

"MICROALGHE TRANSGENICHE PER LA PRODUZIONE DI ENZIMI  
DEGRADATIVI DELLA PARETE CELLULARE VEGETALE AVENTI  
ATTIVITA' CELLULOSOLITICA TERMOSTABILE "

-----

5 La presente invenzione riguarda microalghe transgeniche per la produzione di enzimi degradativi della parete cellulare vegetale aventi attività cellulosolitica termostabile (HCWDE) e relativi usi nella biodegradazione di fonti di cellulosa o lignocellulosa in campo industriale.

La lignocellulosa è la fonte di carbonio organico più abbondante sulla terra e  
10 rappresenta una riserva di carboidrati con un alto potenziale di impiego nella produzione di biocarburanti. Purtroppo, la sua natura estremamente recalcitrante alla conversione in zuccheri semplici ne limita enormemente il suo sfruttamento in tale ambito (Sanderson K., 2011; Saini J.K. et al. 2015).

Metodi che includono trattamenti fisici, fisico-chimici, chimici e biologici sono  
15 comunemente impiegati per ridurre la recalcitranza all'idrolisi e favorirne la saccarificazione (Harmsen P.F.H. et al. 2010; Badiei M. et al. 2014; Kumar A.K. e Sharma S., 2017).

Tuttavia, i trattamenti chimici risultano dannosi per l'ambiente e sono in  
20 contrapposizione con l'idea di utilizzare la lignocellulosa per produrre una forma di energia ecosostenibile; inoltre, questi trattamenti generano dei derivati di reazione che inibiscono il metabolismo microbico inficiando la conversione dei zuccheri semplici in prodotti con valore bioenergetico quali etanolo, lipidi e metano (Jönsson L.J. e Martín C., 2016).

Al contrario, sebbene i metodi fisici siano relativamente non inquinanti, la loro  
25 applicazione su larga scala risulta costosa (Kumar A.K. e Sharma S., 2017).

I trattamenti biologici prevedono l'utilizzo di enzimi degradativi della parete  
vegetale (CWDE) di natura microbica che, il più delle volte, sono ottenuti  
coltivando muffe e batteri mesofili con attività lignocellulosolitiche (Sánchez C.,  
2009 ). In linea generale, questi microrganismi secernono un'ampia gamma di  
30 CWDE ma in esigue quantità, essendo richiesti per il loro stretto fabbisogno.

Ad oggi, la reale sfida biotecnologica consiste nella selezione di ceppi capaci di esprimere grandi quantità di CWDE, da poter poi sfruttare nella degradazione della lignocellulosa.

I ceppi più promettenti dovrebbero essere contraddistinti dalle seguenti  
5 caratteristiche:

- (i) capacità di esprimere l'enzima selezionato
- (ii) alta produttività (intesa come quantità di enzima prodotto nell'unità di tempo) e
- (iii) basso costo di produzione.

10 Di certo, un organismo che è caratterizzato da questi tratti fenotipici è un valido candidato per la produzione in larga scala dei CWDE.

Da questo punto di vista, le microalghe possono rivelarsi delle promettenti biofabbriche essendo caratterizzate da un'alta velocità di crescita e costi di produzione molto contenuti (Brasil B. et al., 2017).

15 Esistono comunque delle limitazioni nell'utilizzo delle microalghe come biofabbriche di proteine ricombinanti; primo tra tutti, la bassa conoscenza della microalga come sistema di espressione eterologa. Ad esempio, l'espressione nucleare di transgeni codificanti CWDE batterici e fungini è stata già tentata nella alga modello *Chlamydomonas reinhardtii*; la resa di espressione è risultata sotto  
20 le aspettative (Rasala B.A. et al. 2012) nonostante l'esistenza di un sistema cellulosolitico endogeno ne facesse presupporre il contrario (Blifernez-Klassen et al., 2012).

Tra i vari fattori che influenzano negativamente l'espressione dei transgeni nelle microalghe, il silenziamento genico gioca un ruolo predominante (Schroda M.,  
25 2006).

Con lo scopo di aggirare questo problema, gli autori della presente invenzione hanno provato ad esprimere per la prima volta un set di CWDE con attività termostabile (HCWDE) nel cloroplasto della microalga. Il successo di tale approccio era difficilmente prevedibile perché nel cloroplasto si localizza gran  
30 parte del metabolismo dei glucidi e quindi l'espressione delle cellulasi poteva teoricamente interferire con tale metabolismo.

Essendo di origine batterica, gli HCWDE (per abbreviazione HC) non richiedono modifiche post-traduzionali per il loro corretto funzionamento e di conseguenza, la natura procariotica del cloroplasto risulta essere congeniale per tale scopo.

La degradazione della biomassa vegetale tramite l'uso di enzimi HC termostabili presenta diversi vantaggi rispetto a quella che si avvale dell'utilizzo delle loro controparti enzimatiche con attività termolabile (Anitori R.P., 2012; Peng X. et al., 2015). L'alta temperatura alla quale gli HC esplicano la loro attività promuove il parziale distacco della lignina dalle fibre di cellulosa favorendo l'attività degli HC ed al contempo impedisce la contaminazione da parte di microbi di origine mesofila (Sarmiento F. et al., 2015).

Inoltre, gli inibitori proteici dei CWDE e le proteasi di difesa vegetali sono inattivate dalle alte temperature e come conseguenza, eventuali meccanismi di inibizione derivanti da queste proteine di difesa non possono verificarsi.

Al contrario, la struttura robusta degli HC conferisce una marcata stabilità enzimatica, anche in presenza di reagenti chimici aggressivi, detergenti ionici e condizioni di pH estreme che, a loro volta, possono promuovere l'indebolimento della lignocellulosa, incrementando ulteriormente l'efficienza delle reazioni di idrolisi enzimatica.

Come ulteriore passo verso la sostenibilità, le microalghe esprimenti gli HC nel cloroplasto (denominate da qui in seguito alga-HC) sono state altresì ingegnerizzate per esprimere nel citoplasma la fosfito deidrogenasi D (PTXD) di *P. stutzeri*, la cui espressione conferisce alle microalghe la capacità di utilizzare lo ione fosfito come unica fonte di fosforo, permettendo così la coltura dell'alga in mezzi di crescita addizionati con ione fosfito, anziché ione fosfato (Costas A.M.G. et al., 2001; Loera-Quezada M.M. et al., 2016). La microalga doppio-transgenica (denominata in poi come alga HC-PTXD) può essere coltivata in questo tipo di terreno senza necessità di utilizzare materiali e procedure sterili poiché lo ione fosfito ha una azione antifungina e non può essere metabolizzato da gran parte dei batteri comuni.

È bene sottolineare che materiali e procedure di sterilizzazione hanno un grande impatto sul costo di coltura delle microalghe ed infatti, in alcuni casi, può

5 rappresentare fino al 50% del costo finale di produzione. Facendo riferimento ai prezzi di alcune compagnie produttrici di microalghe, la coltura delle stesse in condizioni di non sterilità ne abbasserebbe i costi di produzione fino a 5 € kg<sup>-1</sup> DW (Rodolfi L. et al., 2009); considerando che i prodotti attualmente disponibili sul mercato a base di polveri batteriche con attività cellulolitiche termolabili hanno costi che si aggirano sui 30-40 € kg<sup>-1</sup>, si evince che il prodotto a base di microalghe trasformate con enzimi termostabili potrebbe rivelarsi molto competitivo.

10 Forma pertanto oggetto della presente invenzione una combinazione di microalghe transgeniche, dove ciascuna microalga transgenica esprime una fosfito deidrogenasi D di origine batterica ed un enzima degradativo della parete cellulare vegetale termostabili scelto scelto dal gruppo che consiste in:

- endoglucanasi B CelB di *Thermotoga neapolitana* (T-EG) avente sequenza amminoacidica:

15 MAEVVLTDIGATDITFKGFPVTMELNFWNVKSYEGETWLKFDGEKVQFY  
ADIYNIVLQNPDSWVHGYPEIYYGYKPWAAHNSGTEILPVKVKDLPDFYV  
TLDYSIWYENDLPINLAMETWITRKPQTSVSSGDVEIMVWFYNNILMPG  
GQKVDEFTTTIEINGSPVETKWDVYFAPWGWYDLAFRLTTPMKDGRVKF  
NVKDFVEKAAEVIKKHSTRVENFDEMYFCVWEIGTEFGDPNTTAAKFGW  
20 TFKDFSVEIGEYPYDVPDYA (SEQ ID NO:1) con coda-HA

- porzione con attività cellobioidrolasica del cellulosoma CelB di *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (C-CBH) avente sequenza amminoacidica

MGVTTSSPTPTPTPTVTVTPTPTPTPTVTATPTPTPTPVSTPATGGQIKVL  
YANKETNSTNTIRPWLKVVNSGSSSIDLSRVTIRYWYTVDGERAQSASV  
25 DWAQIGASNVTFKFVKLSSSVSGADYYLEIGFKSGAGQLQPGKDTGEIQIR  
FNKSDWSNYNQGNDSWLQSMYSYGENEKVTAYIDGVLVWGQEPSGA  
TPAPTMTVAPTATPTPTLSPTVTPTPAPTQTAIPTPTLTPNPTPTSSIPDDTN  
DDWLYVSGNKIVDKDGRPVWLTGINWFGYNTGTNVFDGVWSCNLKDTL  
AEIANRGNLLRVPISAELILNWSQGIYPKPNINYYVNPELEGKNSLEVF  
30 VVQTCKEVGLKIMLDIHSIKTDAMGHIYPVWYDEKFTPEDFYKACEWITN  
RYKNDDTIIAFDLKNEPHGKPWQDTTFAKWDNSTDINNWKYAAETCAKR

ILNINPNLLIVIEGIEAYPKDDVTWTSKSSSDYYSTWWGGNLRGVRKYPIN  
LGKYQNKVVYSPHDYGPSVYQQPWFYPGFTKESLLQDCWRPNWAYIME  
ENIAPLLIGEWGGHLDGADNEKWMKYLRDYIENHIIHHTFWCFNANSGD  
TGGLVGYDFTTWDEKKYSFLKPALWQDSQGRFVGLDHKRPLGTNGKNIN  
5 ITTYNNNEPEPVPASKYPYDVPDYA (SEQ ID NO:3) con coda HA  
- beta-glucosidasi di *Pyrococcus furiosus* (P-BG) avente sequenza amminoacidica  
MAKFPKNFMFGYSWSGFQFEMGLPGSEVESDWWWVVDKENIASGLVS  
GDLPENGPAYWHLKQDHDIAEKLGMDCIRGGIEWARIFPKPTFDVKVD  
VEKDEEGNIISVDVPESTIKELEKIANMEALEHYRKIYSDWKERKTFILNL  
10 YHWPLPLWIHDPIAVRKLGPDRAPAGWLDEKTVVEFVKFAAFVAYHLDD  
LVDMWSTMNEPNVVYNQGYINLRSGFPPGYLSFEAAEKAKFNLIQAHIGA  
YDAIKEYSEKSVGVIYAFAWHDPLAEYKDEVEEIRKKDYEFVTILHSGK  
KLDWIGVNYYSRLVYGAKDGHLVPLPGYGFMSERGGFAKSGRPASDFG  
WEMYPEGLENLLKYLNNAYELPMIITENGMADAADRYRPHYLVSHLKA  
15 VYNAMKEGADVRYLHWSLTDNYEWAQGFMRMFLVYVDFETKKRYL  
RPSALVFREIATQKEIPEELAHLADLKVFTRKYPYDVPDYA (SEQ ID NO:5)  
con coda HA  
- facoltativamente, la xylanasi XynA di *Thermotoga neapolitana* (T-XY) avente  
sequenza amminoacidica  
20 MATGALGFGGKGVSPFETVLVLSFEGNTDGASPFKDVVVVTASQDVAAD  
GEYSLKVENRTSVWDGVEIDLTKVNTGTDYLLSFHVYQTS DSPQLFSVL  
ARTEDEKGERYKILADKVVVPNYWKEILVPFSPTFEGTPAKFSLIITSPKKT  
DFVIFYVDNVQVLTPKEAGPKVVYETSFEKGIGDWQPRGSDVKISISPKVA  
HSGKKSFLVSNRQKGWHGAQISLKGILKTGKTYAFEAWVYQESGQDQTI  
25 MTMQRKYSSDSSTKYEWIKAATVPSGQWVQLSGTYTIPAGVTVEDLTLY  
FESQNPTLEFYVDDVKVVDTTSAEIKLEMNPEEEIPALKDVLKDYFRVGV  
ALPSKVFINQKDIALISKHFNSITAENEMKPDSLLAGIENGKCLKFRFETADK  
YIEFAQQNGMVVRGHTLVWHNQTPEWFFKDENGNNLSKEEMTERLREYI  
HTVVGHFKGKVYAWDVVNEAVDPNQPDGLRRSTWYQIMGPDYIELAFK  
30 FAREADPNAKLFYNDYNTFEPKKRDIIYNLVKSLKEKGLIDGIGMQCHISL  
ATDIRQIEEAIKKFSTIPGIEIHITELDISVYRDSTSNYSEAPRTALIEQAHKM

