



EvoSCO

Strategii de evoluție adaptativă în laborator pentru ameliorarea acumulării de lipide în microorganisme oleaginoase și producția de uleiuri de origine microbiană folosind deșeuri agroindustriale

Broșură pentru proiectul PNRR nr. 760238/28.12.2023, cod PNRR/2023/C9/MCID/I8 CF 162/31.07.2023



Despre proiect

Yarrowia lipolytica este o drojdie oleaginoasă model și o sursă de lipide intracelulare neutre. În prezent, la scară industrială, se obțin doar acizi grași polinesaturați de origine microbiană folosind tulpini modificate genetic de *Y. lipolytica*, iar costul lor de producție rămâne ridicat din cauza ratelor de acumulare scăzute. Scopul acestui proiect este de a dezvolta strategii de Evoluție Adaptativă în Laborator (EAL) pentru generarea de tulpini oleaginoase hiperproductive. Metodologia a fost dezvoltată și aplicată inițial pe tulpini de *Y. lipolytica* și apoi extinsă la alte microorganisme oleaginoase de interes industrial, cu contribuții semnificative la elucidarea mecanismelor moleculare evolutive asociate cu lipogeneza.

Uleiuri microbiene

Microorganismele eucariote oleaginoase, precum și anumite specii bacteriene, se află în primul planul cercetării biotehnologice datorită capacității lor de a acumula lipide (ex., triacilgliceroli - TAG) sub formă de uleiuri microbiene (uleiuri unicelulare - SCO), cu aplicații industriale majore, în special ca materie primă în producția de biodiesel. În prezent, în ciuda utilizării reziduurilor agroindustriale ca substraturi cu cost redus, productivitatea limitată a microorganismelor oleaginoase duce la costuri de producție ridicate.

Obiective principale

Yarrowia lipolytica, *Rhodosporidium toruloides* și *Cunninghamella echinulata* sunt supuse evoluției adaptive în laborator, în condiții specifice, în vederea obținerii unor clone naturale cu caracter oleaginos îmbunătățit. Clonele cu potențial lipogenic crescut sunt selectate pe mediu solid lipsit de carbon și caracterizate biochimic, genotipic și transcriptomic, cu adnotarea genelor exprimate diferențial prin intermediul Gene Ontology. Tulpinile optimizate sunt evaluate la scară de bioreactor, utilizând reziduuri agroindustriale ca sursă de carbon.

Despre Noi



Director de proiect

Profesorul **George Aggelis** este unul dintre pionierii domeniului lipidelor microbiene, începând activitatea sa în domeniu acum 35 de ani, în Franța, în timpul tezei de doctorat.

Până în prezent, a publicat două cărți, patru capitole de carte, 15 lucrări de sinteză, 131 de lucrări de cercetare și un brevet și participând totodată numeroase conferințe și întâlniri naționale și internaționale, beneficiind de recunoaștere internațională semnificativă.

A participat la 32 de proiecte de cercetare și este membru activ al consiliului editorial a patru reviste.

Din decembrie 2005, prof. Aggelis lucrează la **Universitatea din Patras, Departamentul de Biologie**, rămânând în domeniul lipidelor microbiene.



Ana-Maria Lecu, Ana-Maria Tănase, George Aggelis, Irina Lascu, Viorica Corbu, Ana-Maria Georgescu

Echipa EvoSCO

Echipa proiectului este una puternic interdisciplinară și diversă, cuprinzând atât cercetători cu experiență, care au colaborat cu succes în proiecte de cercetare anterioare, cât și tineri cercetători promițători, anume doctoranzi, de la:

- Departamentul de Genetică, Facultatea de Biologie, Universitatea din București, România – *Csutak Ortansa, Tănase Ana Maria, Corbu Viorica, Ionela Avram, Ionescu Robertina, Gulea Chiciudean Iulia, Lascu Irina, Lecu Ana-Maria, Georgescu Ana-Maria, Vasile Camelia*;
- Departamentul de Botanică și Microbiologie, Facultatea de Biologie, Universitatea din București, România – *Holban Alina, Barbu Ildă, Gheorghe Barbu Irina*;
- Institutul de Cercetare al Universității din București (ICUB), România – *George Aggelis, Grumezescu Alexandru, Vasile Otilia, Niculescu Adelina, Florea Eusebiu Cristian*;
- Departamentul de Biologie, Universitatea din Patras, Grecia – *George Aggelis*.

