

Metodologia di sistema di ingegneria genetica a base di diatomee per la produzione ecosostenibile di ovotolioli



Sommario

L'invenzione riguarda il campo delle biotecnologie e, in particolare, lo sviluppo di un protocollo ecosostenibile che, attraverso il sistema di ingegneria genetica della diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, consente di stimolare la produzione di 5-tioistidine metilate - e in particolare di ovotoliolo B, uno dei più potenti antiossidanti naturali - che stanno ricevendo una crescente attenzione per le loro proprietà chimiche, biologiche e farmacologiche. Il protocollo è ecosostenibile perché utilizza cellule e nutrienti per la biosintesi e non produce composti collaterali tossici. L'uso di colture di *P. tricornutum* consente un'elevata produttività e una facile scalabilità dei processi a monte e a valle.

Stato della tecnica

I protocolli di sintesi chimica degli ovotolioli descritti finora sono complessi, comportano molti passaggi e sono troppo costosi per una conveniente produzione commerciale di queste molecole, mentre il precursore degli ovotolioli, la 5-tioistidina desmetilata, può essere preparato con una sintesi chimica più facilmente realizzabile. D'altra parte, l'ovotoliolo A, 5(N π)-metil tioistidina, può essere purificato dalle uova di riccio di mare, che rappresentano una delle fonti più ricche di questi metaboliti. Tuttavia, i ricci di mare non sono una fonte ecosostenibile per questi composti e non possono fornire quantità sufficienti di ovotolioli per ampi studi in vitro e in vivo, anche in considerazione della necessità di preservare le risorse marine. Tra le microalghe, le diatomee possono essere una fonte naturale alternativa per la biosintesi degli ovotolioli. Tuttavia, ad oggi, non sono stati descritti protocolli per la produzione sostenibile di questi composti in questi organismi.

Descrizione dell'invenzione

La presente invenzione riguarda la produzione di una diatomea ingegnerizzata in grado di biosintetizzare una maggiore quantità di ovotoliolo B (Fig. 1), che rispetto all'ovotoliolo A presenta un gruppo metile aggiuntivo sulla catena laterale della 5-tioistidina. *P. tricornutum* è stato trasformato attraverso due metodi alternativi: il tradizionale approccio biolistico e la coniugazione batterica recentemente sviluppata, che consentono entrambi di introdurre nella cellula un costrutto contenente una cassetta di sovraespressione che guida l'espressione dell'enzima ovotoliolo-biosintetico, la solfossido sintasi OvoA fusa con la Proteina Fluorescente Gialla sotto la guida di un forte promotore endogeno. Entrambe le procedure hanno avuto successo e hanno prodotto cellule con un forte segnale fluorescente nel mitocondrio (Fig. 2). Il metabolita è stato estratto dai ceppi modificati e identificato come Ovotoliolo B con un aumento della resa da 2 a 4,5 volte rispetto al ceppo di tipo selvatico. La figura n. 3 mostra la pipeline della procedura a partire dalla creazione del clone sovraesprimente fino alla produzione dell'ovotoliolo B.

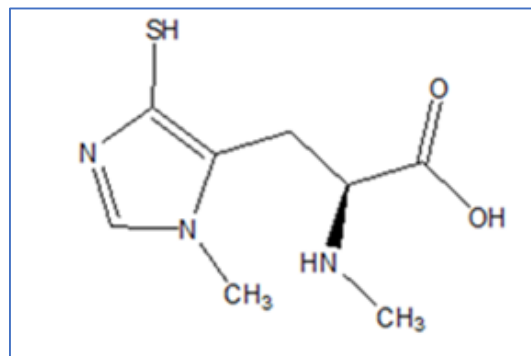


Fig. 1 – Ovotoliolo B

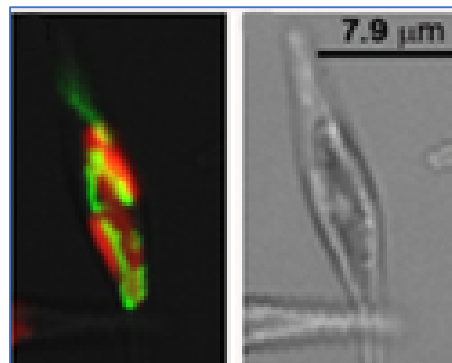


Fig. 2 – Segnale fluorescente nel mitocondrio - il segnale verde indica il PtOvoA-YFP, il segnale rosso indica l'autofluorescenza della clorofilla