AQLFKIFKKYSNVITNVTFWGLKDDYSWRATRRNDWPLIFDKDYQAKLA  
YWAIVAPEVLPLPKESKISEGEAVVVGMMDDSYMMSKPIEIYDEEGNVK  
ATIRAIWKDSTIYVYGEVQDATKKPAEDGVAIFINPNNERTPYLQPDDTYV  
VLWTNWKSEVNREDVEVKKFVGPGRFRRYSFEMSITIPGVEFKKDSYIGFD  
5 VAIDDGKWYSWSDTTNSQKTNTMNYGTLKLEGVMVATAKYGTPVIDG  
EIDDIWNTTEEIEITKSVAMGSLEKNATAKVRVLWDEENLYVLAIVKDPVL  
NKDNSNPWEQDSVEIFIDENNHKTGYEDDDAQFRVNYMNEQSFGTGAS  
AARFKTAVKLIEGGYIVEAAIKWKTIKPSPNTVIGFNVQVNDANEKGQRV  
GIISWSDPTNNSWRDPSKFGNLRLLIKYPYDVPDYA (SEQ ID NO:7) con coda  
10 HA

- facoltativamente, la laccasi di *Thermus thermophilus* avente sequenza  
amminoacidica

MLARRSFLQAAAGSLVLGLARAQGSPFPEPKVVRSQGGLLSLKLSATPTP  
LALAGQRATLLTYGGSFPGPTLRVRPRDTRVRLTLENRLPEPTNLHWHGLPI  
15 SPKVDDPFLEIPPGESWTYEFTVPKELAGTFWYHPHLHGRVAPQLFAGLL  
GALVVESSLDAIPELREAEHLLVLKDLALQGGRPAPHTPMDWMNGKEG  
DLVLVNGALRPTLVAQKATLRLRLNASNARYYRLALQDHPLYLIAADG  
GFLEEPLEVSELLAPGERAEVLVRLRKEGRFLLQALPYDRGAMGMMDM  
GGMAHAMPQGSPRPETLLYLIAPKNPKPLPLPKALSPFPTLPAPVVTRRLV  
20 LTEDMMAARFFINGQVFDHRRVDLKGQAQTVEVWEVENQGDMDHPFHL  
HVHPFQVLSVGGRPFPYRAWKDVVNLKAGEVARLLVPLREKGRTVFHCH  
IVEHEDRGMMGVLEVG (SEQ ID NO:14)

- facoltativamente, la polifenolo ossidasi di *Thermus thermophilus* avente  
sequenza amminoacidica

MTLLRTPLVPHGFTTREGGVSEGPFRSLNLSAATGDDPERVAENQRRVL  
25 AAFGHPPVAGLRQVHGTEVHPVEGPGLWEGDGLLTRTPGLLLRVGVADC  
YPLLLYHPKGAVGALHAGWRGVVGGILPKALERLEAVYRLDPTEVHLAI  
GPGIGGACYQVGEEVVARFAEAGLFTFREDPAAPGKYLLDLEKALLLQAR  
RAGLREERIYRVGLCTHCAPNLFSHRRDRGRTGRMWGLVMLPPR  
30 (SEQ ID NO:16).

La suddetta sequenza nucleotidica della endoglucanasi B di *Thermotoga neapolitana* è codificata dalla sequenza nucleotidica con codon usage ottimizzato per l'espressione cloroplastica SEQ ID NO: 2; la suddetta porzione CBM3GH5 del celluloma CelB di *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* è codificata dalla  
5 sequenza nucleotidica con codon usage ottimizzato per l'espressione cloroplastica SEQ ID NO: 4; la suddetta beta-glucosidasi di *Pyrococcus furiosus* è codificata dalla sequenza nucleotidica con codon usage ottimizzato per l'espressione cloroplastica SEQ ID NO: 6; la suddetta xylanasi XynA di *Thermotoga neapolitana* è codificata dalla sequenza nucleotidica con codon usage ottimizzato  
10 per l'espressione cloroplastica SEQ ID NO: 8; la suddetta laccasi di *Thermus thermophilus* è codificata dalla sequenza nucleotidica con codon usage ottimizzato per l'espressione cloroplastica SEQ ID NO: 15 e la suddetta polifenolo ossidasi di *Thermus thermophilus* è codificata dalla sequenza nucleotidica con codon usage ottimizzato per l'espressione cloroplastica SEQ ID NO: 17.

15 Secondo una forma preferita di realizzazione della presente invenzione, le microalghe transgeniche appartengono alla specie *Chlamydomonas reinhardtii*.  
In una forma preferita di realizzazione della presente invenzione detta fosfito deidrogenasi D proviene da *Pseudomonas stutzeri* (PTXD) e ha la seguente sequenza amminoacidica:

20 MLPKLVITHRVHDEILQLLAPHCELMTNQTDSTLTREEILRRCRDAQAMM  
AFMPDRVDADFLQACPELRVVGKALKGFDFDNDVDACTARGVWLTFVPD  
LLTVPTAELAIGLAVGLGRHLRAADAFVRSGEFQGWQPQFYGTGLDNAT  
VGILGMGAIGLAMADRLQGWGATLQYHEAKALDTQTEQRLGLRQVACS  
ELFASDFILLALPLNADTQHLVNAELLALVRPGALLVNPCRGSVVDEAA  
25 VLAALERGQLGGYAADV FEMEDWARADRPRLIDPALLAHPNTLFTPHIGS  
AVRAVRLEIERCAAQNIIQVLAGARPINAANRLPKAEPAACEF  
(SEQ ID NO:11)

La suddetta sequenza amminoacidica della fosfito deidrogenasi D di *Pseudomonas stutzeri* (PTXD) è codificata dalla seguente sequenza nucleotidica  
30 ottimizzata:

ATGCTGCCGAAGCTGGTCATCACCCACCGCGTCCACGACGAGATCCTG  
CAGCTGCTGGCCCCGCACTGCGAGCTGATGACGAACCAGACCGACTCG  
ACCCTGACGCGCGAGGAGATCCTGCGCCGCTGCCGCGACGCGCAGGCT  
ATGATGGCCTTCATGCCGGACCGCGTGGACGCTGACTTCCTGCAGGCT  
5 TGCCCGGAGCTGCGCGTGGTCGGCTGCGCTCTGAAGGGCTTCGACAAC  
TTCGACGTGGACGCTTGCACCGCTCGCGGGCGTGTGGCTGACGTTCTGTC  
CCGGACCTGCTGACCGTGCCGACGGCTGAGCTGGCCATCGGCCTGGCT  
GTCGGCCTGGGCCGCCACCTGCGCGCCGCGGACGCTTTCGTGCGCTCC  
GGCGAGTTCCAGGGCTGGCAGCCGCAGTTCTACGGCACCGGCCTGGAC  
10 AACGCTACGGTCGGCATCCTGGGCATGGGCGCTATCGGCCTGGCTATG  
GCTGACCGCCTGCAGGGCTGGGGCGCTACCCTGCAGTACCACGAGGCT  
AAGGCCCTGGACACCCAGACGGAGCAGCGCCTGGGCCTGCGCCAGGT  
GGCTTGCAGCGAGCTGTTTCGCCTCGTCCGACTTCATCCTGCTGGCTCTG  
CCGCTGAACGCTGACACCCAGCACCTGGTCAACGCTGAGCTGCTGGCT  
15 CTGGTGCGCCCCGGCGCTCTGCTGGTCAACCCGTGCCGCGGCTCTGTG  
GTGGACGAGGCTGCCGTGCTGGCTGCTCTGGAGCGCGGCCAGCTGGGC  
GGCTACGCCGCGGACGTCTTCGAGATGGAGGACTGGGCGCGCGCTGA  
CCGCCCGCGCCTGATCGACCCGGCTCTGCTGGCTCACCCGAACACCT  
GTTACGCCGCACATCGGCAGCGCCGTGCGCGCGGTCCGCCTGGAGAT  
20 CGAGCGCTGCGCTGCCAGAACATCATCCAGGTGCTGGCCGGCGCCCG  
CCCGATCAACGCTGCCAACCGCCTGCCGAAGGCTGAGCCGGCTGCTTG  
CGAATTCTAA (SEQ ID NO: 12)

La presente invenzione ha ad oggetto anche l'uso di una combinazione di  
microalghe transgeniche come sopra definita, per la produzione di una miscela di  
25 enzimi degradativi della parete cellulare vegetale termostabili in un mezzo di  
coltura contenente lo ione fosfito come fonte di fosfato.

L'invenzione concerne altresì un procedimento per la produzione di una miscela di  
enzimi degradativi della parete cellulare vegetale termostabili, comprendente le  
seguenti fasi:



- a) coltura di una combinazione di microalghe transgeniche come sopra definita in un mezzo di coltura comprendente lo ione fosfito come unica fonte di fosforo in un fotobioreattore;
- b) liofilizzazione delle microalghe, preferibilmente a -80°C;
- 5 c) estrazione degli enzimi alternativamente mediante sonicazione, breve trattamento termico a 80°C, condizioni non denaturanti o condizioni denaturanti.

Forma altresì oggetto della presente invenzione la miscela di enzimi degradativi della parete cellulare vegetale termostabili ottenibile con il procedimento che  
10 utilizza la combinazione di microalghe transgeniche dell'invenzione, caratterizzata dal fatto di comprendere endoglucanasi B di *Thermotoga neapolitana* (SEQ ID NO:1), la porzione con attività cellobioidrolasica del cellulosoma CelB di *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (SEQ ID NO:3) la beta-glucosidasi di *Pyrococcus furiosus* (SEQ ID NO:5), e facoltativamente la xylanasi XynA di  
15 *Thermotoga neapolitana* (SEQ ID NO:7).

Secondo una forma preferita di realizzazione della presente invenzione la miscela ternaria (comprendente endoglucanasi B di *Thermotoga neapolitana*, la porzione con attività cellobioidrolasica del cellulosoma CelB di *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* e la beta-glucosidasi di *Pyrococcus furiosus*) è caratterizzata da  
20 un rapporto [g ceppo endoglucanasi B : g ceppo porzione cellobioidrolasica del cellulosoma CelB : g ceppo beta-glucosidasi] di 20 : 50 : 30, a cui corrisponde un rapporto enzimatico molare [mol endoglucanasi B: mol porzione cellobioidrolasica del cellulosoma CelB : mol beta-glucosidasi] di 5 : 65 : 30. Tale miscela è caratterizzata da una attività specifica (Unità enzimatiche per g di peso  
25 secco di miscela algale) compresa tra 10 e 30 U verso il substrato CMC e tra 8 e 24 U verso il substrato pNPG.

