorzystano naturalne mutacje występujące w dwóch genach syntazy  $\beta$ -ketoacylo-CoA. Późniejsze badania pokazały, że wprowadzenie do odmiany Canola genu dla  $\beta$ -ketoacylo-CoA z jojoba przywracało wysoki poziom kwasu erukowego (SOMERVILLE i współaut. 2000). Wyeliminowanie kwasu erukowego w odmianach LEAR spowodowało jednocześnie radykalny wzrost zawartości kwasu oleinowego (z 15% do ok. 60%) w oleju rzepakowym (DYER i współaut. 2008, SOMERVILLE i współaut. 2000, STIEWE i współaut. 2010). Odmiany niskoerukowe szybko zdominowały uprawy rzepaku. Jednakże kwas erukowy, mimo iż niepożądany w diecie człowieka, stawał się coraz cenniejszym surowcem w przemyśle niespożywczym. Wykorzystywany jest on do produkcji środków smarnych, plastikowych folii, środków do pielęgnacji skóry, środków antypięniących czy faktysów (produkcja kauczuku) (DYER i współaut. 2008, STIEWE i współaut. 2010). Doliczono się ponad 200 zastosowań przemysłowych i ponad 1000 patentów na wykorzystanie kwasu erukowego (SCARTH i TANG 2006).

W oleju rzepakowym kwas erukowy znajduje się wyłącznie w pozycjach *sn-1* i *sn-3* TAG. Nie ma go w pozycji *sn-2* TAG, gdyż enzym katalizujący acylację TAG w tej pozycji (LPAAT) u rzepaku nie jest specyficzny dla kwasu erukowego. Ogranicza to naturalnie jego zawartość w pozyskiwanym oleju do 66%. Aby zwiększyć ilość kwasu erukowego należy tak pokierować procesem biosyntezy, aby był on przyłączany do TAG także w pozycji *sn-2*. U *Limnanthes alba* (zwana także perłą prerii) zidentyfikowano gen LPAAT kodujący enzym przyłączający kwas erukowy właśnie w pozycji *sn-2* TAG. Transformacja rzepaku genem kodującym LPAAT z *Limnanthes alba* spowodowała tylko nieznaczny wzrost zawartości kwasu erukowego z powodu jego redystrybucji z pozycji *sn-1* i *sn-3* w pozycję *sn-2*. Okazało się, że ekspresja genu dla LPAAT z *Limnanthes alba* wpływa znacząco na podwyższenie poziomu kwasu erukowego dopiero wtedy, gdy jego działanie połączone jest z nadekspresją rzepakowego

genu dla elongazy 1 (*FAE 1*). Takie połączenie dało w efekcie wzrost zawartości kwasu erukowego w nasionach do 70% (DYER i współaut. 2008).

Obecnie poszukiwane są odmiany rzepaku SHEAR (ang. super high erucic acid rape), w których uzyskano by zawartość kwasu erukowego na poziomie ponad 80%. Tak wysoka zawartość jest pożądana ze względu na redukcję kosztów produkcji tego kwasu tłuszczowego i jego pochodnych, jako odnawialnego i przyjaznego dla środowiska surowca przemysłowego. W celu uzyskania takich odmian rzepaku do transformacji wykorzystuje się geny *FAE* z nasturcji (*Tropaeolum majus*). Jest to gatunek, który naturalnie akumuluje bardzo wysokie ilości kwasu erukowego (STIEWE i współaut. 2010).