ICUB dispune de infrastructura necesară în cadrul Platformei de Cercetare în Biologie și Ecologie Sistemică, adecvată pentru realizarea experimentelor EAL și a analizelor aferente. Proiectul beneficiază, de asemenea, de echipamente de laborator moderne, achiziționate prin fondurile proiectului, pentru a asigura desfășurarea tuturor activităților legate de EAL în intervalul de timp propus.

Evoluția adaptivă în laborator (EAL) și microorganismele oleaginoase

Ce este EAL?

EAL este o abordare experimentală care valorifică selecția naturală în condiții de laborator controlate, pentru a obține microorganisme cu fenotipuri îmbunătățite sau dorite.

Prin aplicarea unor presiuni selective bine definite pe parcursul mai multor generații, EAL determină acumularea de mutații benefice, rezultând tulpini cu o adaptabilitate îmbunătățită, fără a necesita modificări genetice prealabile.

Cum aplicăm EAL?

EAL se aplică prin expunerea unei tulpini parentale la condiții alternante de limitare a azotului și a carbonului, care favorizează acumularea de lipide și proliferarea celulelor cu conținut lipidic ridicat. Prin cultivări batch succesive, variantele adaptate cu fenotip oleaginos îmbunătățit ajung să domine populația, în detrimentul tulpinii parentale. Populațiile evolute și clonele izolate sunt evaluate și caracterizate, permițând selecția unor noi tulpini (clone) capabile să producă de până la două ori mai multe lipide.



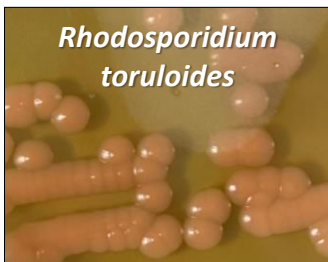
Yarrowia lipolytica

Drojdie model oleaginoasă, acumulează lipide până la 40-50 % din CDW;

Capabilă să metabolizeze o gamă largă de carbohidrați și reziduuri agroindustriale;

Tolerează stres osmotic moderat și variații de pH, fiind robustă pentru procesele industriale;

Ușor de manipulat genetic: dispune de instrumente bine stabilite pentru ingineria metabolică.



Rhodosporidium toruloides

Drojdie roșie oleaginoasă, acumulează lipide până la 70 % din CDW;

Produce o varietate de compuși (ex., carotenoizi);

Capabilă să metabolizeze o gamă largă de carbohidrați și reziduuri agroindustriale;

Foarte adaptabilă la diferite condiții de creștere și tolerantă la compuși inhibitori sau toxici (ex., furfural).



Cunninghamella echinulata

Fung filamentos oleaginos, acumulează lipide până la 30-40 % din CDW;

Produce uleiuri microbiene (SCO) bogate în acizi grași polinesaturați (ex., acid gamma-linolenic);

Capabil să metabolizeze o gamă largă de carbohidrați și reziduuri agroindustriale;

Formează micelii sferice, facilitând procesarea ulterioară în bioreactoare.

Organizare

Pachete de lucru

Acest proiect este împărțit în **5 pachete de lucru** principale, organizate conform progresiei logice a proiectului, începând cu generarea de clone cu fenotip oleaginos îmbunătățit prin EAL pe glucoză, urmată de cultivarea acestora în sisteme de bioreactoare, folosind reziduuri agroindustriale ca sursă unică de carbon, pentru caracterizări multi-omice cuprinzătoare și evaluarea completă a potențialului lor biotehnologic la scară industrială, și încheindu-se cu diseminarea acestor rezultate.

PACHETE DE LUCRU

EAL pt. *Yarrowia lipolytica*

WP1

- Experiment EAL
- Caracterizare clone
- Analiză genomică
- Corelații de date pentru identificarea genelor cheie

EAL pt. *Rhodospiridium toruloides*

WP2

- Experiment EAL
- Caracterizare clone
- Analiză genomică
- Corelații de date pentru identificarea genelor cheie

EAL pt. *Cunninghamella echinulata*

WP3

- Experiment EAL
- Caracterizare clone
- Analiză genomică
- Corelații de date pentru identificarea genelor cheie

Cultivări cu reziduuri agro-industriale

WP4

- Cultivări batch în flacon
- Cultivări în bioreactor
- Caracterizare detaliată
- Analiza productivității

Management și diseminare

WP5

- Management de proiect
- Diseminare și informare
- Networking și contact cu industria

Pagină web

A fost creată o pagină web care conține informații generale despre proiect, actualizări privind stadiul, evenimente, fotografii și altele (<https://evosco.unibuc.ro/>).

Întâlniri

Echipa EvoSCO organizează întâlniri periodice cu directorul de proiect, atât față în față, cât și online, pentru o organizare eficientă, precum și pentru a analiza și discuta rezultatele obținute pe parcurs.