L'aggiunta di xylanasi XynA alla miscela ternaria di cui sopra comporta un rapporto [g ceppo endoglucanasi B : g ceppo porzione cellobioidrolasica del cellulosoma CelB : g ceppo beta-glucosidasi : g ceppo xylanasi] pari a 20 : 40 :  
30 20 : 20, ed un rapporto enzimatico molare [mol endoglucanasi B : mol porzione cellobioidrolasica del cellulosoma CelB : mol beta-glucosidasi : mol xylanasi]

pari a 5 : 60 : 25 : 10. In questo caso, l'attività specifica è compresa tra 8 e 24 U verso il substrato CMC, tra 6 e 18 U verso il substrato pNPG e tra 1 e 3 U verso il substrato xilano.

5 Secondo una forma particolarmente preferita di realizzazione la miscela di enzimi degradativi della parete cellulare vegetale termostabili dell'invenzione è in forma di polvere liofilizzata.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione l'uso della miscela di enzimi degradativi della parete cellulare vegetale termostabili sopra definita per la biodegradazione di substrati a base di cellulosa (i.e. pasta di carta) o di lignocellulosa (ad esempio, nella produzione di biocarburanti). Ovviamente in quest'ultimo caso sarà necessario prevedere l'inclusione nella miscela di microalghe, una microalga trasformata in modo da esprimere enzimi del tipo ligninasi.

15 Preferibilmente, le microalghe appartengono alla specie *Chlamydomonas reinhardtii*.

Secondo una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, gli enzimi degradativi della parete cellulare vegetale termostabili presenti nella miscela sono scelti tra endoglucanasi, cellobioidrolasi, beta glucosidasi, xylanasi, ligninasi (laccasi e/o polifenolo ossidasi) e o loro miscele. Preferibilmente, detti enzimi sono endoglucanasi, cellobioidrolasi, beta glucosidasi; ancora preferibilmente endoglucanasi, cellobioidrolasi, beta glucosidasi e xylanasi.

La possibilità di fare crescere le microalghe in elevati volumi grazie all'utilizzo dello ione fosfito consente di evitare di ricorrere a processi di sterilizzazione che su larga scala sarebbero insostenibili dal punto di vista economico.

25 A titolo esemplificativo la miscela di enzimi degradativi della parete cellulare vegetale termostabili prodotti dalla combinazione di microalghe transgeniche secondo la presente invenzione può essere vantaggiosamente utilizzata negli impianti di produzione di biogas per degradare il substrato cellulosico nei singoli carboidrati semplici. Si opera in bioreattori a 80-100°C, dove i batteri presenti producono metano. La polvere liofilizzata comprendente gli enzimi termostabili

30

cellulosolitici può essere usata direttamente sul substrato in quantità comprese tra 1 Kg: 1 tonnellata di substrato a 5 Kg: 1 tonnellata di substrato.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo una forma preferita di realizzazione con particolare riferimento alle figure allegate, in cui:

5 - la Figura 1 mostra una rappresentazione grafica della cellula di *C. reinhardtii* come biofabbrica degli enzimi HC. a) Lista degli enzimi che costituiscono il macchinario cellulosolitico [T-EG=Endoglucanasi, C-CBH=Cellobioidrolasi, P-BG=beta-glucosidasi, T-XY=Xylanasi]. b) Ogni ceppo coesprime l'enzima fosfito deidrogenasi (PTXD) e uno degli enzimi HC illustrati in a).  
10

- la Figura 2 mostra i risultati della valutazione della condizione omoplasmica nelle alghe-HC. L'amplicone di 404 e di 350 bp indica la presenza della regione invertita-ripetuta (IR) del plasmide cloroplastico wild-type (WT) e ricombinante, rispettivamente. Il DNA del ceppo 1a+ e del plasmide pLM20 sono stati utilizzati  
15 come controllo negativo e positivo della condizione di omoplasma, rispettivamente. L'analisi di quattro trasformanti dell'alga esprimente T-EG (#1-4) sono riportati come risultato rappresentativo.

- la Figura 3 mostra l'espressione cloroplastica degli HC. a) Valutazione dell'attività dei vari HC negli estratti cellulari di *C. reinhardtii* ottenuti mediante  
20 rottura meccanica (sonicazione + biglie), mediante trattamento con detergenti anionici (2% SDS), con detergenti non ionici e trattamento al calore (0,3% Tween20 + calore), e con il solo trattamento termico (calore). b) Analisi di immuno-decorazione condotta sugli estratti cellulari di *C. reinhardtii* utilizzando il trattamento con detergente non ionico e calore. L'attività enzimatica è espressa  
25 come Enzyme Units ( $\mu\text{moli min}^{-1}$ ) per grammo (DW= dry weight) di alga ed è stata valutata a pH 5.5 e 75°C. [T-EG: Endoglucanasi di *Thermotoga neapolitana*, C-CBH: Cellobioidrolasi di *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, P-BG: Beta-glucosidasi di *Pyrococcus furiosus*, T-XY: Endoxylanasi di *Thermotoga neapolitana*].

30 - la Figura 4 mostra i risultati della determinazione delle attività specifiche. a) L'attività degli HC nelle frazioni eluite (fx) dalla cromatografia a scambio

- anionico espressa come attività relativa (%). Viene riportato anche il gradiente di eluizione a lato. b) Analisi SDS-PAGE (a sinistra) e di immuno-decorazione (a destra) condotta sulle frazioni che hanno mostrato la maggiore attività. [T-EG: Endoglucanasi di *Thermotoga neapolitana*, C-CBH: Cellobioidrolasi di
- 5 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, P-BG: Beta-glucosidasi di *Pyrococcus furiosus*, T-XY: Endoxylanasi di *Thermotoga neapolitana*].
- la Figura 5 mostra la crescita delle alghe-HC (ceppo HC) e delle alghe-HC-PTXD (ceppo HC-PTXD) in condizioni di mixotrofia utilizzando un mezzo di crescita in cui lo ione fosfato è stato sostituito con lo ione fosfito.
- 10 - la Figura 6 mostra gli istogrammi che illustrano i risultati dell'ottimizzazione delle condizioni di espressione nell'alga C-CBH-PTXD. a) Attività enzimatica degli estratti cellulari da colture algali cresciute per sette giorni in condizioni di fotoautotrofia utilizzando tre differenti intensità luminose. b) Attività enzimatica degli estratti cellulari da colture algali cresciute per sette giorni a  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- 15 utilizzando differenti mezzi di crescita [TAP: Tris-Acetate-Phosphate medium; TA-Phi: TAP medium in cui il fosfato è stato sostituito con 1 mM fosfito; T10A-Phi: TA-Phi con 10% del Tris; T10A-Phi NS: T10A-Phi ottenuto con materiali e condizioni non sterili]. c) Attività enzimatica degli estratti cellulari da colture algali cresciute per sette giorni in T10A-Phi NS utilizzando differenti intensità
- 20 luminose. I numeri sopra le colonne indicano la biomassa prodotta (DW= dry weigh) per litro di coltura. I valori sono stati calcolati come media di due replicati biologici differenti. La concentrazione degli inoculi iniziali è stata di  $2.5 \times 10^5$  cell  $\text{mL}^{-1}$ . d) Crescita di C-CBH-PTXD nei due fotobioreattori a colonna da 60 L ciascuno utilizzando materiali e condizioni non sterili.
- 25 - la Figura 7 mostra i dati di conversione della cellulosa PASC con estratti proteici di diverse miscele HC-PTXD. a) Conversione della cellulosa PASC (0,6% w/v) in estremità riducenti (barra bianca) e zuccheri (barra grigia) dopo 24 ore di incubazione con gli estratti proteici di differenti miscele HC-PTXD (#1-11). I numeri indicano la percentuale (w/w) del corrispondente ceppo HC-PTXD
- 30 utilizzato in ogni miscela. b) Conversione della cellulosa PASC (0,6% w/v) in estremità riducenti e zuccheri dopo 24 ore di incubazione con l'estratto proteico

della miscela HC-PTXD #8. Cellulosa PASC (0,6%, w/v) fresca è stata aggiunta alla stessa miscela di reazione ogni 24 ore. Ogni percentuale di conversione è riferita all'ultima aggiunta di cellulosa PASC. c) Valutazione dell'attività nella HC-PTXD mix (a cui è stata aggiunta anche l'alga T-XY, 20%, w/w) nei confronti di CMC (barra grigia), pNPG (barra bianca) e xilano (barra nera) prima (HC-PTXD mix) e dopo liofilizzazione e conservazione per 1 mese a temperature ambiente (HC-PTXD mix liofilizzato).

Allo scopo di meglio illustrare l'invenzione vengono ora forniti i seguenti esempi che sono da ritenersi illustrativi e non limitativi della stessa.

10 ESEMPIO 1: Sintesi in vitro e clonaggio dei geni codificanti gli HC

MATERIALI E METODI

Espressione cloroplastica degli enzimi cellulolitici in *C. reinhardtii*

L'endoglucanasi B di *Thermotoga neapolitana* (T-EG) (Bok J.D. et al., 1998), la porzione con attività cellobioidrolasica del celulosoma CelB di *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* nota come CBM3GH5 (C-CBH; Park J.I. et al., 2011; US 9,624.482 B2) e la beta-glucosidasi di *Pyrococcus furiosus* (P-BG) (Kengen S.W.M. et al., 1993; Kado Y. et al., 2011) sono stati selezionati come componenti principali della macchina cellulolitica da esprimere nel cloroplasto della microalga.

20 Inoltre, la xylanasi XynA di *T. neapolitana* (T-XY) (Zverlov et al., 1996) è stato incluso come enzima di supporto per la degradazione di substrati più complessi (Hu J. et al. 2011) dal momento che lo xilano, substrato di XynA, è una delle emicellulose più abbondanti e la sua presenza può inibire l'attività delle cellulasi. I quattro HC sono stati singolarmente espressi nel cloroplasto *C. reinhardtii* con lo scopo di compartimentalizzarne ed al contempo massimizzarne l'espressione (Rochaix J.D. et al., 2014). La co-espressione degli HC nella stessa cellula è stata evitata dal momento che una reazione efficiente di idrolisi richiede precise quantità di ogni enzima e, nel caso di co-espressione, questa non può essere gestita dall'operatore

30 In particolare, le seguenti sequenze proteiche di CelB di *T. neapolitana* (UniprotKB: P96492, aa 18-274) (SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2), della porzione

CBM3GH5 del celulosoma CelB di *C. saccharolyticus* (UniprotKB: P10474, aa 380-1039) (SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4), della beta-glucosidasi di *P. furiosus* (UniprotKB: Q51723, aa 1-472) (SEQ. ID NO: 5, SEQ ID NO: 6) e della xylanasi XynA di *T. neapolitana* (UniprotKB: Q60042, aa 30-1055) (SEQ. ID NO: 7, SEQ ID NO: 8) sono state convertite in sequenze nucleotidiche con codon usage ottimizzato per l'espressione cloroplastica in *C. reinhardtii* utilizzando il programma OPTIMIZER.