Proprietà Industriale

Domanda di brevetto italiana n. IT 102021000026639 depositata il 18/10/2021

Applicant

Stazione Zoologica Anton Dohrn

INVENTORI

- Immacolata Castellano
- Maria Immacolata Ferrante
- Anna Palumbo
- Monia Teresa Russo

TTO (Technology Transfer Office):

- Papaluca Ornella

Metodologia di sistema di ingegneria genetica a base di diatomee per la produzione ecosostenibile di ovotoli



Vantaggi

I vantaggi di questo brevetto sono i seguenti:

- *P. tricornutum* con un genoma completamente sequenziato e una serie di strumenti per l'ingegneria genetica, è facilmente coltivabile e consente di ottenere elevate rese di biomassa.
- Il protocollo sviluppato è ecosostenibile grazie all'uso di cellule fotosintetiche per la biosintesi dell'ovotolo e non produce composti collaterali tossici.
- La biomassa microalgale, inoltre, può essere sfruttata per ulteriori usi dopo l'estrazione dell'ovotolo, rendendo il processo di produzione più conveniente.

Applicazioni

Il brevetto, consentendo la produzione ecosostenibile di molecole di ovotolo, trova applicazione nelle seguenti aree:

- In campo farmaceutico, l'ovotolo può essere utilizzato per preparare formulazioni farmaceutiche volte a prevenire e migliorare gli stati infiammatori associati a patologie come il diabete, le malattie cardiovascolari e le disfunzioni epatiche.
- Nei settori della Nutraceutica e della Cosmeceutica in relazione alla produzione di formulazioni per la nutrizione e la cosmesi.

Stadio di sviluppo

TRL Attuale: 4

Sviluppo di un protocollo per la purificazione dell'ovotolo B per testare le attività biologiche e miglioramento del sistema genetico ingegnerizzato per produrre altri derivati dell'ovotolo modificando la disponibilità di substrati e le condizioni di crescita.

TRL Prospettico: 5

La tecnologia sarà convalidata nell'industria attraverso l'uso di bioreattori per ottenere un'elevata massa di diatomee e di metaboliti finali.

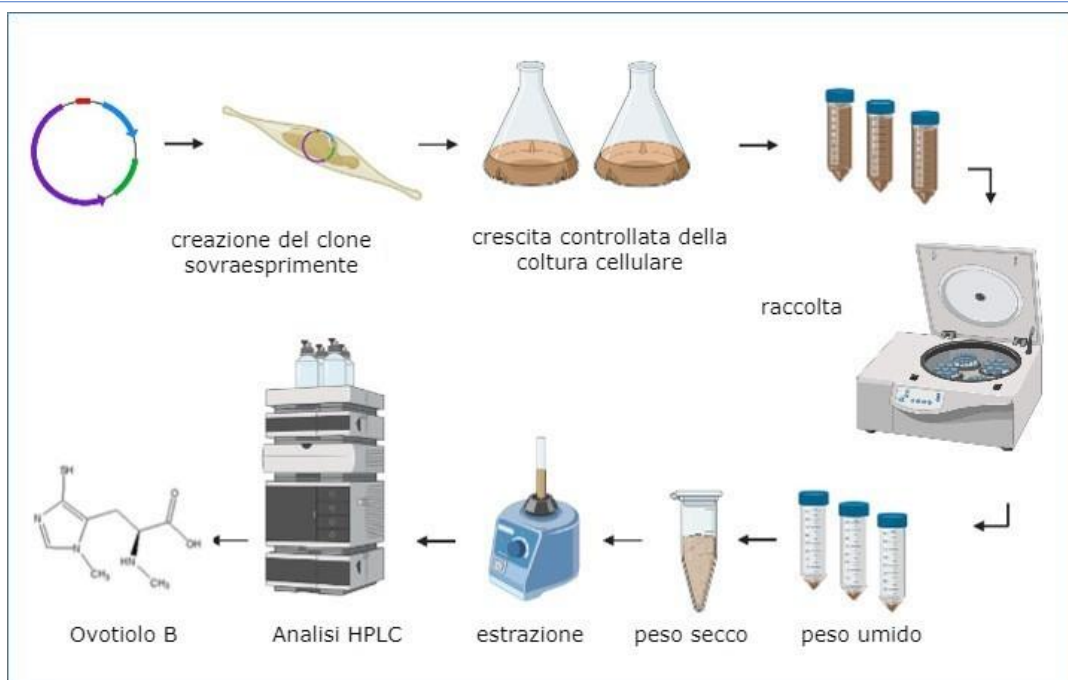


Figura 3 – Pipeline della procedura a partire dalla creazione del clone sovraesprimente fino alla produzione di ovotolo B