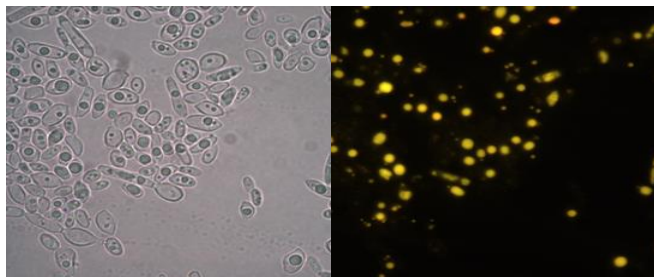
Întâlnire în București, februarie 2025



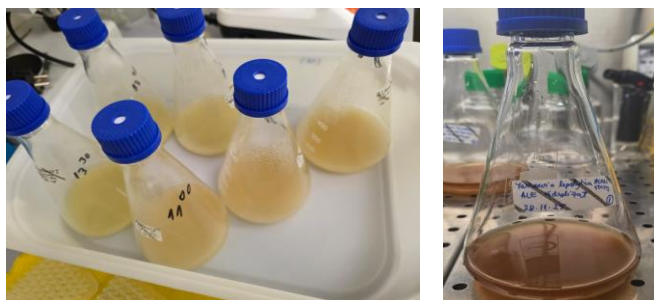
Întâlnire în București, aprilie 2024

Rezultate

Yarrowia lipolytica



Imagini de microscopie cu fluorescență, care arată acumularea de lipide (picături lipidice) vizualizate prin colorarea cu Nile Red



Cultivări în flacoane de 500 ml pe glucoză (stânga) și reziduuri agroindustriale (ex., hidrolizat lignocelulozic de bumbac) (dreapta)



Cultivări discontinue de *Yarrowia lipolytica* în bioreactor de 4L

Picături lipidice mai mari

În timpul EAL, s-a efectuat colorarea cu Nile Red pe celule proaspete și viabile după fiecare rundă de evoluție. Pe măsură ce runde succesive au progresat, s-a observat o creștere a dimensiunii picăturilor lipidice din celulele de drojdie, fapt confirmat ulterior și cantitativ.

Temp redus de cultivare pe reziduuri agroindustriale

După mai multe cultivări EAL pe glucoză, au fost selectate două clone cu randament lipidic ridicat pentru experimente ulterioare pe reziduuri agroindustriale. Pe glucoză, clonele au produs de două ori mai multe lipide decât tulpina parentală (~37 % vs ~15 %). Pe reziduuri agroindustriale, clonele au necesitat un timp mai scurt de cultivare, iar producția de lipide a rămas dublă comparativ cu tulpina parentală (~31 % vs ~15 %), făcând procesul mai rentabil.

Culturi batch în bioreactor

Y. lipolytica a fost cultivată într-un bioreactor de 4L timp de 5-7 zile. Cultivările inițiale au fost realizate pe glucoză, iar ulterior s-a selectat o clonă cu randament lipidic ridicat pentru cultivare pe reziduuri agroindustriale. Deși producția de lipide a rămas comparabilă între cele două substraturi, s-au observat diferențe în acumularea de biomasă.

Rezultate

Picături lipidice mai mari

În timpul EAL, s-a efectuat colorarea cu Nile Red pe celule proaspete și viabile după fiecare rundă de evoluție. Pe măsură ce runde succesive au progresat, s-a observat o creștere a dimensiunii picăturilor lipidice din celulele de drojdie, fapt confirmat ulterior și cantitativ.

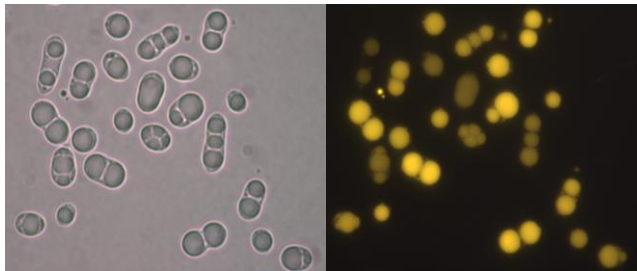
Randament lipidic semnificativ crescut la clonele *R. toruloides*

După mai multe cultivări EAL pe glucoză, au fost obținute clone cu randament lipidic ridicat. Aceste clone evolute au prezentat o creștere de aproximativ 1,6 ori a randamentului lipidic comparativ cu tulpina parentală (~55 % vs ~35 %), indicând o îmbunătățire clară a acumulării de lipide, ca rezultat al presiunii evolutive aplicate.