Le sequenze codificanti gli enzimi che compongono la macchina cellulolitica (Figura 1) sono state ottimizzate per l'espressione cloroplastica di *C. reinhardtii* e fuse al 3' con la sequenza codificante l'epitopo HA (C-terminale della sequenza proteica) che ne ha permesso il rilevamento tramite analisi di immunodecorazione. Successivamente i geni sono stati clonati in un vettore di espressione ottimizzato per l'espressione del cloroplasto (Day A. and Goldschmidt-Clermont M. 2011; Michelet L. et al., 2011) ed introdotti singolarmente in *C. reinhardtii* tramite bombardamento con cannoncino biolistico (Purton S., 2007). I trasformanti ottenuti sono stati sottoposti a ripetuti cicli di selezione per promuovere la condizione di omoplasma che è stata poi confermata tramite analisi di PCR sul DNA dei trasformanti (Figura 2).

L'eventuale presenza di peptidi segnale per la secrezione in ambiente extracellulare è stata esclusa tramite l'utilizzo del programma Signal IP 4.1 Server. La sequenza codificante l'epitopo HA (YPYDVPDYA) è stata aggiunta al 3' di ogni sequenza. Le sequenze contenenti i siti di restrizione NcoI e SphI sono state fuse al 5' e 3', rispettivamente, di ogni sequenza. Sequenze intrageniche contenenti i siti di restrizione NcoI, SphI, ClaI e SmaI sono state accuratamente mutate in maniera da eliminare la presenza del sito di restrizione ma di non alterare l'eventuale sequenza proteica derivante. I geni sono stati quindi sintetizzati *in vitro* dalla GeneArt (Life Technologies). I geni sintetici sono stati separatamente clonati a valle del promotore che regola l'espressione del gene *psaA* all'interno del vettore pCLE (SEQ ID NO: 9) utilizzando i siti di restrizione NcoI e SphI. Successivamente, la cassetta di espressione che include il transgene ed il gene *aadA* che conferisce la resistenza alla spectinomicina è stata excisa dal

vettore pCLE utilizzando i siti di restrizione ClaI and SmaI e trasferita nel vettore di espressione pLM20 (Michelet L. et al. 2011) (SEQ ID NO: 10). *E. coli* ceppo XL10gold (Agilent Technologies) è stato trasformato con questi costrutti ed utilizzato per la propagazione del DNA ricombinante.

5 Trasformazione e selezione dei ceppi HC-PTXD

Successivamente i quattro ceppi di alga-HC sono stati ingegnerizzati per l'espressione del gene PTXD di *Pseudomonas stutzeri* che codifica una ossidoreduttasi (Costas A.M.G., 2001), la cui espressione conferisce alla microalga la capacità di metabolizzare lo ione fosfito come unica fonte di fosforo (López-Arredondo D. e Herrera-Estrella L., 2012; Loera-Quezada M.M. et al., 2015; US 2012/0295303 A1). Il ceppo di *C. reinhardtii* utilizzato è 1a+. Per la trasformazione cloroplastica dei geni esprimenti gli enzimi HC, 1a+ è stato trasformato utilizzando le stesse procedure e strumentazioni descritte in Faè et al., 2017. La selezione dei trasformanti omoplasmici è stata condotta come indicato in Goldschmidt-Clermont, 1991.

Per l'espressione nucleare di PTXD (SEQ ID NO. 11; SEQ ID NO: 12), le alghe-HC sono state elettroporate utilizzando lo stesso costrutto utilizzato in (Loera-Quezada M.M. et al., 2016) (SEQ ID NO: 13) e i trasformanti ottenuti (denominate alghe HC-PTXID) sono stati analizzati per la loro capacità di crescere in mezzi di coltura contenenti lo ione fosfito anziché lo ione fosfato. In particolare, la selezione dei trasformanti esprimenti PTXD è stata condotta monitorando la crescita dei trasformanti in un mezzo di crescita costituito di solo TA (Tris Acetato) e ione fosfito alla concentrazione di 0,3 mM, alla temperatura di 25°C ed intensità luminosa di 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . I trasformanti capaci di crescere in queste condizioni sono stati inoculati in mezzi di crescita ad aumentata concentrazione di ione fosfito (fino a 5 mM) e selezionati quindi come alghe-HC-PTXD (Figura 5).

Crescita di *C. reinhardtii*

In piccola scala, *C. reinhardtii* è stata propagata in un sistema di tipo multicultivator (Photon System Instruments) alla temperatura di 25°C, intensità luminosa di 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ed aria gorgogliante. La crescita delle alghe-HC-

PTXD è stata condotta in versioni modificate dei mezzi di crescita HS e TAP in cui la fonte di fosforo è costituita da differenti concentrazioni di ione fosfito da 0,3 a 5 mM. Il mezzo di crescita T10A-Phi è costituito dal 10% della normale concentrazione di Tris utilizzata nella preparazione del mezzo di crescita TAP (i.e. 0,2 g L<sup>-1</sup>). La crescita di *C. reinhardtii* in mezzo di crescita non sterile ha previsto l'utilizzo di acqua di rubinetto corrente. Per la crescita di *C. reinhardtii* in larga scala, è stato utilizzato un fotobioreattore a colonna da 60-L (prodotto dalla SCUBLA srl) in cui sono state utilizzate le condizioni di crescita che ne hanno permesso la maggiore produttività in piccola scala (sistema multi-cultivator).

#### 10 Ottimizzazione dell'espressione cloroplastica nella microalga HC-PTXD

Con lo scopo di determinare le condizioni di crescita che hanno permesso un maggiore accumulo di enzima HC, l'attività di C-CBH, qui riportata come espressione di un enzima HC di riferimento, è stata valutata coltivando la microalga in differenti condizioni di luminosità e mezzi di crescita (Figura 6, pannelli a-c). Degno di nota il fatto che la crescita del ceppo C-CBH-PTXD in condizioni di non sterilità (e.g. utilizzando acqua corrente non sterile) non ha inficiato i livelli di espressione dell'enzima C-CBH (Figura 6, pannello b). Tra le varie condizioni di luminosità testate, la minore biomassa algale ottenuta in condizioni di luminosità pari a 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (0,7 gr L<sup>-1</sup>) è stata però bilanciata da un più alto livello di espressione dell'enzima (15,3 U gr<sup>-1</sup>) indicando che l'intensità luminosa di 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  è ottimale per l'espressione degli enzimi HC in condizioni di mixotrofia (10,7 U L<sup>-1</sup>) (Figura 6, pannello c). La stessa produttività di C-CBH è stata ottenuta anche in fotobioreattori a colonna da 60-L utilizzando una versione più economica del mezzo di crescita TAP, costituita dal 10% della concentrazione di Tris comunemente utilizzata, nonché ione fosfito al posto dello ione fosfato ed acqua corrente non sterile (Figura 6, pannello d).

#### 25 Estrazione proteica di *C. reinhardtii* e saggi enzimatici

L'estrazione proteica è stata condotta utilizzando differenti metodi e condizioni dalle cellule liofilizzate di *C. reinhardtii*. Dopo la liofilizzazione, la polvere risultante è stata conservata a temperature ambiente per 1 mese o, in caso di periodi più lunghi, alla temperatura di -80°C. Le alghe liofilizzate, sono state



risospese in rapporto [1 mL tampone di estrazione: 6 mg DW microalghe]. L'estrazione in condizioni non-denaturanti è stata condotta utilizzando un tampone di lisi costituito da citrato 10 mM pH 5.5 e 0,3% Tween20. I campioni risospesi sono stati incubati in lieve agitazione per 1 h a 70°C. Per l'estrazione  
5 tramite rottura meccanica, le cellule sono state incubate per 30 minuti in un bagnetto di tipo Ultrasonic bath (Sigma-Aldrich), in presenza di biglie di vetro dal diametro di 425-600 µm (Sigma-Aldrich). L'estrazione in condizioni denaturanti è stata effettuata utilizzando un tampone di lisi composto da 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 2% SDS e 10 mM EDTA. La risospensione del campione è stata  
10 effettuata in rapporto [1 mL tampone di estrazione: 6 mg DW microalghe]. Dopo l'estrazione, il campione è stato centrifugato (14000g x 10 minuti) ed il surnatante utilizzato per le analisi. Le proteine totali da 60 µg DW di biomassa algale sono state analizzate tramite SDS-PAGE o tramite saggio enzimatico; per l'analisi di immuno-decorazione è stato utilizzato un anticorpo monoclonale AbHA (HA7  
15 clone, Sigma-Aldrich).

Per i saggi enzimatici, gli estratti proteici (1/10 del volume totale della reazione) sono stati incubati in un tampone costituito da 50 mM di Sodio Acetato pH 5.5 e substrato alle seguenti concentrazioni: 1% CMC (per valutare l'attività endoglucanasica di T-EG e cellobioidrolasica di C-CBH), 5 mM pNPG (per  
20 valutare l'attività beta-glucosidasi di P-BG) e 1% xilano (per valutare l'attività xilanasica di T-XY). Tutti i substrati sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich. La condizione di pH e temperatura ottimale per le reazioni enzimatiche sono state stabilite sulle basi delle caratterizzazioni enzimatiche riportate precedentemente in Kengen S.W.M. et al. 1993; Zverlov V. et al., 1996; Bok J.D. et al. 1998; Park J.I.  
25 et al. 2011, scegliendo un unico valore di pH e temperatura per condurre tutte le reazioni (i.e. 75°C and pH 5.5).

L'attività è stata espressa come Unità Enzimatiche (µmoli estremità riducenti min<sup>-1</sup> o µmoli p-nitrofenolo min<sup>-1</sup>) per grammo (g) peso secco (DW) di microalga. La determinazione delle micromoli di estremità riducenti a seguito di idrolisi  
30 enzimatica è stata effettuata come in (Lever M., 1972) utilizzando quantità differenti di glucosio come curva di taratura. La determinazione delle µmoli di p-

nitrofenolo rilasciate a seguito di idrolisi è stata effettuata utilizzando quantità differenti di p-nitrofenolo come curva di taratura. I valori di Unità Enzimatiche sono state calcolate come media di due differenti tempi di reazione; la stessa reazione effettuata utilizzando estratti cellulari autoclavati è stata utilizzata come controllo negativo.

#### Purificazione degli HC e determinazione della attività specifiche

Per la purificazione degli HC, l'estrazione in condizioni non-denaturanti è stata effettuata da 100 mg di liofilizzato di *C. reinhardtii* utilizzando un tampone modificato (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0,3% Tween20) in rapporto [1 mL tampone di estrazione: 6 mg DW microalghe]. Dopo 1 ora di incubazione a 70°C, seguita dalla centrifugazione del campione (14000g x 10 minuti), il surnatante è stato caricato su una colonna cromatografica Q-sepharose (Amersham) pre-equilibrata con 20 mM Tris-HCl pH 7.5. L'eluizione è stata effettuata tramite un gradiente a step di NaCl. Le frazioni eluite dalla colonna Q-sepharose sono state analizzate tramite saggio di attività. Le frazioni che hanno mostrato la più alta attività sono state analizzate tramite SDS-PAGE per determinare la concentrazione enzimatica utilizzando quantità differenti di BSA come curva di taratura.

La determinazione della concentrazione è stata effettuata tramite il programma Quantity-One (Biorad). L'identità delle bande è stata confermata tramite analisi di immuno-decorazione. L'attività specifica è stata utilizzata per determinare i livelli di espressione di ogni enzima per ogni ceppo di alga-HC. L'attività specifica dei vari HC è stata valutata a 75°C e pH 5.5.

#### Valutazione attività enzimatica degli HC

L'attività enzimatica degli HC è stata quindi valutata negli estratti cellulari di *C. reinhardtii*; differenti metodi di estrazione come la sonicazione in presenza di biglie di vetro o il trattamento con detergenti anionici e non ionici sono stati impiegati per determinare quale metodo fosse il più congeniale per l'estrazione degli enzimi. Gli HC sono stati efficientemente estratti incubando le cellule a 70°C in presenza del 0,3% (v/v) di Tween20, come è stato dimostrato dai livelli di attività paragonabile a quelli ottenuti mediante la rottura meccanica delle cellule (Figura 3, pannello a).

