

Gdańsk, 2026-06-08

## RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Saldat pt. „Biotechnological potential of diacylglycerol acyltransferases from *Nannochloropsis oceanica* for boosting lipid production in diverse hosts”. Podstawą przygotowania recenzji jest uchwała nr 13. podjęta przez Radę Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu w dniu 20.03.2026.

Rozprawa doktorska Pani Mart Saldat został wykonana w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK pod opieką dwóch promotorów: dr hab. Krzysztofa Zienkiewicza, prof. UMK oraz prof. Zhi-Yan (Rock) Du. Badania przedstawione w rozprawie były finansowane w ramach grantu NCN 2019/35/NZ9/01075 oraz grantów uczelnianych 4/2022/MD3, 4/2024/MD6 i 20/2023/Grants4NCUStudents.

Przedstawiona do oceny praca poświęcona jest wieloaspektowym badaniom funkcjonalności acylotransferaz diacyloglicerolu typu 2 (DGTT), kluczowej grupy enzymów uczestniczących w biosyntezie triacylgliceroli (TAG). Źródłem genów kodujących DGTT była mikroalga *Nannochloropsis oceanica* szczep CCMP1779. Mikroorganizm ten, ze względu na znaczną zawartość substancji oleistych, jest szeroko wykorzystywany w badaniach nad jego biotechnologicznym zastosowaniem.

Stosowanie na większą skalę mikroglonów jako źródło biopaliwa wciąż jest kwestią przyszłości. Jednak ze względu na duże tempo przyrostu biomasy, większą wydajność procesu fotosyntezy (wiązania CO<sub>2</sub>) niż wykazują rośliny lądowe, dużą zawartość substancji oleistych oraz brak lub niską zawartość lignin, organizm ten uznaje się za obiecujący surowiec do wytwarzania biopaliwa trzeciej i czwartej generacji. Z drugiej strony, mikroglony są cennym (pierwotnym) źródłem długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych DHA i EPA, kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka - na różnych etapach jego rozwoju i w zależności od stanu fizjologicznego. Stąd ich zastosowanie w wielu powszechnie dostępnych suplementach diety oraz modyfikowanym mleku i żywności dla dzieci. Motorem napędzającym produkcję oleju z alg jest w znacznym stopniu również rozwój akwakultur. Analizując dostępne źródła lipidów i kwasów tłuszczowych oraz biorąc pod uwagę wzrastające zapotrzebowanie na ten surowiec wielu autorów wskazuje na jego deficyt oraz konieczność opracowania alternatywnych metod pozyskiwania.

W kontekście powyższych uwag, podjęcie się badań nad rolą acylotransferaz diacyloglicerolu w biosyntezie TAG, nad znaczeniem poszczególnych izoform DGTT występujących u *Nannochloropsis oceanica* (NoDGTT)

oraz funkcjonalnością tych enzymów w różnych systemach biologicznych uważam za uzasadnione zarówno ze względu poznawczego jak i aplikacyjnego.

### Ocena merytoryczna

Praca została przygotowana w formie manuskryptu, w języku angielskim. Składa się z części typowych dla publikacji naukowej. Wstęp pracy, poprzedzony publikacją współautorstwa Doktorantki (*Here, there and everywhere – the importance on neutral lipids in plant growth and development*), w sposób szczegółowy i wyczerpujący przedstawia tło badań. Doktorantka opisała znaczenie funkcjonalnego zróżnicowania enzymów DGTT oraz czynniki regulujące ekspresję genów odpowiedzialnych za ich biosyntezę. W kontekście informacji zawartych we wstępie, przedstawione w końcowej jego części cele rozprawy są dobrze uzasadnione. Istotną podstawą do formułowania celów rozprawy była zapewne praca promotora, dr hab. Krzysztofa Zienkiewicza, prof. UMK opublikowana w 2017 roku. W pracy tej analizie poddano głównie geny *NoDGTT1 - NoDGTT 6* i kodowane przez nie enzymy. Natomiast zadaniem podjętym w rozprawie doktorskiej Pani mgr Saldat była głównie charakterystyka pozostałych 6 (z 12) genów *NoDGTT7 - NoDGTT 12* i odpowiadających im enzymów. Wyjątek stanowi część dotycząca analizy strukturalnej i funkcjonalności enzymów, w której uwzględniono wszystkie białka NoDGTT.

Część doświadczalna zaczyna się od szczegółowego opisu organizmów uwzględnionych w badaniach oraz uzasadnienia ich wyboru jako organizmów modelowych. Były to: mikroglon morski z rzędu *Eustigmatales*, *Nannochloropsis oceanica* szczep CCMP1779 pozyskany z kolekcji NCMA w USA, drożdże *Saccharomyces cerevisiae* szczep H1246 oraz rzodkiewnik pospolity *Arabidopsis thaliana*. Dobrym rozwiązaniem było przedstawienie szczegółów technicznych prowadzonych doświadczeń w postaci tabel (np. składy pożywek, warunki reakcji PCR, wektory, przeciwciała, zestawy odczynników, sprzęt, oprogramowanie), zamiast słownego opisu. W ten sposób dane te są łatwiejsze do weryfikacji/zapoznania się i porównania. Niezwykle przydatnym elementem części metodycznej jest również rysunek 2 przedstawiający schemat doświadczeń wykonanych w trakcie pracy nad rozprawą. Nie tylko obrazuje on co zostało wykonane, ale ułatwia zrozumienie koncepcji badań oraz znaczenia kolejnych etapów doświadczeń.