#### RZEPAK SYNTETYZUJĄCY KWASY TŁUSZCZOWE O ŚREDNIEJ DŁUGOŚCI

Kwas laurynowy (12:0) wykorzystywany jest przede wszystkim do produkcji mydeł, szamponów, detergentów i surfaktantów. Pozyskiwany jest z oleju kokosowego i palmowego (SOMERVILLE i współaut. 2000, DYER i współaut. 2008). Kluczowym enzymem biorącym udział w syntezie kwasu laurynowego jest 12:0-ACP tioesteraza. Gen dla ACP tioesterazy z lauru kalifornijskiego (*Umbellularia californica*) wprowadzono pierwotnie do *Arabidopsis*, a później do rzepaku. Ekspresja genu następowała pod kontrolą promotora specyficznego dla nasion zapasowego białka napinowego. Transformacja ta spowodowała drastyczną zmianę w długości syntetyzowanych kwasów tłuszczowych. Zawartość kwasu laurynowego w nasionach transgenicznego rzepaku wzrosła od ilości śladowych do niemal 60%, natomiast radykalnie obniżył się poziom kwasu oleinowego i linolowego (SOMERVILLE i współaut. 2000, DYER i współaut. 2008). Analiza TAG w oleju transgenicznych roślin pokazała, że kwas laurynowy znajdował się głównie w pozycji *sn-1* i *sn-3* glicerolu, natomiast rzadko estryfikował pozycję *sn-2*. Aby przezwyciężyć ten problem wykorzystano do transformacji rzepaku również geny kodujące LPAAT u palmy kokosowej (główne źródło kwasu laurynowego). Taka transformacja spowodowała wyraźnie wyższą estryfikację kwasem laurynowym pozycję *sn-2* glicerolu, co w ostatecznym efekcie spowodowało wzrost kwasu laurynowego w oleju rzepakowym do 67% (DYER i współaut. 2008). Transgeniczne odmiany rzepaku o podwyższonej zawartości kwasu lauryno-

wego były pierwszymi, z których pozyskano surowiec w celach komercyjnych. Było to w 1995 r. (SOMERVILLE i współaut. 2000).

Przy zastosowaniu podobnego podejścia eksperymentalnego uzyskano odmiany rzepaku syntetyzujące kwas kaprylowy (8:0) i kwas kaprynowy (10:0). Akumulacja kwasu kaprylowego w oleju rzepakowym wyniosła 8%, a kaprynowego 30%. Zawartość tych dwóch kwasów tłuszczowych była jednak wyraźnie niższa niż zawartość kwasu laurynowego zarówno w transgenicznym, jak i nietransformowanym odmianach rzepaku. Przyczyny tego faktu dopatruje się w tym, że w transgenicznym rzepaku krótsze kwasy tłuszczowe efektywniej są utylizowane w procesie  $\beta$ -oksydacji niż akumulowane w TAG. Stwierdzono bowiem wysoką zawartość tych kwasów tłuszczowych w puli acylo-CoA lecz w TAG było ich niewiele (DYER i współaut. 2008).

#### TYTOŃ SYNTETYZUJĄCY KWAS RYCYNOLEINOWY

Kwas rycynoleinowy (12-hydroksy-18:1 $\Delta^9$ ) wykorzystywany jest do produkcji poliamidu 11 (nylonu 11), żywic, smarów, płynów hydraulicznych, plastików, a jego pochodne także do produkcji odpornych na wysokie temperatury smarów stosowanych w silnikach odrzutowych (SOMERVILLE i współaut. 2000, BURGAL i współaut. 2008, GRESSEL 2008). Pozyskiwany jest z nasion rącznika pospolitego (*Ricinus communis*), u którego zawartość kwasu erukowego w TAG może sięgać 90% (NAPIER 2007, BURGAL i współaut. 2008, LESSIRE i współaut. 2009). Jego szerokie zastosowanie wiąże się z dość dużym zapotrzebowaniem. Jednak pozyskiwanie tego surowca napotyka pewne trudności. Rącznik jest bowiem uprawiany w krajach niezindustrializowanych, rozwijających się i jest niezbyt popularnym gatunkiem. Plony uzyskiwane z plantacji są stosunkowo niskie. Poza tym nasiona rącznika zawierają liczne alergeny i toksyny, w tym rycynę, która jest silnie toksyczną lektyną (SOMERVILLE i współaut. 2000, NAPIER 2007, GRESSEL 2008). Oprócz problemów związanych ze skażeniem środowiska przez rycynę, konieczne są dodatkowe zabiegi technologiczne pozwalające na odpowiednie oczyszczenie surowca. Dlatego pożądanym jest uzyskanie takich odmian roślin, których nasiona pozbawione będą tych szkodliwych substancji (LESSIRE i współaut. 2009), a zbierane plony będą wyższe i tańsze. W tym celu transformacji poddano tytoń. Kwas rycynoleinowy powstaje z kwasu oleinowe-