Degno di nota, il fatto che gli enzimi T-EG e C-CBH sono risultati resistenti al trattamento con SDS, suggerendo una loro possibile applicazione in tamponi di reazione contenenti detergenti anionici (Li Y. et al., 2016). L'analisi di immunodecorazione ha confermato la presenza dei quattro enzimi nei lisati cellulari che, come indicato dalle differenti intensità dei segnali, erano espressi a livelli  
5  
differenti (Figura 3, pannello b). In questo caso, gli inibitori delle proteasi non sono stati aggiunti nel tampone di estrazione al fine di mimare le condizioni di estrazione e reazione in campo reale.

Una procedura di purificazione costituita da un arricchimento termico (Patchett  
10 M.L. et al., 1989) seguito da una cromatografia a scambio anionico (AEC) ha permesso di purificare i quattro enzimi; essendo proteine con punto isoelettrico acido, sono state trattenute dalla colonna cromatografica in condizioni di pH neutro, e sono state eluite con concentrazioni di NaCl comprese tra lo 0,3 e lo 0,6 M.

15 L'attività dei vari enzimi è stata utilizzata per verificarne la presenza nelle differenti frazioni eluite dalla cromatografia AEC (Figura 4, pannello a). Le frazioni che hanno mostrato la più alta attività sono state valutate tramite analisi SDS-PAGE ed analisi di immunodecorazione; quest'ultima ha confermato bande dal peso molecolare atteso per ogni enzima isolato (Figura 4, pannello b).

20 Dopo avere determinato la concentrazione di ogni enzima nelle varie frazioni, si è proceduto a calcolarne l'attività specifica (espressa come Unità Enzimatiche per mg di Enzima) (Figura 4, pannello c) che, sua volta, ne ha permesso di stimare il livello negli estratti cellulari iniziali.

25 La seguente Tabella 1 riporta i risultati di attività specifica dei vari HC verso i substrati carbossimetilcellulosa (CMC) 1%, paranitrofenilglucoside (pNPG) 5 mM e xilano (Xylan) 1%.

Tabella 1

U mg <sup>-1</sup>	T-EG	P-BG	C-CBH	T-XY
CMC	384 ± 12	-	23,8 ± 0,1	-

pNPG		99,8 ± 1,4	-	
Xilano	-	-	-	52,6 ± 2,1

La più alta resa è stata ottenuta per la cellobioidrolasi C-CBH (0,8-1 mg g<sup>-1</sup> DW alga), seguita dalla beta-glucosidasi P-BG (0,3-0,4 mg g<sup>-1</sup> DW alga) e dalla xilanasi T-XY (0,2-0,3 mg g<sup>-1</sup> DW alga). La resa della endoglucanasi è stata la più  
5 bassa (0,02-0,03 mg g<sup>-1</sup> DW alga) in accordo con il basso segnale rilevato dall'analisi di immuno-decorazione sugli estratti cellulari (Figura 3, pannello b). Comunque, è doveroso sottolineare che eventuali contaminanti negli estratti cellulari grezzi possono interferire con l'attività enzimatica risultando in una sottostima del reale livello di espressione dell'enzima.

10 Pretrattamento della cellulosa PASC con la polvere a base di alghe

La cellulosa pretrattata con acido fosforico (PASC) è stata preparata come descritto in Cannella D. et al., 2016. La cellulosa PASC ottenuta seguendo tale procedura è caratterizzata da un contenuto in zuccheri (glucosio) maggiore del 90% (w/w). 0,6 g di HC-PTXD mix liofilizzata è stata risospesa in 100 mL di  
15 buffer di estrazione non-denaturante ed incubata a 70°C per 1 ora. Al termine dell'incubazione, il campione è stato centrifugato (14000g x 10 min) ed il surnatante utilizzato per i saggi enzimatici. Per tale motivo, si è aggiunto al surnatante la cellulosa PASC (0,3 ppure 0,6%, w/v) e la reazione è stata incubate a 75°C per 24 ore. Al fine di testare la termo-resistenza degli HC, la miscela di  
20 reazione è stata addizionata con cellulosa PASC fresca ogni 24. La reazione alla quale non si è aggiunta nuova PASC è stata utilizzata come controllo negativo della reazione alla quale la PASC è stata aggiunta. Tale procedura è stata ripetuta per un totale di 4 cicli da 24 ore ciascuno. Prima dell'analisi degli zuccheri solubili, il campione è stato centrifugato (4000g x 5 min) ed il surnatante  
25 utilizzato per le analisi successive. La conversione (%) è riferita alla percentuale

in peso di (estremità riducenti e zuccheri totali) rilasciati dalla cellulosa PASC.

#### Determinazione dei carboidrati nella cellulosa PASC

La determinazione delle  $\mu$ mol di estremità riducenti rilasciate a seguito di idrolisi enzimatica è stata eseguita in accordo con (Lever M., 1972) utilizzando differenti  
5 quantità di glucosio come curva di calibratura. I zuccheri totali sono stati determinati tramite il saggio colorimetrico del fenolo-acido solforico (Dubois M. et al., 1956). Gli zuccheri totali contenuti nella cellulosa PASC sono stati determinati dopo idrolisi acida del substrato condotta seguendo la procedura descritta dal Laboratory Analytical Procedure of the National Renewable Energy  
10 Laboratory: il campione è stato dapprima disciolto in acido solforico al 72% (v/v) alla temperatura di 30 °C per 1 ora e quindi è stato diluito ad una concentrazione finale di acido solforico del 4% (v/v) ed incubato alla temperatura di 120°C per 1 ora. Il surnatante è stato quindi saggiato per determinare la quantità di zuccheri solubilizzati. Gli zuccheri sono stati quindi determinati tramite il saggio  
15 colorimetrico del fenolo-acido solforico. I valori riportati sono una media di tre replicati indipendenti (Dubois M. et al., 1956).

#### Ottimizzazione della miscela HC-PTXD

Con lo scopo di ottimizzare il prodotto a base di alghe per la degradazione di materiale lignocellulosico, sono state testate differenti miscele dei vari ceppi  
20 esprimendo gli enzimi HC (i.e. alghe-HC-PTXD) nonché la loro stabilità a seguito di conservazione a lungo termine. E' doveroso notare che gli enzimi scelti sono tutti caratterizzati da un pH ottimale che varia da 5 a 6 il che ne ha permesso l'utilizzo simultaneo senza perdite di attività significative (Kengen S.W.M. et al. 1993; Zverlov V. et al., 1996; Bok J.D. et al. 1998; Park J.I. et al. 2011). La  
25 capacità degradativa degli estratti ottenuti da 11 differenti miscele delle quattro alghe-HC-PTXD è stata testata utilizzando come substrato della cellulosa pretrattata con acido fosforico, il cui acronimo è PASC. Dopo 1 giorno di incubazione a 75°C, la più alta conversione del substrato PASC in zuccheri solubili (espressi come zuccheri totali e riducenti) è stata ottenuta dalla miscela #8  
30 (Figura 7, pannello a), la cui composizione [T-EG: C-CBH: P-BG] è 20:50:30 (w/w/w).

La formulazione HC-PTXD #8, denominata da qui in seguito come HC-PTXD mix, è caratterizzata da un contenuto di enzimi cellulolitici dello 0,1% (w/w: 5% T-EG, 66% C-CBH, 29% P-BG che corrispondono a 0,01 mg di T-EG, 0,5 mg di C-CBH e 0,15 mg di P-BG per g DW alga).

- 5 Con lo scopo di determinare anche la termo-resistenza degli enzimi HC, gli estratti cellulari sono stati addizionati con PASC fresca ogni 24 ore per un tempo complessivo di quattro giorni. L'attività enzimatica è rimasta inalterata fino alla terza aggiunta di PASC, indicando che gli enzimi sono rimasti stabili fino al terzo giorno di reazione (Figura 7, pannello b).
- 10 In questi esperimenti, sono state utilizzate delle polveri di alghe HC-PTXD mix ottenute per liofilizzazione e che sono state poi conservate a temperatura ambiente per un mese prima del loro utilizzo. Sia la procedura di liofilizzazione che le condizioni di conservazione non hanno alterato la funzionalità degli enzimi indicando che il cloroplasto di *C. reinhardtii* è un efficace compartimento per la
- 15 conservazione degli enzimi cellulolitici con attività termostabile (Figura 7, pannello c).

Un'ulteriore analisi della specificità di substrato della HC-PTXD mix ha messo in evidenza che la miscela è attiva anche contro la cellulosa microcristallina, sebbene ad un livello minore (i.e. Avicell PH101).

- 20 La seguente tabella 2 riporta l'attività specifica della HC-PTXD mix verso i differenti substrati cellulolitici CMC 1% (w/v), cellulosa PASC 0,6% (w/v) e Avicell 2,5 % (w/v). L'attività enzimatica è espressa come Unità Enzimatiche ( $\mu\text{moli min}^{-1}$ ) per grammo (dw) di HC-PTXD mix ed è calcolata a pH 5.5 e 75°C.

25

Tabella 2

Unità	CMC	PASC	AVICELL
-------	-----	------	---------

enzimatiche gr <sup>-1</sup>			
HC-PTXD mix	16,1 ± 3,25	3,1 ± 0,21	0,6 ± 0,04

### BIBLIOGRAFIA

- 5 - Anitori RP (2012). *Extremophiles: microbiology and biotechnology*.  
Caister Academic Press.
- Badiei M, Asim N, Jahim JM, Sopian K (2014). *APCBEE Procedia* 9:170–  
174.
- Benedetti M, Verrascina I, Pontiggia D, et al (2018). *Plant J*.
- Blifernez-Klassen O, Klassen V, Doebbe A, et al (2012). *Nat. Commun.*  
10 3:1214.
- Bok JD, Yernool DA, Eveleigh DE (1998). *Appl Environ Microbiol*  
64:4774–4781.
- Brasil B dos SAF, de Siqueira FG, Salum TFC, et al. (2017). *Algal Res*  
25:76–89.
- 15 - Cannella D, Möllers KB, Frigaard NU, et al (2016). *Nat Commun* 7.
- Costas AMG, White AK, Metcalf WW (2001). *J Biol Chem* 276:17429–  
17436.
- Day A, Goldschmidt-Clermont M (2011). *Plant Biotechnol. J.* 9:540–553.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. (1956) *Anal Chem* 28:350–356.
- 20 - Faè M. et al. (2017) *ppl Microbiol Biotechnol* 101:4085-4092.
- Goldschmidt-Clermont M. (1991). *Nucleic Acids Res* 19:4083–4089.
- Harmsen PFH, Huijgen WJJ, Bermúdez López LM, Bakker RRC (2010)  
*Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for  
Lignocellulosic Biomass*. Ed: Wageningen UR, Food & Biobased  
25 Research. 1-54.
- Hu J, Arantes V, Saddler JN (2011) *Biotechnol Biofuels* 4:36.
- Jönsson LJ, Martín C. (2016). *Bioresour. Technol.* 199:103–112.