Menținerea productivității pe reziduuri agroindustriale

Când au fost testate pe reziduuri agroindustriale, mai exact pe un hidrolizat lignocelulozic derivat din bumbac provenit din deșuri textile, clonele selectate și-au păstrat capacitatea crescută de producție de lipide. În ciuda prezenței compușilor inhibitori (ex., furfural), randamentele lipidice au rămas de aproape 1,6 ori mai mari decât cele ale tulpinii parentale (~40 % vs ~25 %), fără modificarea timpului de cultivare, rezultând o productivitate crescută în același interval de timp și o eficiență economică îmbunătățită.

Rhodosporidium toruloides



Imagini de microscopie cu fluorescență, care arată acumularea de lipide (picături lipidice) vizualizate prin colorarea cu Nile Red



Cultivare în flacon de 500 ml a clonei selectate (stânga) și etape de extracție și procesare a lipidelor: extracția Folch cu reflux (mijloc) și concentrarea probei de lipide prin evaporare rotativă (dreapta)



Bucăți de țesătură de bumbac tratate cu acid în timpul hidrolizei (stânga), hidrolizat lignocelulozic obținut (mijloc) și cultivări în flacoane de 500 mL ale tulpinii parentale și celor evolute, incubate în condiții obișnuite (dreapta)

Rezultate

Cunninghamella echinulata



Extract lipidic obținut din cultură (stânga) și procesul de extracție a lipidelor prin metoda Folch cu reflux (dreapta)

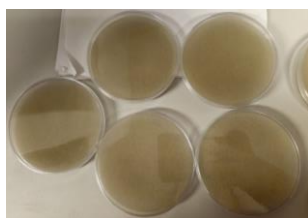


Cultivări în flacoane de 250 mL pe medii lichide folosind surse de carbon diferite

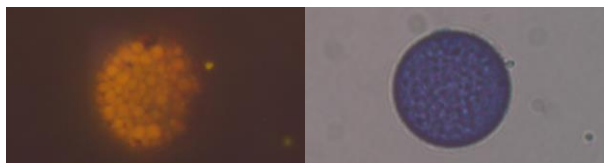
C. echinulata cultivat pe diverse medii solide



Imagini microscopice ale sporilor și miceliului



Protocol EAL pe medii solide cu raport C/N ridicat



Imagini de microscopie cu fluorescență, care arată acumularea de lipide (picături lipidice) în spori, vizualizate prin colorarea cu Nile Red

Randament lipidic ridicat pe multiple surse de carbon

C. echinulata a prezentat răspunsuri diferențiate atunci când a fost cultivată pe sucroză, xiloză, melasă și glucoză. Sucroza a condus la cea mai mare acumulare de lipide, atingând 40,72%, în timp ce xiloza și glucoza au susținut producția la 30,11% și, respectiv, 33,26%. Melasa, însă, a determinat cel mai scăzut conținut de lipide (8,16%).

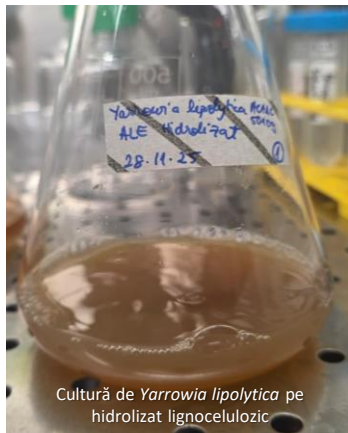
Protocol EAL modificat pentru evoluția *C. echinulata*

Pentru a adapta strategia EAL la creșterea filamentoză și formarea de miceli sferice a *C. echinulata* în medii lichide, s-a utilizat un mediu de cultură solid pentru a promova acumularea de lipide, vizând selecția sporilor rezistenți. Această abordare modificată se bazează pe ipoteza că miceliul fungic care stochează cantități mari de ulei va produce spori bogăți în ulei, care, atunci când sunt transferați pe medii fără carbon, permit doar supraviețuirea celor mai rezistente tulpini, crescând progresiv producția de lipide prin runde succesive de selecție.

Localizarea picăturilor lipidice în spori

Colorarea cu Nile Red a sporilor prelevați din mediile de cultură EAL a evidențiat prezența picăturilor lipidice în interiorul sporilor, subliniind rolul esențial al acestora în susținerea creșterii în condiții de limitare a carbonului.

