

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-16-0051**
Zlepšenie kvality oleja nepotravinárskych plodín

Zodpovedný riešiteľ **doc. RNDr. Alžbeta Blehová, CSc.**
Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave - Prírodovedecká fakulta**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Pracovisko žiadateľa: Univerzita Komenského v Bratislave – Prírodovedecká fakulta
Partnerské pracoviská: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave
Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum v Piešťanoch
VÚRUP, a.s. v Bratislave
Združenie Energy 21 v Leopoldove

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Žiadne

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Žiadne

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

- ADC - Vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch:
1. Al Ramadan, R., Karas, M., Ranušová, P., Moravčíková, J. 2021. Effect of silver on in vitro regeneration and antioxidant responses of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L.). *Journal of microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 10 (6) e4494. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.4494>
 2. Blehová, A., Murín, M., Nemeček, P., Gajdoš, P., Čertík, M., Kraic, J., Matušíková, I. 2021. Alterations in allocation and composition of lipid classes in *Euonymus* fruits and seeds. *Protoplasma*. 258(1):169-178 DOI: 10.1007/s00709-020-01562-5
 3. Mihálik, D., Lančarinová, A., Mrkvová, M., Kaňuková, Š., Moravčíková, J., Glasa, M., Predajňa, L., Hančinský, R., Grešíková, S., Havrlentová, M., Huptvogel, P., Kraic, J. 2020. Diacylglycerol Acetyltransferase Gene Isolated from *Euonymus europaeus* L. Altered Lipid Metabolism in Transgenic Plant towards the Production of Acetylated Triacylglycerols. *Life* 10(9) 205; <https://doi.org/10.3390/life10090205>
 4. Kaňuková, Š., Mrkvová, M., Mihálik, D., Kraic, J. 2020. Procedures for DNA Extraction from Opium Poppy (*Papaver somniferum* L.) and Poppy Seed-Containing Products. *Foods*; 9(10):1429. [online]. <https://doi.org/10.3390/foods9101429>
 5. Bujnovský R., Holíčková M., Ondrejčíková P. 2020. Spring *Camelina sativa* – Perspective cultivation as biofuel feedstock in Slovakia. *Industrial Crops and Products* 154: 112634 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112634>

6. Hozlár, P., Matušková, K., Ondrejčíková, P., Hájeková, E., Joríková, L. 2020. Comparison of different fertilization variants of *Camelina sativa* yield, plant height and oil content. *International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research*. 4(1): 78-88. <https://doi.org/10.29329/ijjaar.2020.238.9>

7. Martinčová, M., Kaštier, P., Krasylenko, Y.A., Gajdoš, P., Čertík, M., Matušková, I., Blehová, A. 2019. Species-specific differences in dodder seed architecture and chemical composition. *Flora-Morphology Distribution Functional Ecology of Plants* 256: 61-68 <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201900267795>

8. Boszorádová, E., Matušková, I., Libantová, J., Zimová, M., Moravčíková, J. 2019. Cre-mediated marker gene removal for production of biosafe commercial oilseed rape. *Acta Physiologie Plantarum* 41:73 <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2865-2>

9. Blehová, A., Škoríková, M., Šamajová, O., Kaštier, P., Matušková, I. 2018. Maize miniendosperm proliferation in vitro is characterized by tracheary element formation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 135:455-462

ADD - Vedecké práce v karentovaných časopisoch v SR:

1. Al Ramadan, R., Karas, M., Ranušová, P., Moravčíková, J. 2021. Effect of silver on in vitro regeneration and antioxidant responses of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L.). *Journal of microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 10 (6) e4494. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.4494>

ADN - Vedecké práce v nekarentovaných časopisoch v SR:

1. Šutá, D., Matušková, I., Blehová, A. 2019(b). Targeting transgene to seed resulted in high rate of morphological abnormalities of *Camelina* transformants. *Nova Biotechnologia et Chimica* 18(2): 94-101 DOI:10.2478/nbec-219-0012.

<https://content.sciendo.com/view/journals/nbec/18/2/article-p94.xml>

Vysokoškolské učebnice:

1. Mihálik, D. 2018. Laboratorné cvičenia z molekulárnej biológie a biotechnológií. ISBN 978-80-8105-940-7, vydavateľstvo UCM v Trnave, s. 124.

Odborné prednášky:

1. Blehová, A. 2018. Význam vybraných druhov rastlín pre rastlinné biotechnológie.

Pozvaná prednáška na Mendelovej univerzite v Brně, Ústav biológie rastlín, Agronomická fakulta.

