



Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-17-0262**

Re-dizajn metabolizmu tukotvorných mikroorganizmov pre biotechnologickú prípravu priemyselne atraktívnych olejov

Zodpovedný riešiteľ **prof. Ing. Milan Čertík, PhD.**

Príjemca **Slovenská technická univerzita v Bratislave - Fakulta chemickej a potravinárskej technológie**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislava

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Micalis Institute, INRA, Paris, Francúzsko
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague, Česká republika
Department of Bioengineering and Imperial College Centre for Synthetic Biology, Faculty of Engineering, Imperial College, London, Veľká Británia

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

V rámci projektu neboli udelené/podané patenty.

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

Najvýznamnejšie publikácie:

Gajdoš, Peter, Hambalko, Jaroslav, Nicaud, Jean-Marc, Čertík, Milan: Overexpression of *Euonymus europaeus* diacylglycerol acetyltransferase in *Yarrowia lipolytica* leads to production of single cell oil enriched with 3-acetyl-1,2-diacylglycerols. *Yeast*, 37(1), 2020, 141-147 (IF = 3.239, Q1) (DOI: 10.1002/yea.3442)

Peter Gajdoš, Jaroslav Hambalko, Ondrej Slaný, Milan Čertík: Conversion of waste materials into very long chain fatty acids by recombinant *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Letters*, 367(6), 2020, fnaa042 (<https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa042>)

Daniel Mihálik, Andrea Lančaričová, Michaela Mrkvová, Šarlota Kaňuková, Jana Moravčíková, Miroslav Glasa, Zdeno Šubr, Lukáš Predajňa, Richard Hančinský, Simona Grešíková, Michaela Havrlentová, Pavol Hauptvogel, Ján Kraic: Diacylglycerol Acetyltransferase Gene Isolated from *Euonymus europaeus* L. Altered Lipid Metabolism in Transgenic Plant towards the Production of Acetylated Triacylglycerols. *Life*, 10(9), 2020, 1-16 (DOI: 10.3390/life10090205.)

Jaroslav Hambalko, Peter Gajdoš, Jean-Marc Nicaud, Rodrigo Ledesma-Amaro, Michal Tupec, Iva Pichová, Milan Čertík: Production of long chain fatty alcohols found in bumblebee pheromones by *Yarrowia lipolytica*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(1),

2021, article No. 593419 (IF = 5.890, Q1) (DOI: 10.3389/fbioe.2020.593419, Manuscript ID: 593419)

Peter Gajdoš, Veronika Urbaníková, Mária Vicenová, Milan Čertík: Enhancing very long chain fatty acid production in *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories*, 21, 2022, article No 138 (IF = 6.352, Q1) – *Biotechnology & Applied Microbiology* (<https://doi.org/10.1186/s12934-022-01866-6>)

Daniel Mihálik, Richard Hančinský, Šarlota Kaňuková, Michaela Mrkvová, Ján Kraic: Elicitation of Hyoscyamine Production in *Datura stramonium* L. Plants Using Tobamoviruses. *Plants*, 11, 2022, article No. 3319 (IF = 4.658, Q1) – *Plant Sciences* (<https://doi.org/10.3390/plants11233319>)

Jaroslav Hambalko, Peter Gajdoš, Jean-Marc Nicaud, Rodrigo Ledesma-Amaro, Michal Tupec, Iva Pichová, Milan Čertík: Biosynthesis of fatty acid derivatives by recombinant *Yarrowia lipolytica* containing MsexD2 and MsexD3 desaturase genes from *Manduca sexta*. *Journal of Fungi*, 9(1), 2023, article No. 114 (IF = 5.724, Q1) - *Mycology* (<https://doi.org/10.3390/jof9010114>)

Najvýznamnejšie konferenčné prednášky:

Milan Čertík, Miroslav Taranda, Peter Gajdoš: Biosynthesis of erucic acid by recombinant *Yarrowia lipolytica*. (Invited Lecture). *Proceedings of the 14th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, (Edited by Ching Tsang Hou, Jei-Fu Shaw, Ahmad Parveez Ghulam Kadir), Kuala Lumpur, Malaysia, October 22-24, 2019, p. 49 (ISBN 978-983-9191-46-2)

Čertík, M., Hambalko, J., Gajdoš, P.: Production of oil enriched with erucic acid by *Yarrowia lipolytica*. *Proceedings of the 14th Yeast Lipid Conference*, (Edited by Dolinar M., Petrovič, U.), Ljubljana, Slovenia, May 22-24, 2019, 48 (ISBN 978-961-264-153-5)

Milan Čertík, Peter Gajdoš, Jaroslav Hambalko: Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for production of tailor-made lipid compounds. *Proceedings Book of the 35th International Specialized Symposium on Yeasts* (Edited by Erten, H., Cam, I.B., Eroglu, E., Agirman, B., Gunduz, C.P.B., Cabaroglu, T., Erginkaya, Z.), Antalya, Turkey, October 21-25, 2019, 65

Jaroslav Hambalko, Peter Gajdoš, Milan Čertík: Study of the influence of native metabolic pathways of storage lipid biosynthesis of *Yarrowia lipolytica* on the heterologous production of 3-acetyl-1,2-diacylglycerols. *Abstract Book from the Yeast Lipid Conference*, Gothenburg, Sweden, June 01-03, 2022, 64

Peter Gajdoš, Veronika Urbaníková, Mária Vicenová, Milan Čertík: Engineering *Yarrowia lipolytica* for C22 fatty acid production. *Abstract Book from the 1st Polish Yeast Conference*, Rzeszow, Poland, June 22-24, 2022, 132

Milan Čertík, Peter Gajdoš, Jaroslav Hambalko, Veronika Urbaníková: Genetically engineered *Yarrowia lipolytica* as a useful tool for production of lipophilic compounds. *Proceedings of Abstracts of the 36th International Specialized Symposium on Yeasts*, Vancouver, Canada, July 12-15, 2022, 43

Milan Čertík, Peter Gajdos, Jaroslav Hambalko, Veronika Urbanikova: Recombinant *Yarrowia lipolytica* as a producer of useful lipids. (Invited Lecture) *Abstracts from the European Biotechnology Congress*, Prague, Czech Republic, October 05-07, 2022

Milan Čertík, Peter Gajdoš, Jaroslav Hambalko, Veronika Urbaníková: Production of attractive lipophilic compounds by recombinant *Yarrowia lipolytica*. (Invited Lecture). *Book of Abstracts of the 16th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Taichung, Taiwan, Nov. 09-11, 2022, p. 14

Uplatnenie výsledkov projektu

Konstruktívna rekombinantných kvasiniek inzeriou rastlinných génov s ich regulovanou expresiou v kombinácii s cieľovým re-dizajnom metabolizmu lipidov priniesla nové možnosti produkcie atraktívnych lipofilných metabolitov ako sú dlhoreťazcove mastné kyseliny (najmä kyselina eruková) a acetylované diacylglyceroly. Navyše boli pripravené aj transformanty repky olejnej a tabaku virgínskeho produkujúce acetylované diacylglyceroly. Projekt tak ponúka nielen nové typy modelov pre štúdium mikrobiálnej lipidomiky, ale aj vhodnú biotechnologickú platformu mikrobiálnej priemyselnej produkcie týchto typov lipidov. Projekt jedinečne prepája mikrobiálne biotechnológie a agrobiotechnológie so zameraním na genomiku a lipidomiku s cieľom obmedziť používanie významných olejín pre nepotravinárske aplikácie pomocou biotechnologických procesov. Získané výsledky tak môžu osloviť predovšetkým rôzne biotechnologické, potravinárske, veterinárne, energetické

a agrochemické spoločnosti zamerané na aplikáciu olejov s požadovaným zložením. Výsledky a fungovanie projektu sa v neposlednej miere premietajú aj do edukačného procesu, čo v konečnom dôsledku vplyva na rozvoj poznania a vedomostný rast mladej generácie. Biotechnológia je atraktívny odbor a keďže dopyt po mikrobiálnych biologicky aktívnych látkach neustále rastie, je možné očakávať zvyšujúci sa záujem verejnosti a komerčnej sféry o štúdie vyplývajúce z riešeného projektu.