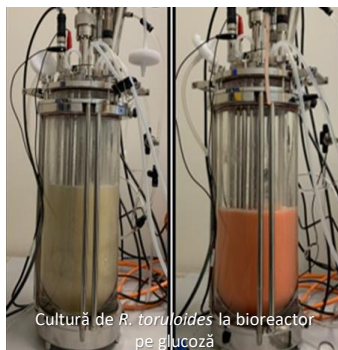
Colaj foto



Cultură de *Yarrowia lipolytica* pe hidrolizat lignocelulozic

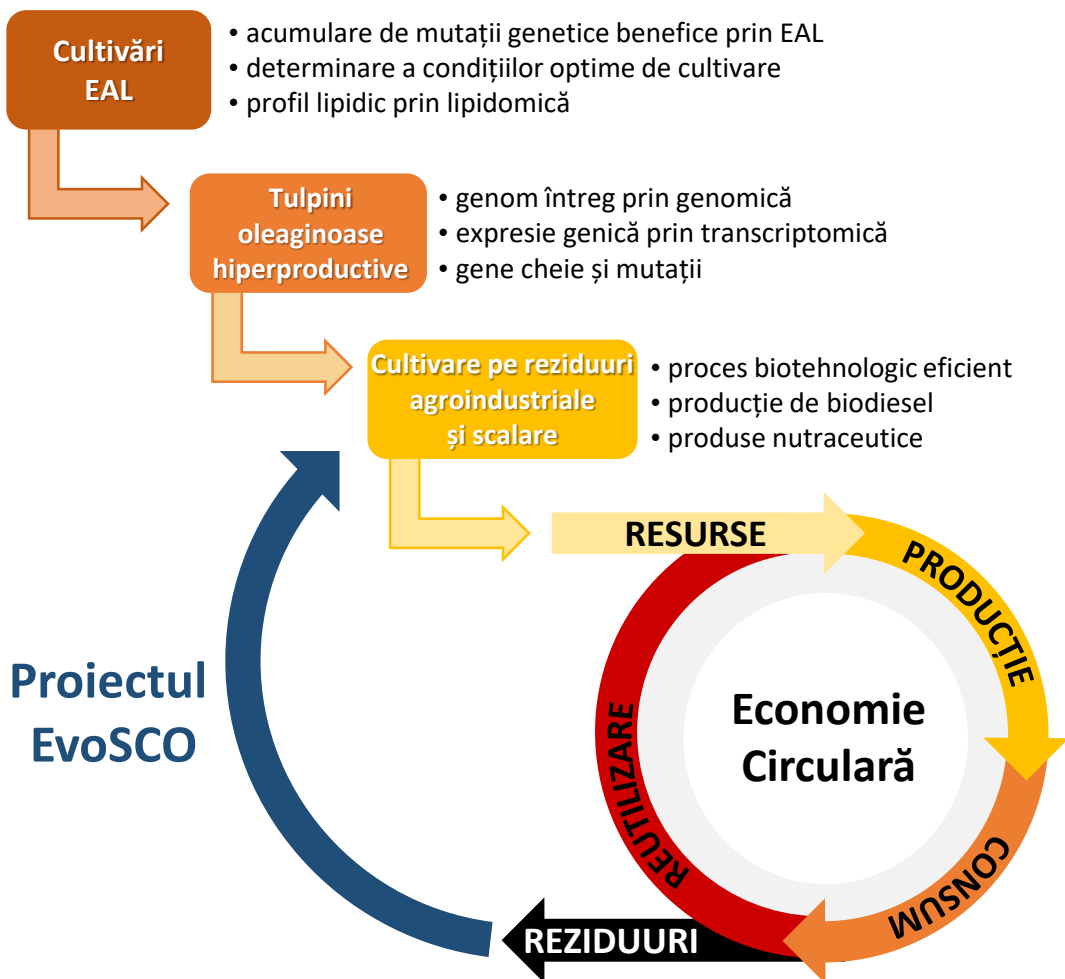


Recuperarea biomasei de *Y. lipolytica* prin raclare după uscare la 80 °C



Puncte de discutat

Beneficii pentru industrie, societate și economie



Titlul proiectului: „Strategii de evoluție adaptativă în laborator pentru ameliorarea acumulării de lipide în microorganisme oleaginoase și producția de uleiuri de origine microbiană folosind deșeuri agroindustriale” – EvoSCO

Editorul materialului: Echipa EvoSCO

Data publicării: Decembrie 2025

Date de contact: <https://unibuc.ro/>

Material distribuit gratuit.

„Conținutul acestui material nu reprezintă în mod obligatoriu poziția oficială a Uniunii Europene sau a Guvernului României”

„PNRR. Finanțat de Uniunea Europeană – Următoarea Generație UE”

Site web - <https://mfe.gov.ro/pnrr/> Facebook - <https://www.facebook.com/PNRROficial/>