

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA CELLULARE E DELLO SVILUPPO

Proposta di assegnazione di una borsa di Dottorato ad una linea di ricerca

Titolo della ricerca: Ingegnerizzazione di microalghe per la produzione di carburanti e prodotti ad alto valore aggiunto a partire da biomasse lignocellulosiche.

Docente guida proposto: Dott. Simone Ferrari

DESCRIZIONE DELLA RICERCA

Questa ricerca ha lo scopo di sviluppare ceppi ingegnerizzati di microalghe ottimizzati per la crescita mixotrofica su zuccheri derivati da biomasse vegetali di origine diversa. Un importante fattore che attualmente limita l'utilizzo di questi organismi per la produzione su scala industriale di carburanti e *chemicals* è la necessità di garantire, in condizioni di crescita autotrofa, un'efficiente raccolta della luce da parte di tutte le cellule, richiedendo pertanto ampie superfici di coltivazioni e costosi sistemi di illuminazione artificiale e di rimescolamento. In questo progetto proponiamo invece l'utilizzo di colture in condizioni di mixotrofia, fornendo carbonio dall'esterno, riducendo così notevolmente i costi di produzione. In particolare, ci si propone di alimentare le alghe con zuccheri derivati da prodotti di scarto dell'agricoltura (biomasse vegetali) e dell'industria alimentare e casearia, permettendone la valorizzazione e risolvendo così il problema del loro smaltimento.

Uno dei fattori limitanti nell'uso di biomasse agricole diverse per la crescita di microalghe è la loro limitata capacità di utilizzare zuccheri diversi derivati dalla parete cellulare vegetale, in particolare pentosi ed acidi uronici, e da scarti dell'industria casearia (lattosio e zuccheri derivati). In questo progetto verrà utilizzato un approccio di ingegneria per ottenere nuovi ceppi algali in grado di crescere efficientemente su zuccheri C5 e C6 e disaccaridi). Verrà anche sviluppato un sistema efficiente di estrazione dalla matrice algale di olio e composti chimici ad alto valore aggiunto (ad es. carotenoidi) utilizzando nuovi sistemi enzimatici. Verranno inoltre sviluppati metodi di trasformazione genetica di specie algali (*Chlorella* spp.) di elevato interesse industriale ma recalcitranti alla trasformazione stessa.

In particolare, il progetto prevede le seguenti attività:

1) Ingegnerizzazione di *Chlamydomonas reinhardtii* per l'utilizzo di acidi uronici.

Recenti avanzamenti nell'ingegneria metabolica hanno dimostrato la possibilità di conferire la capacità di utilizzare pentosi e acidi uronici a microrganismi normalmente incapaci di utilizzarli. In particolare, è stato recentemente dimostrato ottenuto un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* in grado di convertire l'acido D-galatturonico (D-GalUA) in priuvato e glicerolo, tramite la co-espressione di una D-galatturonato reductasi (GAR1) e di una L-galattonato deidratasi (LGD1) di *Trichoderma reesei* e di una 2-keto-3-deossi-L-galattonato aldolasi di *Aspergillus niger* (GAAC). Gli stessi geni, insieme ad una permeasi ad alto flusso specifica per D-GalUA di *Neurospora crassa*, verranno introdotti in *C. reinhardtii* tramite trasformazione nucleare (in collaborazione con l'Università di Verona) e i ceppi ottenuti verranno analizzati per la loro capacità di crescere in condizioni mixotrofiche od eterotrofiche su terreno minimo contenente D-GalUA o idrolizzati di pectina come uniche fonti di carbonio.

2) Ingenerizzazione di *Chlamydomonas reinhardtii* per l'utilizzo di xilosio.

Lo xilosio (Xyl) è il principale pentosio rappresentato nella frazione emicellulosica delle pareti cellulari vegetali. Verranno innanzitutto ricercati nel genoma di *C. reinhardtii* geni con omologia di sequenza con trasportatori dello xilosio, e questi verranno eventualmente espressi in sistemi eterologhi e testati per la loro attività verso diversi pentosi anche in presenza di glucosio. In caso non fosse possibile identificare trasportatori endogeni, un trasportatore ad alta affinità di lievito verrà introdotto nell'alga tramite trasformazione nucleare (Farwick et al. 2014). Studi precedenti hanno dimostrato la possibilità di ingegnerizzare l'uso di questo zucchero come substrato per la fermentazione in lieviti tramite l'espressione di una Xyl isomerasi (XI) o di una Xyl reductasi e di una xilitolo deidrogenasi (XR/XDH) (Hua et al. 2019). Ceppi algali transgenici per entrambi i pathways (eventualmente esprimenti anche il trasportatore dello Xyl) verranno ottenuti e caratterizzati per la loro capacità di crescita su xilosio (da solo o in presenza di glucosio) e su idrolizzati di biomasse lignocellulosiche.

3) Sviluppo di sistemi di degradazione della parete cellulare di *Chlorella* spp.