- Juge N. (2006). *Trends Plant Sci* 11:359–367.
- Kado Y, Inoue T, Ishikawa K (2011). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 67:1473–9.
- Kalunke RM, Tundo S, Benedetti M, et al (2015). *Front Plant Sci*.
- 5 - Kengen SWM, Luesink EJ, Stams AJM, Zehnder AJB (1993). *Eur J Biochem* 213:305–312.
- Kumar AK, Sharma S (2017). *Bioresour Bioprocess* 4:7.
- Lever M (1972). *Anal Biochem* 47:273–279.
- Li Y, Sun Z, Ge X, Zhang J (2016). *Biotechnol Biofuels* 9:20.
- 10 - Loera-Quezada MM, Leyva-González MA, López-Arredondo D, Herrera-Estrella L (2015). *Plant Sci* 231:124–130.
- Loera-Quezada MM, Leyva-González MA, Velázquez-Juárez G, et al (2016). *Plant Biotechnol J* 14:2066–2076.
- López-Arredondo DL, Herrera-Estrella L (2012) *Nat Biotechnol* 30:889–  
15 893.
- Mayfield SP, Manuell AL, Chen S, et al (2007). *Curr Opin Biotechnol* 18:126–133.
- Michelet L, Lefebvre-Legendre L, Burr SE, et al (2011) *Plant Biotechnol J* 9:565–574.
- 20 - Ooshima H, Sakata M, Harano Y (1986). *Biotechnol Bioeng* 28:1727–1734.
- Park JI, Kent MS, Datta S, et al (2011). *Bioresour Technol* 102:5988–5994.
- Patchett ML, Neal TL, Schofield LR, et al (1989). *Enzyme Microb Technol* 11:113–115.
- 25 - Peng X, Qiao W, Mi S, et al (2015). *Biotechnol Biofuels* 8:131
- Purton S (2007). *Adv. Exp. Med. Biol.* 616:34–45.
- Rasala BA, Lee PA, Shen Z, et al (2012). *PLoS One* 7:e43349.
- Rochaix JD, Surzycki R, Ramundo S (2014). *Methods Mol Biol*  
30 1132:413–424.



- Rodolfi L, Chini Zittelli G, Bassi N, et al (2009) *Biotechnol Bioeng* 102:100–112.
- Saini JK, Saini R, Tewari L (2015). *Biotech* 5:337–353.
- Sánchez C (2009). *Biotechnol Adv* 27:185–194.
- 5 - Sanderson K (2011). *Nature* 474:S12-4.
- Sarmiento F, Peralta R, Blamey JM (2015). *Front Bioeng Biotechnol* 3:148.
- Schroda M. (2006). *Curr Genet* 49:69–84.
- Souza T V., Araujo JN, Da Silva VM, et al (2016). *Biotechnol Reports* 9:1–8.
- 10 - York WS, Qin Q, Rose JK. (2004). *Proteins Proteomics* 1696:223–233.
- Zverlov V, Piotukh K, Dakhova O, et al. (1996). *Appl Microbiol Biotechnol* 45:245–247.

15

20

25

30

#### RIVENDICAZIONI

1. Combinazione di microalghe transgeniche in cui ciascuna microalga transgenica esprime una fosfito deidrogenasi D di origine batterica e un enzima degradativo della parete cellulare vegetale termostabile scelto dal gruppo che consiste in endoglucanasi B di *Thermotoga neapolitana* (SEQ ID NO:1), la porzione con attività cellobioidrolasica del cellulosoma CelB di *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (SEQ ID NO:3) la beta-glucosidasi di *Pyrococcus furiosus* (SEQ ID NO:5), e facoltativamente la xylanasi XynA di *Thermotoga neapolitana* (SEQ ID NO:7); in cui detta endoglucanasi B di *Thermotoga neapolitana* è codificata dalla sequenza nucleotidica con codon usage ottimizzato per l'espressione cloroplastica SEQ ID No: 2, detta porzione del cellulosoma CelB di *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* è codificata dalla sequenza nucleotidica con codon usage ottimizzato per l'espressione cloroplastica SEQ ID No: 4, detta beta-glucosidasi di *Pyrococcus furiosus* è codificata dalla sequenza nucleotidica con codon usage ottimizzato per l'espressione cloroplastica SEQ ID No: 6 e detta xylanasi XynA di *Thermotoga neapolitana* è codificata dalla sequenza nucleotidica con codon usage ottimizzato per l'espressione cloroplastica SEQ ID No: 8.
2. Combinazione di microalghe transgeniche secondo la rivendicazione 1, appartenenti alla specie *Chlamydomonas reinhardtii*.
3. Combinazione di microalghe transgeniche secondo ognuna delle rivendicazioni 1-2, in cui detta fosfito deidrogenasi D proviene da *Pseudomonas stutzeri* (SEQ ID NO:11) ed è codificata dalla sequenza nucleotidica SEQ ID NO: 12.
4. Combinazione di microalghe transgeniche secondo ognuna delle rivendicazioni 1-3, ulteriormente comprendente una microalga transgenica esprime una fosfito deidrogenasi D di origine batterica e una ligninasi scelta tra laccasi di *Thermus thermophilus* (SEQ ID NO:14) e polifenolo ossidasi di *Thermus thermophilus* (SEQ ID NO:16); in cui detta laccasi di

- Thermus thermophilus* è codificata dalla sequenza nucleotidica con codon usage ottimizzato per l'espressione cloroplastica SEQ ID No: 15, detta polifenolo ossidasi di *Thermus thermophilus* è codificata dalla sequenza nucleotidica con codon usage ottimizzato per l'espressione cloroplastica SEQ ID No: 17.
- 5
5. Uso di una combinazione di microalghe transgeniche secondo ognuna delle rivendicazioni 1-4, per la produzione di una miscela di enzimi degradativi della parete cellulare vegetale termostabili in un mezzo di coltura comprendente lo ione fosfito come unica fonte di fosforo.
- 10
6. Procedimento per la produzione di una miscela di enzimi degradativi della parete cellulare vegetale termostabili, comprendente le seguenti fasi:
- a) coltura di una combinazione di microalghe transgeniche secondo ognuna delle rivendicazioni 8-10 in un mezzo di coltura comprendente lo ione fosfito come unica fonte di fosforo in un fotobioreattore;
- 15
- b) liofilizzazione delle microalghe;
- c) estrazione degli enzimi alternativamente mediante sonicazione, breve trattamento termico a 80°C, condizioni non denaturanti o condizioni denaturanti.
- 20
7. Miscela di enzimi degradativi della parete cellulare vegetale termostabili ottenibili mediante il procedimento della rivendicazione 6, detta miscela essendo caratterizzata dal fatto di comprendere endoglucanasi B di *Thermotoga neapolitana* (SEQ ID NO:1), la porzione con attività cellobioidrolasica del cellulosoma CelB di *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (SEQ ID NO:3) la beta-glucosidasi di *Pyrococcus furiosus* (SEQ ID NO:5), e facoltativamente la xylanasi XynA di *Thermotoga neapolitana* (SEQ ID NO:7) e/o la ligninasi di *Thermus thermophilus* (SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:16) in un rapporto [g ceppo endoglucanasi B:g ceppo porzione cellobioidrolasica del cellulosoma CelB :g ceppo beta-glucosidasi] di 20:50:30.
- 25
- 30
8. Miscela di enzimi degradativi della parete cellulare vegetale termostabili secondo la rivendicazione 7, caratterizzata da un rapporto [g ceppo

endoglucanasi B : g ceppo porzione cellobioidrolasica del cellulosoma

CelB : g ceppo beta-glucosidasi : g ceppo xylanasi] di 20:40:20:20.

9. Miscela di enzimi degradativi della parete cellulare vegetale termostabili secondo ognuna delle rivendicazioni 7-8, in forma di polvere liofilizzata.
- 5 10. Uso della miscela di enzimi degradativi della parete cellulare vegetale termostabili secondo ognuna delle rivendicazioni 7-9, per la biodegradazione di substrati a base di cellulosa o di lignocellulosa.

10

15

5

TITOLO

“MICROALGHE TRANSGENICHE PER LA PRODUZIONE DI ENZIMI  
DEGRADATIVI DELLA PARETE CELLULARE AVENTI ATTIVITA'  
10 CELLULOSOLITICA TERMOSTABILE ”

-----

RIASSUNTO

La presente invenzione riguarda microalghe transgeniche per la produzione di  
enzimi degradativi della parete cellulare aventi attività cellulosolitica termostabile  
15 (HCWDE) e relativi usi nella biodegradazione di fonti di cellulosa o  
lignocellulosa in campo industriale.

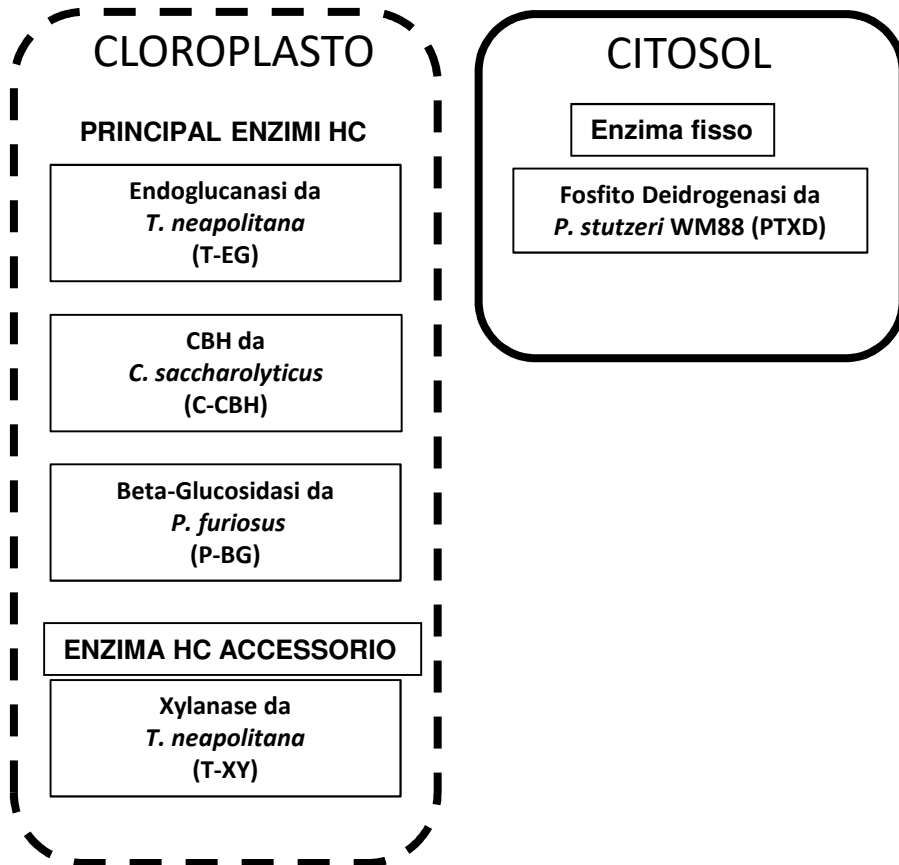
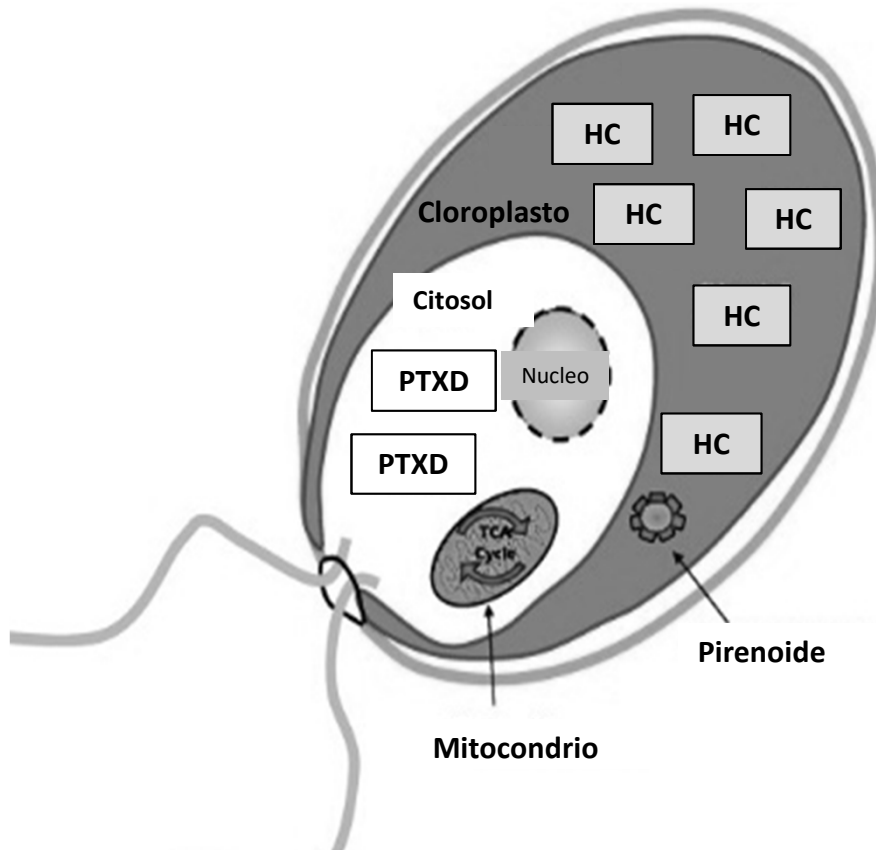
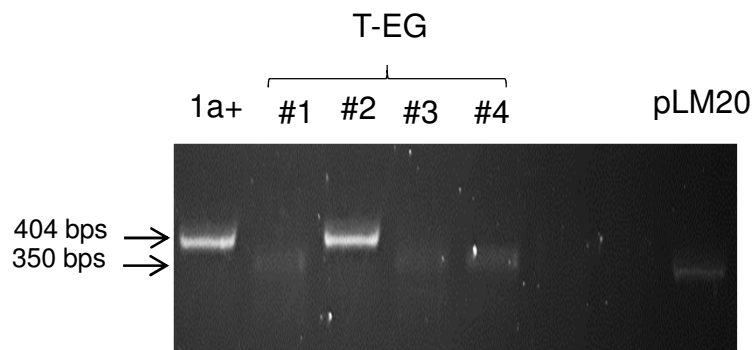