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

Projekt bol zameraný najmä na konštrukciu rekombinantných kvasiniek *Yarrowia lipolytica* s rastlinnými génmi (FAE1 gén z peniažteka roľného kódujúci elongázu mastných kyselín a EeDAcT gén z bršlena európskeho katalyzujúceho zavedenie acetylu do sn-3 polohy diacylglycerolu) kódujúcich expresiu enzýmov pre tvorbu kyseliny erukovej (EA) a acetylovaných diacylglycerolov (AcDAG). Projekt vyústil nielen do prípravy mnohých rekombinantov produkujúcich EA a AcDAG, ale aj do štúdií substrátových špecifícit rôznych acyltransferáz a ich vplyv na reguláciu exprese génov, do testovania vplyvu sily promótoru a viacerých kópii génov a v neposlednom rade aj do aplikačných experimentov zameraných na využitie lacných odpadových uhlíkových substrátov pre produkciu EA a AcDAG. Je zaujímavé, že použitie silného promótoru viedla až k 7-násobnému navýšeniu množstiev elongačných produktov kyseliny olejovej a rekombinantný kmeň s FAE1 génom rastúci na odpadovom kuchynskom oleji efektívne transformoval extracelulárne mastné kyseliny až do takmer 900 mg EA/l média (6-násobne viac ako na kontrolnom substráte glukóze). Podobne kultivácia rekombinanta s EeDAcT génom na glycerole a odpadovom oleji vyústila do biosyntézy mikrobiálneho oleja s obsahom takmer 25% AcDAG. Tieto štúdie potvrdzujú, že rekombinantná *Y. lipolytica* má dôležité aplikácie pri biokonverzii odpadových materiálov na produkciu žiadaných lipidových metabolitov, čo je dôležité pri cielenej nadprodukcii EA a AcDAG pomocou fyziologickej regulácie biotechnologického procesu. Navyše, EeDAcT gén bol úspešne transformovaný aj do repky olejnej a tabaku virgínskeho, kde takto pripravené transgéne rastliny produkovali AcDAG. Projekt vyústil do 8 CC publikácii a 20 konferenčných príspevkov (z toho 3 pozvané prednášky).

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

The project was focused on construction of recombinant yeast *Yarrowia lipolytica* with introduced plant genes (FAE1 gene from *Thlaspi arvense* coding fatty acid elongase and EeDAcT gene from *Euonymus europaeus* catalyzing introduction of acetyl to sn-3 position in diacylglycerol) coding enzymes necessary for production of erucic acid (EA) and acetyl-diacylglycerol (AcDAG). The project resulted not only in preparation of number recombinants producing EA and AcDAG but also in the study of substrate specificities of various acyltransferases and their effect on regulation of gene expression, in testing of promoters and several gene copies and finally in application experiments focusing on employing cheap carbon sources for production of EA and AcDAG. It is interesting that strong promoter 7-times increased the amount of elongation products of oleic acid and recombinant strain growing on waste cooking oil transformed extracellular fatty acids to 900 mg EA/L of media (6-times more than growth on a glucose as control substrate). Similarly, cultivation of recombinant strain on a glycerol and waste cooking oil led to biosynthesis of microbial oil containing up to 25% AcDAG. These studies confirmed that recombinant *Y. lipolytica* is an important „player“ for bioconversion of waste materials for production of desired metabolites. It is important for overproduction of EA and AcDAG by physiological regulation of biotechnological processes. In addition, EeDAcT gene was successfully transformed into rapeseed and tobacco where these transgene plants formed AcDAG. The project resulted in 8 CC papers and in 20 conference contributions (3 invited lectures).