Sebbene *C. reinhardtii* sia un sistema modello ben caratterizzato nel campo della biologia delle alghe, tale specie non è adatta alla produzione di lipidi su scala industriale, sia per il basso contenuto di olio sia per la scarsa robustezza. *Chlorella* spp. è invece uno dei ceppi più promettenti per la produzione su larga scala di olio per la conversione in carburanti. D'altra parte, al momento l'efficienza di trasformazione genetica di *Chlorella* è molto bassa, ed inoltre l'estrazione di lipidi dalla biomassa algale risulta estremamente difficoltosa. Entrambi questi caratteri negativi sembrano dipendere almeno in parte dalla estrema resistenza della parete cellulare di *Chlorella*, che la rende recalcitrante sia all'introduzione di DNA esogeno che all'estrazione di composti di interesse. Recentemente, è stato osservato che la parete cellulare di *Chlorella prototrichoides* (He et al. 2016). È caratterizzata da uno strato esterno di sporopollenina, un polimero alifatico molto presente anche nel tegumento esterno (esina) del granulo pollinico delle piante. La rimozione di tale strato dalla parete algale tramite trattamento con 2-aminoetanolo aumenterebbe in modo significativo l'estrazione di olio da quest'alga (He et al. 2016). Tale trattamento verrà pertanto qui utilizzato per cercare di ottenere protoplasti di *Chlorella vulgaris* da trasformare tramite elettroporazione, permettendo di evitare l'utilizzo del microbombardamento. Inoltre, verrà valutata la possibilità di utilizzare sistemi enzimatici basati su perossidasi per rimuovere lo strato di sporopollenina (come avviene nel caso della germinazione del polline; Edlund et al. 2017) e di altri enzimi derivati da funghi ligninolitici, da soli o in combinazione con cocktail enzimatici già utilizzati in letteratura per degradare gli altri componenti della parete cellulare di *Chlorella* e facilitare sia la trasformazione genetica che l'estrazione dell'olio da questa specie.

Letteratura citata

Edlund AF, Olsen K, Mendoza C, Wang J, Buckley T, Nguyen M, Callahan B, Owen HA. (2017) "Pollen wall degradation in the Brassicaceae permits cell emergence after pollination" *Am J Bot.* 104(8):1266-1273.

Farwick A, Bruder S, Schadeweg V, Oreb M, Boles E. (2014) "Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 111(14):5159-64.

He X, Dai J, Wu Q. (2016) "Identification of Sporopollenin as the Outer Layer of Cell Wall in Microalga *Chlorella protothecoides*." *Front Microbiol.* 7:1047.

Hua Y, Wang J, Zhu Y, Zhang B, Kong X, Li W, Wang D, Hong J. (2019) "Release of glucose repression on xylose utilization in *Kluyveromyces marxianus* to enhance glucose-xylose co-utilization and xylitol production from corncob hydrolysate." *Microb Cell Fact.* 18(1):24

Protzko RJ, Latimer LN, Martinho Z, de Reus E, Seibert T, Benz JP, Dueber JE. (2018) "Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for co-utilization of D-galacturonic acid and D-glucose from citrus peel waste." *Nat Commun.* 9(1):5059.

Lavori pubblicati negli ultimi 5 anni dal Docente Guida e riguardanti l'argomento di studio (2013-2018)

1. Raggi S, Ferrarini A, Delledonne M, Dunand C, Ranocha P, De Lorenzo G, Cervone F, **Ferrari S** (2015) "The Arabidopsis Class III Peroxidase AtPRX71 Negatively Regulates Growth under Physiological Conditions and in Response to Cell Wall Damage". *Plant Physiol* 169(4):2513-25.
2. Tomassetti S, Pontiggia D, Verrascina I, Reza IB, Francocci F, Salvi S, Cervone F, **Ferrari S** (2014) "Controlled expression of pectic enzymes in *Arabidopsis thaliana* enhances biomass conversion without adverse effects on growth" *Phytochemistry* 112:221-30.
3. Cook C, Francocci F, Cervone F, Bellincampi D, Bolwell PG, **Ferrari S**, Devoto A (2014) "Combination of pretreatment with white rot fungi and modification of primary and secondary cell walls improves saccharification" *BioEnergy Research* 8:175-186
4. Francocci F, Bastianelli E, Lionetti V, **Ferrari S**, De Lorenzo G, Bellincampi D, Cervone F (2013) "Analysis of pectin mutants and natural accessions of *Arabidopsis* highlights the impact of de-methyl-esterified homogalacturonan on tissue saccharification" *Biotechnology for Biofuels* 6:163.

Fondi disponibili negli ultimi 3 anni.

- Progetto MIUR "ORIGAMI: "Bioraffineria integrata per la produzione di biodiesel da microalghe" (scadenza ottobre 2021).
- Progetto triennale ERA-CAPS second call 2014: "SIPIS: Decoding ligand-receptor specificities of LysM-proteins in plant immunity and symbiosis" (scadenza maggio 2019)
- Progetto ENAC "Carburanti alternativi per l'aviazione civile" (prima fase terminata ad aprile 2019; seconda fase presumibilmente a partire dal 2020).
- Progetto di Ateneo "Ricerche Universitarie 2015". "Role of an *Arabidopsis thaliana* LysM protein in the innate immunity" (Sapienza Università di Roma)

Collaborazioni con laboratori nazionali e internazionali e permanenza in essi di possibili candidati:

- Alessandra Devoto, Royal Holloway University of London (UK)
- Yumiko Sakuragi, Università di Copenhagen (Danimarca)
- Matthieu Joosten, Università di Wageningen (Paesi Bassi)
- Roberto Bassi, Università di Verona
- Maria Benedetta Mattei, Università dell'Aquila