Mocną stroną rozprawy doktorskiej jest różnorodność stosowanych technik badawczych, które objęły m.in. analizę *in silico* genów kodujących DGTT w celu ustalenie sekwencji aminokwasów w tych białkach (ExpASy), określenie ich topologii oraz charakterystyki domen transbłonowych (Deep TMHMM1.0 i Protter). Uzyskane wyniki tych analiz pozwalające lepiej zrozumieć specyficzność substratową enzymów. Zastosowano również szereg innych technik biologii molekularnej, w tym najważniejsze to heterologiczna ekspresja genów (drożdże i rośliny) oraz nadekspresja genów *NoDGTT (N. oceanica)*, identyfikacja białek metoda immunoblottingu, analiza ciałek tłuszczowych z zastosowaniem konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej oraz określenie profili lipidowych z zastosowaniem chromatografu gazowego połączanego z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID). GC-FID jest w dalszym ciągu techniką stosowaną w analizie lipidów. Jednak nie dostarcza tak dokładnych informacji o ich strukturze i profilu jak LC-MS/MS. W przypadku potencjalnego zastosowania *N. oceanica* jako materiału do produkcji biopaliwa różnica ta nie jest tak

znacząca jak w przypadku wykorzystania lipidów *N. oceanica* jako substratów do produkcji nutraceutyków. Zatem to ograniczenie metodyczne można w przypadku pracy mgr Agaty Saldat uznać za mniej istotne.

Opanowanie tak szerokiego warsztatu i samodzielne wykonanie wszystkich doświadczeń (jak zadeklarowała Doktorantka) uważam za znaczące osiągnięcie. Jednocześnie, to integralne podejście do badań nad acylotransferazami diacyloglicerolu typu 2 zaprezentowane przez Doktorantkę pozwoliło na osiągnięcie założonych celów uzyskanie interesujących i wartościowych wyników. Mimo złożoności metod stosowanych w przygotowaniu rozprawy doktorskiej, opis uzyskanych wyników oraz ich interpretacja są przedstawione w sposób dobrze uporządkowany i ułatwiający wyłonienie (i docenienie) najważniejszych osiągnięć Doktorantki. Zaliczam do nich głównie:

1. Wykazanie metodami *in silico*, że dwanaście analizowanych NoDGTT występuje głównie w strukturze reticulum endoplazmatycznego, określenie różnic w topologii tych enzymów oraz powiązanie ich struktury z funkcją. Doktorantka podkreśliła, że funkcjonalność poszczególnych enzymów z grupy NoDGTT w danym organizmie związana jest zarówno z ich specyficznością substratową jak i z metabolizmem lipidów (=dostępnością substratów);
2. Wykazanie, że w odróżnieniu od genów kodujących NoDGTT1 – NoDGTT6, warunkach deficytu azotowego w podłożu, ekspresja genów *NoDGTT 7-12* nie ulega istotnym zmianom;
3. Wykazanie, że w wyniku ekspresji *NoDGTT12* w komórkach transgenicznym drożdży *S. cerevisiae* H1246 dochodzi do istotnie zwiększonej (**rekordowej**) akumulacji TAG (>30% TFA); głównie zawierających mononienasycone oraz nasycone kwasy tłuszczowe C16 i C18. Wynik ten wskazuje na istotne znaczenie enzymu NoDGTT12 w akumulacji TAG. Szczególne znaczenie NoDGTT12 w syntezie TAG potwierdzone zostało również metodą konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej, która umożliwiła zaobserwowanie licznych i powiększonych ciałek tłuszczowych;
4. Wykazanie, że NoDGTT12 charakteryzuje się aktywnością względem szerokiego zakresu acylokoenzymów A; przy czym aktywność ta jest największa w przypadku nienasyconych acylokoenzymów A, takich jak 18:3-CoA, 20:5-CoA, 18:2-CoA i 22:1-CoA;
5. Udokumentowanie, że w transgenicznym komórkach *N. oceanica* wykazujących ekspresję białka fuzyjnego NoDGTT12-CFP dochodzi do zmian w profilach lipidowych: wzrasta udział kwasów tłuszczowych nasyconych (C16) przy jednoczesnym spadku akumulacji kwasów tłuszczowych wielonienasyconych C20:5. Zmiana ta jest korzystna w przypadku potencjalnego zastosowania *N. oceanica* jako materiału do produkcji biopaliwa. Stanowi to również potwierdzenie, że acylotransferazy diacyloglicerolu nie tylko zmieniają ilość produkowanych TAG, ale wpływają też na ich profil;
6. Porównanie profili lipidowych *Arabidopsis thaliana* u typu dzikiego (WT), z zaburzoną ekspresją genu kodującego DGAT-1 oraz u *A. thaliana* z ekspresją genu *NoDGTT12*. Wykazano, że najwięcej lipidów akumuluje WT (w tym C18:1 i C20:1), choć niezależnie od typu, u *A. thaliana* stwierdzono głównie obecność nienasyconych kwasów tłuszczowych C18. Badania te wskazują również, że ekspresja genów kodujących DGTT może w pewnych warunkach kompensować zaburzenia w ekspresji genów *DGAT1*.