go. Reakcję katalizuje jeden enzym, który przyłącza grupę hydroksylową w to samo miejsce łańcucha, w którym desaturaza  $\Delta 12$  tworzy podwójne wiązanie. W endospermie rozwijających się nasion rącznika zidentyfikowano cDNA o dużej homologii do desaturazy  $\Delta 12$  z innych gatunków roślin oleistych. Ekspresja cDNA z rącznika w tkankach tytoniu i *Arabidopsis* spowodowała akumulację kwasu rycynoleinowego w nasionach. Jednak poziom kwasu rycynoleinowego był niewielki (mniej niż 1% u tytoniu i 17% u *Arabidopsis*) pomimo tego, że ekspresja hydroksylazy  $\Delta 12$  zachodziła pod kontrolą specyficznego dla nasion promotora zapasowego białka napinowego. Koekspresja w *Arabidopsis* hydroksylazy i DGAT2 z rącznika zwiększyła zawartość kwasu rycynoleinowego do 30% (BURGAL i współaut. 2008, LESSIRE i współaut. 2009). Konieczne są dalsze badania dotyczące szlaku biosyntezy kwasu rycynoleinowego w rączniku, gdyż nie wiadomo dokładnie jaki jest mechanizm przepływu tego związku od miejsca jego syntezy (błona siateczki śródplazmatycznej) do TAG. Stwierdzono bowiem, że u rącznika pomimo bardzo wysokiej akumulacji kwasu rycynoleinowego w TAG, nie ma go prawie wcale w fosfolipidach błon. Natomiast u transgenicznej *Arabidopsis* badany kwas znajdowano w dużych ilościach właśnie w fosfolipidach (NAPIER 2007).

#### SOJA SYNTETYZUJĄCA SKONIUGOWANE KWASY TŁUSZCZOWE

Wspomniano już o CLA i jego prozdrowotnych właściwościach, ale kwasy skoniugowane mają też inne zastosowania niespożywcze. Przykładem może być kwas  $\alpha$ -eleostearynowy (18:3 $\Delta^{9cis,11trans,13trans}$ ),  $\alpha$ -parynowy (18:4 $\Delta^{9cis,11trans,13trans,15cis}$ ), kwas dimorfokoliny (9-hydroksy-18:2 $\Delta^{10trans,12trans}$ ) czy kwas kalendowy (18:3 $\Delta^{8trans,10trans,12cis}$ ). Kwasy te znajdują zastosowania jako desykanty w tuszach i farbach. Syntezę dwóch pierwszych uzyskano w transgenicznym zarodkach soi. Do transformacji użyto sekwencji FAD2 podobnych z *Morordica charantia* i *Impatiens balsamina*. Łącznie badane kwasy akumulowały się na poziomie 17% w zarodkach soi, co stanowiło jedną trzecią tego, co stwierdzono w gatunkach, z których izolowano geny. Badania nad biosyntezą tego rodzaju kwasów tłuszczowych w roślinach są jednak w powijakach. Na bieżącym etapie mają raczej charakter poznawczy. Poszukuje się dopiero odpowiednich genów kodujących istotne enzymy i ba-

dania te są często prowadzone na drożdżach (NAPIER 2007).

#### PRODUKCJA BIODIESLA

Obecnie biodiesel jest produkowany z oleju palmowego, sojowego i rzepakowego (DURRETT i współaut. 2008, GRESSEL 2008). Pozyskany z roślin surowiec musi być poddany procesowi deestryfikacji, w którym z TAG uwolnione zostają kwasy tłuszczowe. Biodiesel produkowany z oleju palmowego zawiera dużo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, głównie nienasyconych. W niskiej temperaturze taki biodiesel tężeje i zatyka przewody paliwowe w silnikach. Nie spełnia więc standardów paliwowych wielu krajów. Aby polepszyć parametry surowca do produkcji biodiesla musi on być poddany krakingowi (ang. cracking, pękanie). Jest to proces w którym długołańcuchowe kwasy tłuszczowe ulegają skróceniu, tracąc przy tym znaczne ilości energii. Za wydłużanie łańcuchów węglowych w procesie biosyntezy kwasów tłuszczowych odpowiada m. in. syntaza 3-ketoacylo-ACP I i II (KAS I i KAS

II). KAS I syntetyzuje 16-węglowe kwasy tłuszczowe, a KAS II wydłuża je do związków 18-węglowych (Ryc. 1) (BAUD i współaut. 2008, BAUD i LEPINIEC 2010, LI-BEISSON i współaut. 2010). Stosując techniki inżynierii genetycznej, poprzez wprowadzenie sekwencji antysensowej lub odpowiedniego RNAi do palmy kokosowej (gatunek trudny do transformacji) doprowadzono do wyciszenia genów kodujących KAS II. Dodatkowo udało się wprowadzić do rośliny desaturazy. W rezultacie taka transformacja znacznie polepszyła płynność oleju palmowego (GRESSEL 2008).