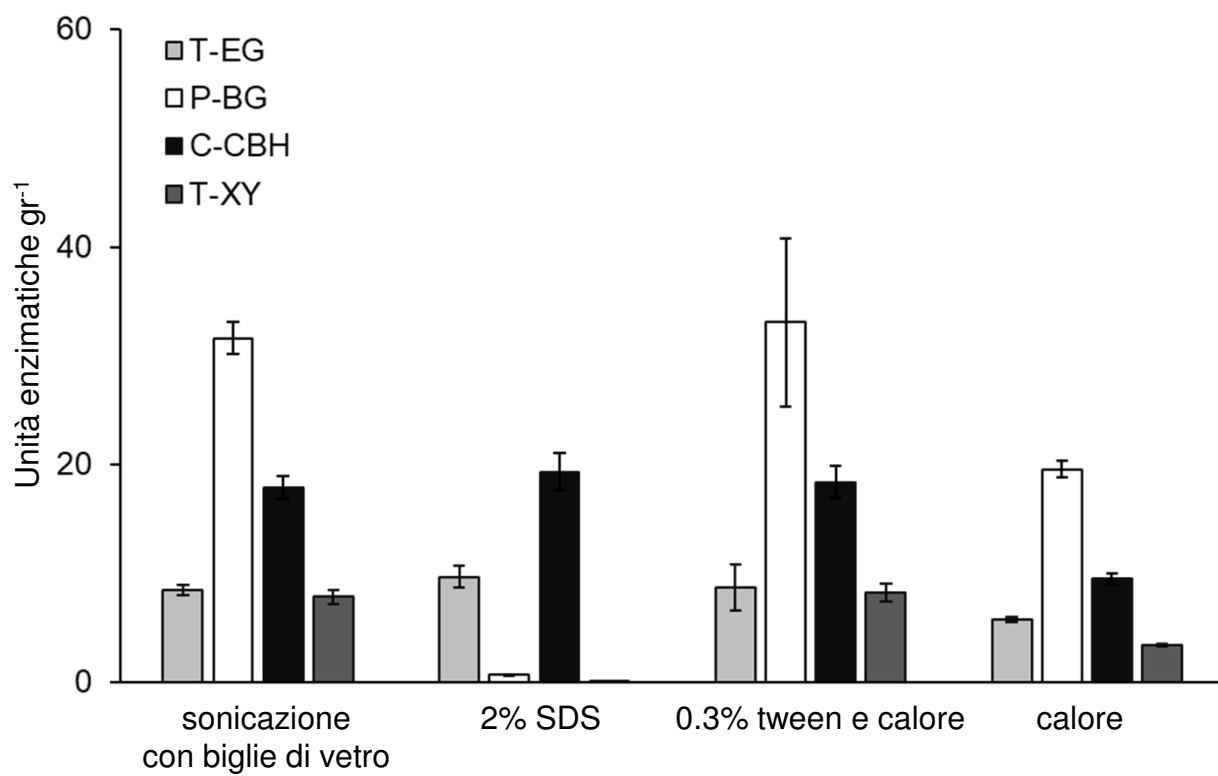
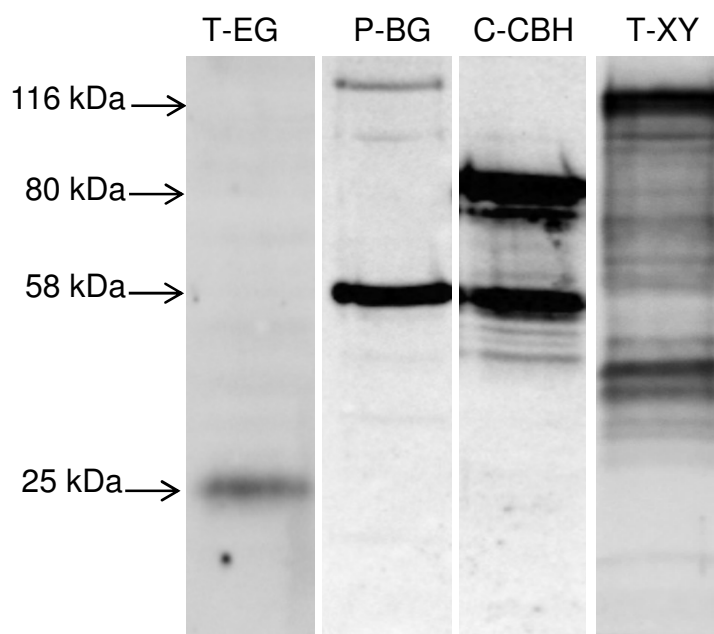
Fig. 1a