Uplatnenie výsledkov projektu

V predkladanom projekte sme študovali lokalizáciu a úlohu olejov v bunkách semien rôznych druhov rastlín (jednoklíčnolistových, parazitických a oleje produkujúcich rastlinách napr. v semenách bršlena a ľaničníka). V prípade bršlena európskeho sme potvrdili, že biosyntéza olejov začína v skorých fázach vývinu semien a pokračuje až do štádia ich zrelosti, pričom ich distribúcia je pletivo špecifická. V bunkách arilusu (štruktúra typická pre čeľaď Celastraceae) sa bežne vyskytujú triacylglyceroly (TAG), v bunkách endospermu ale aj embrya sú okrem TAG deponované aj acetyl-diacylglyceroly (acDAG). Preto môžu byť semená bršlena donorom génu (*EeDAcT*) pre enzým acetyltransferázu, ktorý reguluje biosyntézu acDAG aj v transgénnych rastlinách ľaničníka siateho. Potvrdili sme, že ľaničník siaty je možné úspešne transformovať in planta technikou transformácie. Úprava zloženia oleja extrahovaného zo semien ľaničníka otvára nové možnosti jeho diverzifikácie smerom k akumulácii bioaktívnych zlúčenín (napr. terpénov), rôznych prídavných látok využívaných v potravinárskom, a chemickom priemysle. Napríklad zvýšenie obsahu kyseliny linolovej a linolénovej ale aj zníženie obsahu kardiotoxického kyseliny erukovej v oleji izolovanom z transgénnych semien ľaničníka, otvára možnosti jeho širšieho využitia v potravinárskom priemysle. Prítomnosť acDAG s vysokým obsahom polynenasýtených mastných kyselín determinuje, že geneticky modifikovaný olej ľaničníka môže byť výhodný pre aplikácie, kde je dôležitá jeho oxidačná stabilita. Na druhej strane nízka efektívnosť transformácie v prípade ľaničníka indikuje, že do budúcnosti budú potrebné ďalšie optimalizácie tak transformačných ako aj regeneračných protokolov.

Projekt tiež generoval údaje, o možnostiach modifikovať fyzikálno-chemické vlastnosti oleja izolovaného zo semien ľaničníka chemickými postupmi ako napr. parciálnou hydrogenáciou alebo transesterifikáciou, kedy sa odstraňujú jeho negatívne vlastnosti napríklad znižuje sa jódové číslo pod normovanú hodnotu tak, aby sa v maximálnej miere zachovali jeho ostatné pozitívne úžitkové vlastnosti. Potom takto modifikovaný olej, izolovaný zo semien ľaničníka, je vhodný na prípravu biologicky odbúrateľných mazív, emulgátorov, zmäkčovadiel a

biopalív druhej generácie s cieľom znižovať emisie skleníkových plynov.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Ľaničník siaty (*Camelina sativa* L.) patrí do čeľade Brassicaceae a má z agronomického a environmentálneho hľadiska niekoľko výhod v porovnaní s inými rastlinami patriacimi do tejto čeľade. Aj keď pôvodné slovenské odrody nie sú známe, rastliny ľaničníka priťahujú záujem agronómov a výrobcov biopalív druhej generácie. Jedným z cieľov projektu bolo vyvinúť ekonomicky efektívny spôsob pestovania rastlín ľaničníka a modifikácie jeho oleja. Ľaničníkový olej, keďže nekonkuruje olejom získavaným z potravinárskych plodín, predstavuje sľubný a lacný zdroj pre udržateľnú výrobu alternatívnych biopalív. Výsledná bionafta môže pomôcť znížiť emisie uhlíka, rozšíriť domáce zdroje energie a stimulovať hospodársky rozvoj vo vidieckych komunitách.

Tento projekt tiež sumarizuje výsledky v oblasti chemickej a biologickej transformácie olejov/tukov (napr. triacylglycerolov) izolovaných z nepotravinárskych plodín. Popísali sme dva typy chemickej transformácie ľaničníkového oleja: i) transesterifikáciu a ii) parciálnu hydrogenáciu dvojitých väzieb v metylesteroch polynenasýtených mastných kyselín, ktoré sú nevyhnutné na získanie produktov s vlastnosťami zodpovedajúcim palivám syntetizovaným z ropy. Molekulárne a in vitro metódy, v kontexte s kvalitatívnymi a kvantitatívnymi analýzami obsahu oleja v semenách ľaničníka, predstavujú základ pre i) generovanie procesov genetickej modifikácie plodín relevantných pre Slovensko a ii) úpravu biosyntézy a vlastností lipidov pre komerčné aplikácie. Na transformáciu sme použili dva jarné kultivary ľaničníka, konkrétne Zuzana a Smilowska. Kvety v rôznych štádiách kvitnutia sme ponárali do suspenznej kultúry baktérie (floral dip technika transformácie). Transgénný charakter rastlín sme identifikovali na základe expresie rfp génu. Fluorescencia markerového RFP proteínu potvrdila určité abnormality vo vývine embryí, napríklad vývin troch kľúčnych listov, tvorbu deformovaných, výrazne pretiahnutých kotyledonov, čo spolu s faktom, že CRUC promótor bol aktívny aj v pravých listoch, indikuje, že táto technika transformácie vyžaduje ďalšie optimalizačné postupy. Napriek tomu, ostáva genetická transformácia zaujímavým nástrojom na priamu moduláciu syntézy oleja v olejnatých plodinách.