Doskonałym surowcem do produkcji biodiesla jest olej sojowy o wysokiej zawartości kwasu oleinowego i niskiej zawartości kwasów nasyconych. O transgenicznej soi wytwarzającej taki olej była już mowa wcześniej. Biodiesel produkowany z takiego oleju ma lepsze parametry płynności w niskich temperaturach i lepsze parametry emisji tlenków azotu w porównaniu do paliwa wyprodukowanego ze zwykłego oleju sojowego (DURRETT i współaut. 2008).

#### PODSUMOWANIE

Prace nad uzyskaniem nowych odmian genetycznie zmodyfikowanych roślin prowadzone są od wielu lat. Oprócz celów poznawczych w tego typu badaniach istotnym jest też aspekt użytkowy. Postęp w uzyskaniu nowych odmian cechujących się zmienionym metabolizmem tłuszczowym nie jest jednakowy. Zdecydowanie lepsze rezultaty obserwuje się w obszarze zmian metabolizmu tłuszczu związanych z cechami ilościowymi i jakościowymi poprawiającymi parametry olejów przeznaczonych do spożycia przez człowieka. Bardzo zaawansowane i obiecujące wydają się być prace związane z biosyntezą długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w roślinach nasiennych. Pomimo dość skomplikowanej biosyntezy tych związków u glonów morskich udało się już

uzyskać rośliny transgeniczne syntetyzujące te kwasy tłuszczowe na wysokim poziomie. Zupełnie inaczej wygląda produkcja w roślinach transgenicznych nietypowych kwasów tłuszczowych mających szerokie zastosowania przemysłowe. Odmiany rzepaku zawierające duże ilości kwasu erukowego są pozytywnym efektem wieloletnich zabiegów badaczy, ale w większości innych przypadków jest jeszcze wiele do poprawienia. Często konieczne są badania o charakterze poznawczym niż aplikacyjnym. Przykładem może tutaj być nasza niewiedza na temat przepływu wielu nietypowych kwasów tłuszczowych od miejsca ich biosyntezy tj. od błony siateczki śródplazmatycznej do miejsca ich akumulacji czyli do TAG.

#### ROŚLINY TRANSGENICZNE ŹRÓDŁEM WYSOKIEJ JAKOŚCI OLEJÓW

##### Streszczenie

Oleje roślinne są niezwykle istotnym, odnawialnym źródłem żywienia człowieka i paszy dla zwierząt oraz znajdują wielorakie zastosowania przemysłowe. Zwiększające się zapotrzebowanie ze strony przemysłu zarówno spożywczego jak i niespożyw-

czego na oleje roślinne i ich składniki wymusza poszukiwania nowych, efektywniejszych i ekonomiczniejszych źródeł ich pozyskiwania. Współcześnie nie wystarczy tylko zwiększenie areálu upraw roślin oleistych, ale konieczne są też inne przedsięwzięcia

prowadzące do uzyskania nowych odmian. Odmian zarówno akumulujących więcej oleju ale też odmian, które zdolne są do biosyntezy związków naturalnie w nich niewystępujących bądź występujących w śladowych ilościach. W tego typu badaniach sięga się po dobrze znane, powszechnie uprawiane rośliny użytkowe takie jak rzepak czy soja. Jednak w zdecydowanej większości, prace nad nowymi odmianami roślin transgenicznych zaczynają się od badań prowadzonych na roślinie modelowej, jaką jest *Arabidopsis thaliana*. W niniejszym opracowaniu przedstawiono szereg przykładów roślin modyfiko-

wanych genetycznie, w których uzyskano wzrost zawartości akumulowanego oleju, zmodyfikowano skład oleju pod kątem diety człowieka jak również wymuszono syntezę wielu związków wartościowych dla przemysłu. Przytoczono również liczne przykłady zastosowań przemysłowych dla olejów roślinnych i ich składników. Jednym z celów tego opracowania jest pokazanie wielokierunkowości badań mających doprowadzić do uzyskania nowych genetycznie modyfikowanych odmian cechujących się zmienionym metabolizmem tłuszczowym.