Tekst Dyskusji stanowi integralną część każdej pracy naukowej; jej poziom określa stopień dojrzałości naukowej autora. Dyskusja przedstawiona w rozprawie doktorskiej wskazuje na dużą dojrzałość naukową Doktorantki. Wykazała w niej umiejętność całościowego podejścia do badanego zagadnienia i jasnego przedstawienia swoich osiągnięć w kontekście wcześniej opublikowanych danych. Interpretacja wyników

jest wnikliwa a wyciągnięte wnioski poprawne i dobrze poparte uzyskanymi wynikami. W Dyskusji można znaleźć też elementy wskazujące na wizję dalszych badań, które wg Doktorantki powinny być m.in. ukierunkowane na połączenie ekspresji NoDGTT12 z co-ekspresją elongaz i desaturaz – ważnych enzymów w biosyntezie lipidów (EPA, DHA) o szerokim zastosowaniu jako nutraceutyki. Zasadniczym celem kolejnych etapów badań powinno być zwiększanie efektywności produkcji TAG o wymaganych właściwościach, przy jednoczesnym zachowaniu właściwego tempa wzrostu mikroglonów.

Pytanie które chciałabym w tym miejscu skierować do Doktorantki dotyczy fizjologicznych barier organizmu. Jak dalece jest (powinno być) możliwe zwiększenie akumulacji TAG w komórce, bez zaburzenia jej homeostazy. Drugie pytanie dotyczy perspektywy wdrożenia wyników badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej.

Prac napisana jest poprawnym, zaawansowanym językiem angielskim. Liczne i starannie wykonane grafiki znacznie wzmacniają wartość i czytelność pracy. Trudno doszukać się w niej jakichkolwiek uchybień. Do bardzo nielicznych, bez wpływu na ogólną wartość rozprawy należą: powtórzenie treści na stronach 12 i 13 (ogólnie we wstępie jest sporo powtórzeń); układ rozpuszczalników w analizie lipidów raz jest podany jako chloroform: metanol, raz jako metanol : chloroform; informacja o przeniesieniu 2 ml próbki za pomocą 1-ml pipety jest wg mnie zbędna; na stronie 57 E-coli powinno być napisane kursywą; na stronie 111: zastąpienie nazw rodzajowych jedną literą utrudnia rozpoznanie przynależności taksonomicznej mikroglonów; na rysunku 34 nie wyjaśniono znaczenia pasma 9; na str. 118 brak „it/the enzyme” (pierwszy wiersz drugiego akapitu); na str. 122 nie usunięto części poprawionego zdania (koniec pierwszego akapitu); na tylnej stronie okładki niektóre wyrazy są napisane błędną czcionką (m.in. dgtt, zamiast DGTT).

Konkludując: rozprawa doktorska Pani mgr Marty Saldat z pewnością zasługuje na opublikowanie w jednym z prestiżowych czasopism naukowych obejmujących tematykę biotechnologii glonów czy biotechnologii wytwarzania biopaliwa. Ambitne cele naukowe stawiane w rozprawie zostały w pełni zrealizowane. Wiele wątków poruszanych w pracy spina się w spójną całość o dużej wartości poznawczej i ważnym innowacyjnym charakterze. Sposób prowadzenia dyskusji wskazuje na dużą dojrzałość naukową.

Rozprawa doktorska mgr Marty Saldat w pełni spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 1–4 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Uwzględniając powyższe argumenty zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Marty Saldat do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę również wniosek o wyróżnienie pracy.

Z poważaniem



Hanna Mazur-Marzec

Recenzent

Prof. dr hab. Hanna Mazur-Marzec  
Katedra Biologii Morza i Biotechnologii  
Wydział Oceanografii i Geografii  
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 2026-06-08

Przewodniczący Rady Naukowej  
Nauki Biologiczne  
Dr hab. Dariusz J. Smoliński, prof.UMK  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Saldat  
pt. „Biotechnological potential of diacylglycerol acyltransferases from *Nannochloropsis oceanica* for  
boosting lipid production in diverse hosts”.

#### Uzasadnienie

Ze względu na pionierski charakter pracy, jej duży potencjał aplikacyjny oraz oryginalny wkład doktorantki w badania nad rolą enzymów NoDGTT w syntezie TAG składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Wyniki tej rozprawy stanowią wartościowy fundament dla dalszych badań nad możliwością (optymalnością) komercyjnego zastosowania lipidów *Nannochloropsis oceanica* jako biopaliwa.