Plody bršlena európskeho obsahujú semená s pomerne vysokým obsahom oleja, ktorý je zaujímavý pre chemický priemysel, pretože okrem TAG obsahuje aj acDAG. Analyzovali sme zloženie bršlenového oleja a rozšírili sme znalosti o jeho distribúcii v jednotlivých pletivách semena v priebehu jednotlivých fáz ich dozrievania. Ďalej sme študovali zloženie mastných kyselín vo vybraných lipidových triedach a diskutovali sme ich alokáciu v plodoch bršlena. Nukleotidovú sekvenciu EeDacT génu sme po modifikácii, naklonovali do bakteriálneho vektora a vložili do genómu hostiteľských rastlín ľaničníka. Rastliny ľaničníka po transformácii s génom EeDacT z *Euonymus europaeus* produkovali oleje s modifikovaným zložením mastných kyselín. GC-MS a GC-FID analýzy potvrdili zvýšený obsah niektorých esenciálnych polynenasýtených mastných kyselín v oleji izolovanom z transgénnych semien ľaničníka. V súlade s našimi predpokladmi expresia EeDacT transgénu vedie k produkcii oleja so zaujímavými fyzikálno-chemickými vlastnosťami (napr. znížený bod tuhnutia), vďaka čomu bude tento olej vhodný na prípravu biologicky odbúrateľných mazív, emulgátorov, zmäkčovadiel a na výrobu bionafty.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

Camelina sativa, a member of Brassicaceae family, is re-emerging low input oilseed energy crop with sustainable agronomic characteristics and environmental attractiveness. Although original Slovak varieties are not known, this plants attracts interest of agronomists and biofuel producers as potential feedstock for the production of bio-components to fuels. Therefore, one of the aim of this project was to examine and develop the most profitable and cost-effective way to produce *Camelina* oil. This oil represents a promising inexpensive source for sustainable, alternative biofuels production that does not compete with food crops. The resulting biodiesel can help to reduce carbon emissions, expand domestic energy sources and stimulate economic development in rural communities. This project also summarizes our results in the field of chemical and biological

transformation of oils / fats (i.e. triacylglycerols) isolated from non-food crops. We have described two types of chemical transformation: i) transesterification of Camelina oil and ii) partial hydrogenation of double bonds in methyl esters of polyunsaturated fatty acids, which are necessary to obtain products with properties corresponding to petroleum-synthesized fuels.

Molecular and in vitro methods in the context of qualitative and quantitative analyses of the oil content and composition in the crops of interest represent the basis for i) generating processes for the genetic modification of non-food crops relevant to Slovakia and ii) to modify lipid biosynthesis for commercial applications. Two cultivars of Camelina, namely Zuzana and Smilowska, were used for transformation at early flowering stage using the floral dip method. The flowers were inoculated with *Agrobacterium* bearing a construct for expression of red fluorescent protein (RFP) under the control of the seed specific cruciferin promoter from *Arabidopsis*. However, many of regenerants exerted developmental deformations such as lack of shoot apical meristem, deformed or absent cotyledons. Furthermore, the activity of the CRUC promoter was still active also in true leaves rendering this promoter as inappropriate for seed targeting of the transgene. Nevertheless, genetic transformation remains a tool for direct modulation of pathways for oil synthesis in oilseed crops.

The fruit capsules of *Euonymus* tree contain seeds with remarkably high content of oil interesting for industry, especially the 3-acetyl-1,2-diacyl-sn-glycerols (acDAG) synthesized by a specific acetyl-CoA diacylglycerol acetyltransferase. We analysed the *Euonymus* oil composition, extending the available knowledge on their distribution in individual tissue structures during different stages of maturation. Further, we studied the FA composition in the selected lipid classes and discussed their allocation in fruits of different maturity. Nucleotide sequence of EeDAcT gene was modified, cloned into bacterial vector, and introduced into host Camelina plants. The increased content of some essential polyunsaturated fatty acids was confirmed by GC-MS and GC-FID analyzes in oil isolated from transgenic Camelina seeds. Expression of the EeDAcT transgene, resulted in production of the oil with interesting physicochemical properties (e.g. reduced freezing point), which makes this Camelina oil suitable for the preparation of biodegradable lubricants, emulsifiers, plasticizers, and for biodiesel production.