## TRANSGENIC PLANTS AS A SOURCE OF HIGH QUALITY OILS

### Summary

Vegetable oils represent a very important, renewable source of human food, animal feed and have multiple industrial applications. Increasing demand from both food and non-food industry for vegetable oils and their components forces the search for new, more efficient and more economical sources of their acquisition. Today, it is not enough just to increase the acreage of oil plants; there is a need for projects leading to the creation of new varieties. The new varieties should either accumulate more oil or can be capable of biosynthesis of compounds that naturally do not occur in their tissues or are present in trace amounts. In this kind of research well-known commonly used crops such as oilseed

rape and soybean are included. However, the vast majority of works on new varieties of transgenic plants start from research conducted on the model plant *Arabidopsis thaliana*. This paper presents several examples of genetically modified plants with increased oil level, modified oil composition regarding human diet, and with constrained synthesis of many compounds valuable to the industry. Numerous examples of industrial applications for vegetable oils and their components are presented. One of the aims of this paper is demonstration that plurality of research lead to new genetically modified varieties with modified lipid metabolism.

### LITERATURA

- BAUD S., DUBREUCQ B., MIQUEL M., ROCHAT C., LEPINIEC L., 2008. *Storage reserve accumulation in Arabidopsis: metabolic and developmental control of seed filling*. The Arabidopsis book 6. <http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0113>
- BAUD S., LEPINIEC L., 2010. *Physiological and developmental regulation of seed oil production*. *Progr. Lipid Res.* 49, 235–249.
- BURGAL J., SHOCKEY J., LU C., DYER J., LARSON T., GRAHAM I., BROWSE J., 2008. *Metabolic engineering of hydroxy fatty acid production in plants: RcDGAT2 drives dramatic increases in ricinoleate levels in seed oil*. *Plant Biotech. J.* 6, 819–831.
- CHEN R., MATSUI K., OGAWA M., OE M., OCHIAI M., KAWASHIMA H., SAKURADANI E., SHIMIZU S., ISHIMOTO M., HAYASHI M., MUROOKA Y., TANAKA Y., 2006. *Expression of  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$  desaturase and GLELO elongase genes from *Mortierella alpina* for production of arachidonic acid in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds*. *Plant Sci.* 170, 399–406.
- DAMUDE H. G., KINNEY A. J., 2008a. *Engineering oil-seeds to produce nutritional fatty acids*. *Physiol. Plant.* 132, 1–10.
- DAMUDE H. G., KINNEY A. J., 2008b. *Enhancing plant seed oils for human nutrition*. *Plant Physiol.* 147, 962–968.
- DIJKSTRA A. J., 2009. *Recent developments in edible oil processing*. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 11, 857–864.
- DURRETT T. P., BENNING C., OHLROGGE J., 2008. *Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels*. *Plant J.* 54, 593–607.
- DYER J., STYMNE S., GREEN A., CARLSON A., 2008. *High-value oils from plants*. *Plant J.* 54, 640–655.
- GRESSEL J., 2008. *Transgenics are imperative for bio-fuel crops*. *Plant Sci.* 174, 246–263.
- JAIN R., COFFEY M., LAI K., KUMAR A., MACKENZIE S. L., 2000. *Enhancement of seed oil content by expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase genes*. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 958–961.
- JAKO C., KUMAR A., WIE Y., ZOU J., BARTON D., GIBLIN M., COVELLO P., TAYLOR D., 2001. *Seed-specific over-expression of an Arabidopsis cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight*. *Plant Physiol.* 126, 861–874.
- KOHONO-MURASE J., IWABUCHI M., ENDO-KASAHARA S., SUGITA K., EBINUMA H., IMAMURA J., 2006. *Production of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid in rice*. *Transgenic Res.* 15, 95–100.
- LARDIZABAL K. D., METZ J. G., SAKAMOTO T., HUTTON W. C., POLLARD M. R., LASSNER M. W., 2000. *Purification of a jojoba embryo wax synthase, cloning of its cDNA, and production of high levels of wax in seeds of transgenic Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122, 645–655.
- LARDIZABAL K., EFFERTZ R., LEVERING C., MAI J., PEDROSO M., JURY T., AASEN E., GRUYS K., BENNETT K., 2008. *Expression of *Umbeopsis ramanniana* DGAT2A in seed increases oil in soybean*. *Plant Physiol.* 148, 89–96.
- LESSIRE R., CAHOON E., CHAPMAN K., DYER J., EASTMOND P., HEINZ E., 2009. *Highlights of recent progress in plant lipid research*. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 443–447.
- LI-BEISSON Y., SHORROSH B., BEISSON F., ANDERSSON M. X., ARONDEL V., BATES P. D., BAUD S., BIRD D., DEBONO A., DURRETT T. P., FRANKE R. B., GRAHAM I. A., KATAYAMA K., KELLY A. A., LARSON T.,