**Fig. 1b**



**Fig. 2**

**Fig. 3a****Fig. 3b**



a

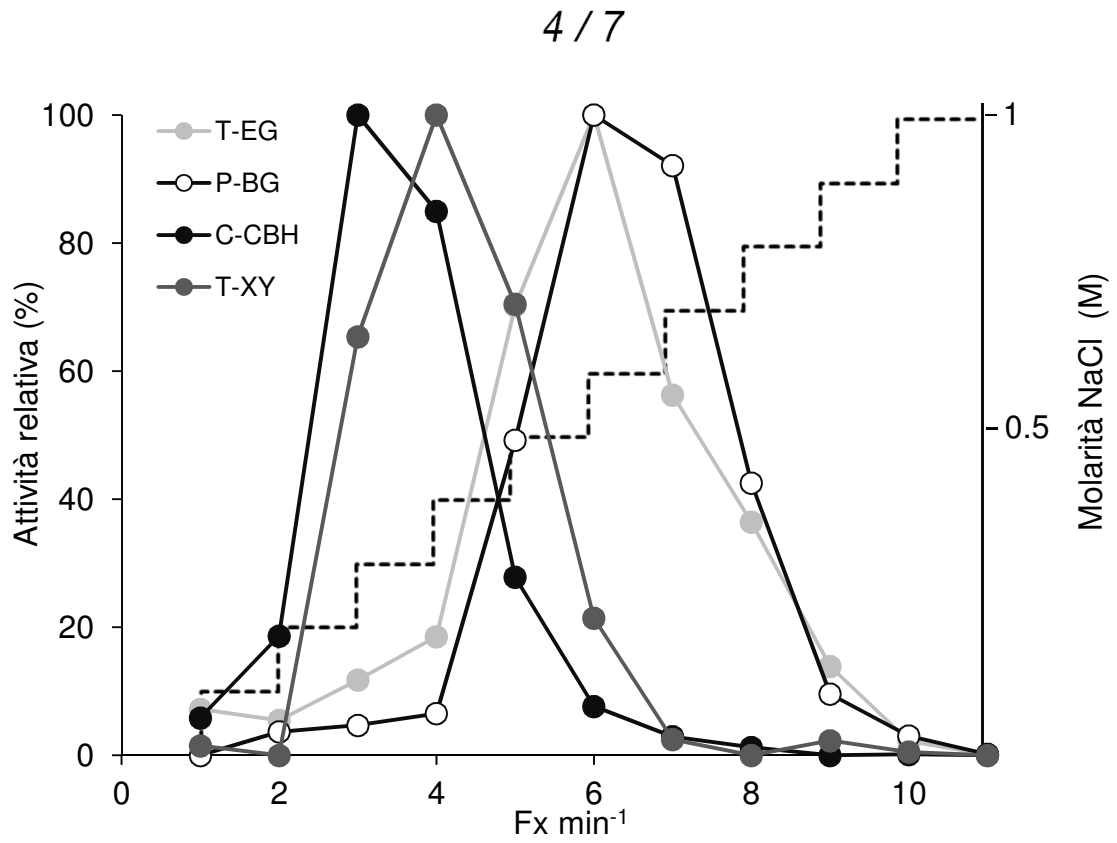


Fig. 4a

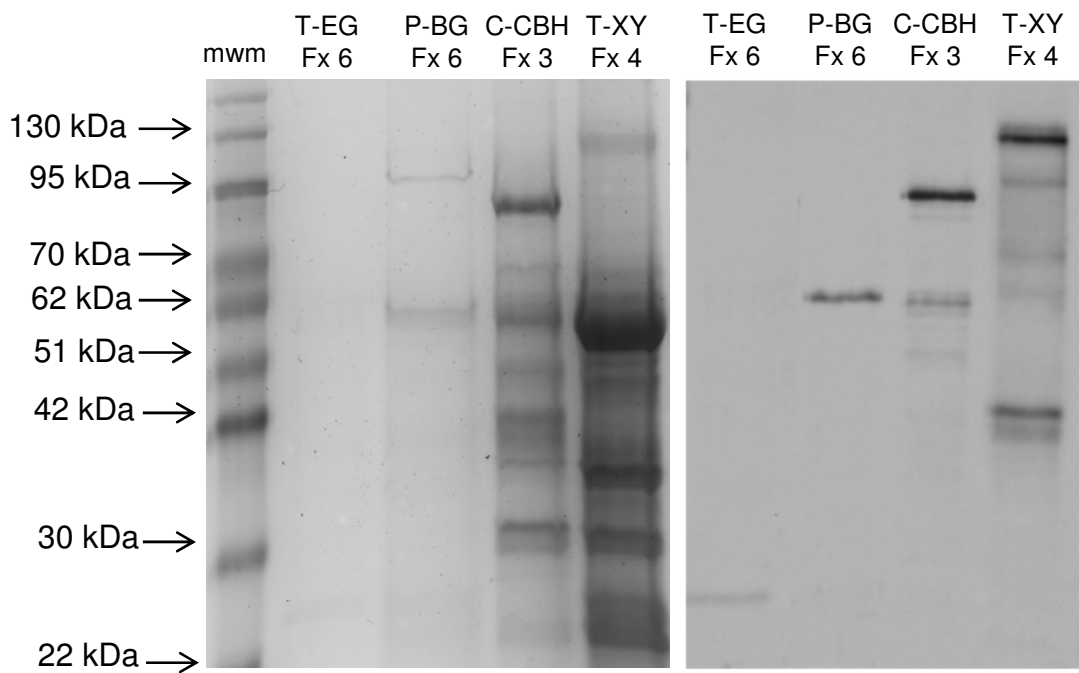
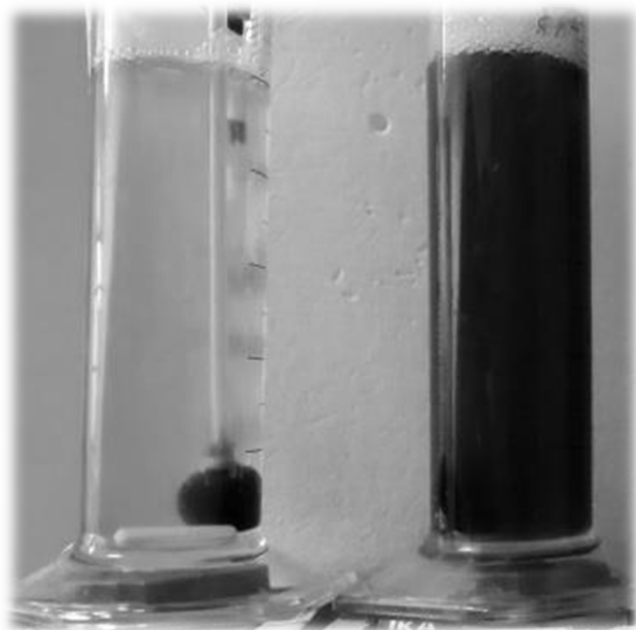


Fig. 4b



Ceppo HC

Ceppo HC-PTXD

**Fig. 5**

Fig. 6a

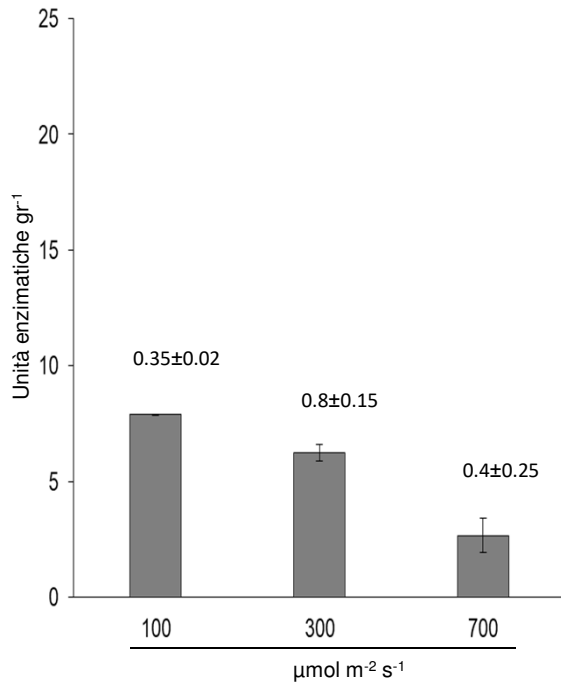


Fig. 6b

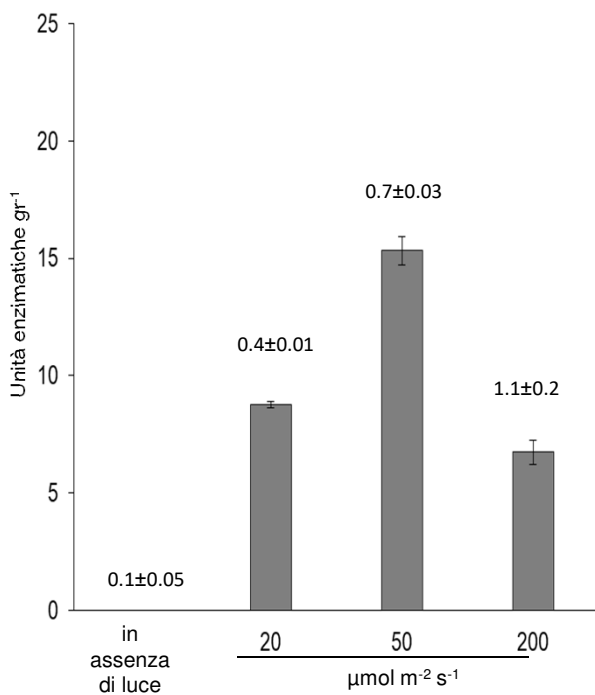
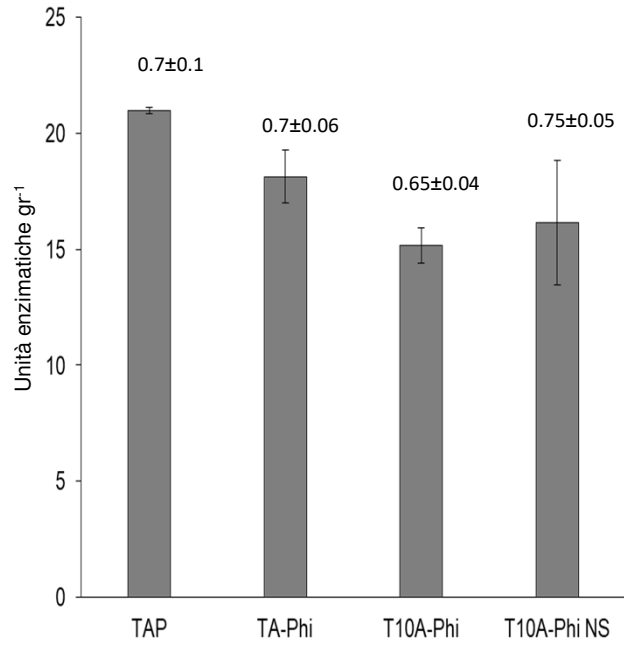


Fig. 6c

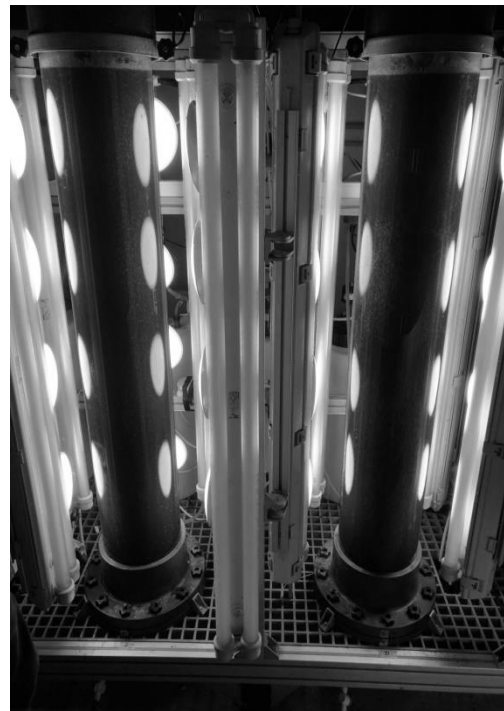


Fig. 6d

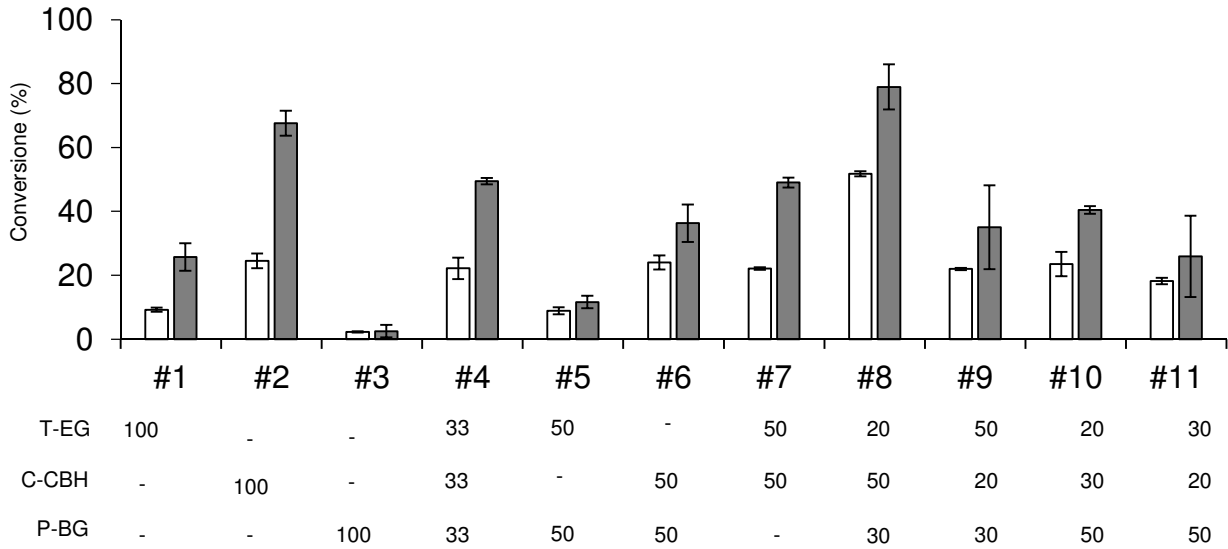


Fig. 7a

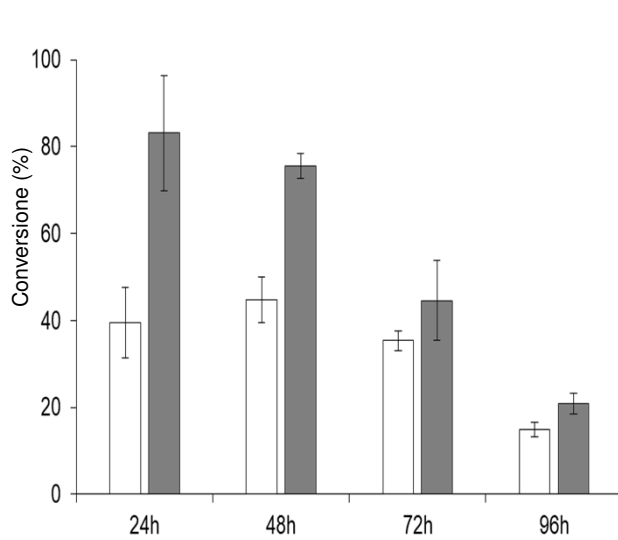


Fig. 7b

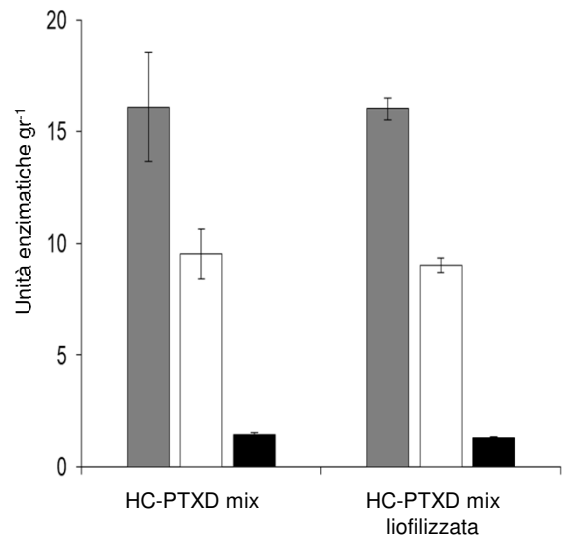


Fig. 7b