- MARKHAM J. E., MIQUEL M., MOLINA I., NISHIDA I., ROWLAND O., SAMUELS L., SCHMID K. M., WADA H., WELTI R., XU C., ZALLOT R., OHLROGGE J., 2010. *Acyl-lipid metabolism*. The Arabidopsis book, Am. 8. <http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0133>
- MALEPSZY S., ORLIKOWSKA T., ORCZYK W., MAJEWSKA-SAWKA A., 2009. *Rośliny genetycznie zmodyfikowane*. [W:] *Biotechnologia roślin*. MALEPSZY S. (red.). Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 455-544.
- METZGER J. O., 2009. *Fats and oils as a renewable feedstock for chemistry*. Eur. J. Lipid Sci. Tech. 111, 865-876.
- NAPIER J., 2007. *The production of unusual fatty acids in transgenic plants*. Annu. Rev. Plant Biol. 58, 295-319.
- RAO S., HILDEBRAND D., 2009. *Changes in oil content of transgenic soybeans expressing the yeast SLC1 gene*. Lipids 44, 945-951.
- SAYANOVA O., NAPIER J. A. 2011. *Transgenic oilseed crops as an alternative to fish oil*. Prostagland. Leucotrie. Essential Fatty Acids 85, 253-260.
- SCARTH R., TANG J. H., 2006. *Modification of Brassica oil using conventional and transgenic approaches*. Crop Sci. 46, 1225-1236.
- SHARMA N., ANDERSON M., KUMAR A., ZHANG Y., GIBLIN E. M., ABRAMS S. R., ZAHARIA L. I., TAYLOR D. C., FOBERT P. R., 2008. *Transgenic increases in seed oil content are associated with the differential expression of novel Brassica-specific transcripts*. BMC Genomics 9, 619.
- SOMERVILLE C., BROWSE J., JAWORSKI J.G., OHLROGGE J.B., 2000. *Lipids*. [W:] *Biochemistry & molecular biology of plants*. BUCHANAN B. B. (red.). Am. Soc. Plant Physiol., Rockville, Maryland, 456-714.
- STATHAM B., 2006. *E213. Tabele dodatków i składników chemicznych czyli co jesz i czym się smarujesz*. Wyd. RM, 86-87.
- STIEWE G., PLEINES S., COQUE M., GIELEN J., 2010. *Nowy układ mieszańcowy dla Brassica napus*. Europejski Biuletyn Patentowy 2010/46 EP 2002711 B1 (tłumaczenie: Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej PL/EP 2002711).
- TAYLOR D., ZHANG Y., KUMAR A., FRANCIS T., GIBLIN M., BARTON D., FERRIE J., LAROCHE A., SHAH S., ZHU W., SNYDER C., HALL L., RAKOW G., HARWOOD J., 2009. *Molecular modification of triacylglycerol accumulation by over-expression of DGAT1 to produce canola with increased seed oil content under field conditions*. Botany 87, 533-543.
- URSIN V. M., 2003. *Modification of plant lipids for human health: development of functional land-based omega-3 fatty acids*. J. Nutrition 133, 4271-4274.
- VIGEOLAS H., WALDECK P., ZANK T., GEIGENBERGER P., 2007. *Increasing seed oil content in oil-seed rape (Brassica napus L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter*. Plant Biotech. J. 5, 431-441.
- VRINTEN P., WU G., TRUKSA M., QIU X., 2007. *Production of polyunsaturated fatty acids in transgenic plants*. Biotech. Gen. Engin. Rev. 24, 263-280.
- WCISŁO T., ROGOWSKI W., 2006. *Rola wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 w organizmie człowieka*. Wyd. Via Medica, Cardiovascular Forum 11, 39-43.
- WESELAKE R. J., SHAH S., TANG M., QUANT P. A., SNYDER C. L., FURUKAWA-STOFFER T. L., ZHU W., TAYLOR D. C., ZOU J., KUMAR A., HALL L., LAROCHE A., RAKOW G., RANEY P., MOLONEY M. M., HARWOOD J. L., 2008. *Metabolic control analysis is helpful for informed genetic manipulation of oilseed rape (Brassica napus) to increase seed oil content*. J. Exp. Bot. 59, 3543-3549.
- ZHENG P., ALLEN W. B., ROESLER K., WILLIAMS M. E., ZHANG S., LI J., GLASSMAN K., RANCH J., NUBEL D., SOLAWETZ W., BHATRAMAKKI D., LLACA V., DESCHAMPS S., ZHONG G. Y., TARCZYNSKI M. C., SHEN B., 2008. *A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize*. Nature Gen. 40, 367-372.