

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA  
Facoltà di Scienze MM. FF. NN.  
Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze  
Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Industriali XXIII ciclo



**Breaking phylogenetic barriers  
for fine and bulk chemical products  
in engineered  
*Saccharomyces cerevisiae***

Dott.ssa VERA CODAZZI  
Matr. 041073

Anno Accademico 2009-2010

Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Industriali  
XXXIII ciclo

**Breaking phylogenetic barriers  
for fine and bulk chemical products in  
engineered *Saccharomyces cerevisiae***

Dott.ssa VERA CODAZZI

TUTOR: Prof.ssa Paola Branduardi



Università degli Studi di Milano-Bicocca



Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze

Imagination is more important  
than knowledge

Albert Einstein



## Index

<b>Riassunto</b>	1
<b>Abstract</b>	7
<b>Introduction</b>	11
<b>Results</b>	17
Expression of the <i>Arabidopsis thaliana</i> lipocalin TIL in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and its effect on strain resistance to stresses	19
Results	22
Discussion	33
Materials and Methods	34
Expression of the <i>Bacillus subtilis</i> CP102A2 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
Results	41
Discussion	47
Materials and Methods	48
Development of a recombinant cell factory for Glucobrassicin production	51
Results	54
Materials and Methods	64
<b>Discussion</b>	71
<b>References</b>	75



## Riassunto

---





Le biotecnologie industriali permettono di ottenere sia *fine chemicals*, di interesse farmaceutico e alimentare, sia *bulk chemicals*, attraverso processi che risultano essere vantaggiosi sotto diversi punti di vista rispetto ai processi tradizionali.

Per molte di tali produzioni, anche se appartenenti a settori così lontani, il lievito *Saccharomyces cerevisiae* rappresenta uno tra i microrganismi eletti e soprattutto un buon punto di partenza per lo sviluppo di *cell factory* con capacità peculiari (Branduardi *et al.*, 2008, Porro and Branduardi, 2009).

Anche se può essere sfruttato in processi molto diversi, *S. cerevisiae* rappresenta la scelta d'elezione a livello industriale per la produzione di etanolo (Demain, 2009). La produzione di bioetanolo a partire da lievito, in particolare, sta acquistando sempre maggiore importanza, vista la crescente richiesta di carburanti derivati da fonti rinnovabili (Demain, 2009). L'interesse, in questo settore, è rivolto allo sviluppo di processi economicamente vantaggiosi a partire da substrati largamente disponibili quali biomasse lignocellulosiche che non hanno impiego a livello alimentare. Per quanto riguarda la produzione di bioetanolo di seconda generazione, che si inserisce nel progetto NEMO, appartenente al VII programma quadro (Novel high performance Enzymes and Micro-Organisms for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol), diventa indispensabile sviluppare microrganismi maggiormente tolleranti alle condizioni di processo, che comprendono pH acido, elevata temperatura, presenza di acidi organici e inibitori della crescita di natura diversa.

La membrana citoplasmatica ha un ruolo fondamentale, tra gli altri, nel garantire l'omeostasi cellulare e, essendo l'interfaccia tra la cellula e l'ambiente deve essere in grado di reagire ad eventuali modificazioni dell'ambiente circostante (Morel *et al.*, 2006). Per questo sembra rappresentare un ottimo target per lo sviluppo di ceppi più robusti.

Considerando che le piante, vivendo in ambienti confinati, sono costrette a reagire a numerosi cambiamenti per sopravvivere ci si è rivolti al regno vegetale, alla ricerca di geni in grado di rendere il lievito più robusto nelle condizione limite imposte dal processo.

Dopo ricerca bibliografica è stata individuata, nel genoma di *Arabidopsis thaliana*, una proteina potenzialmente interessante, denominata TIL, ovvero Temperature Induced Lipocalin.

Poiché in pianta ha effetti positivi in condizioni di stress TIL stata espressa in *S. cerevisiae* e si è poi valutato il comportamento del ceppo ingegnerizzato, rispetto ad un controllo, in risposta ad alcuni delle principali condizioni di stress imposte durante produzioni di tipo industriale. L'espressione di TIL aumenta, in particolare, la tolleranza di lievito agli stress determinati dall'aumento di temperatura e dalla presenza di agenti ossidativi e acidi organici. Nel ceppo ricombinante, più in dettaglio, in seguito a stress soprattutto di carattere ossidativi, si riscontra sia una minor produzione intracellulare di ROS, sia di specie elettrofile reattive derivate dalla frammentazione dei lipidi di membrana in seguito alla loro per ossidazione.

Ancora in ambito industriale, nel settore dei *bulk chemicals* stanno acquistando un'importanza sempre crescente i biopolimeri. Gli acidi organici, derivati da oli vegetali, si sono rivelati interessanti sotto questo punto di vista, essendo in grado di conferire caratteristiche biodegradabili ai polimeri di sintesi cui danno luogo, ma devono essere in qualche modificati per diventare monomeri multifunzionali per la polimerizzazione. In particolare, devono essere bifunzionali, ossia dotati di due gruppi chimicamente reattivi possibilmente alle estremità opposte della molecola. Per modifiche di questo tipo risultano interessanti le reazioni catalizzate da citocromi di origine batterica, particolarmente promettenti dal punto di vista tecnico essendo per la maggior parte solubili e caratterizzati da elevate velocità di reazione e stabilità relativamente alta. In particolare, in alcuni batteri del genere *Bacillus* sono stati individuati CYP autosufficienti dal punto di vista catalitico essendo costituiti da un'unica catena polipeptidica che deriva da una fusione naturale di un dominio N-terminale eme-ossigenasico legato ad un dominio reduttasico C-terminale. A tal proposito, il citocromo CYP102A2 di *Bacillus subtilis* è stato espresso in *S. cerevisiae*.

L'attività dell'enzima espresso è stata valutata *in vitro* mediante un saggio di tipo spettrofotometrico in grado di monitorare l'ossidazione del NADPH, in concomitanza alla trasformazione dei substrati d'interesse.

Tale indagine ha mostrato che il CYP eterologo risulta attivo nei confronti di acidi grassi a media, ma soprattutto a breve catena carboniosa, ma poiché tale citocromo è in grado di catalizzare reazioni di tipo diverso, utilizzando sempre il NADPH (idrossilazioni, ossidazioni ed epoossidazioni, ad esempio), resta da verificare quale sia l'effettiva trasformazione subita dai substrati d'interesse.

Considerando che i citocromi, in generale, sono in grado di catalizzare reazioni peculiari su una gamma di substrati molto vari e hanno un elevato impatto dal punto di vista biotecnologico, il fatto che possano essere attivamente espressi in un organismo ospite, quale *S. cerevisiae*, apre la strada allo sviluppo di processi sostenibili e alternativi alla sintesi chimica classica.

Visti i risultati positivi ottenuti, si è deciso di sfruttare maggiormente il potenziale di *Saccharomyces cerevisiae* come *cell factory*, per l'espressione di un intero *pathway* biosintetico.

Il lievito, nel dettaglio, è stato ingegnerizzato per la produzione di un composto potenzialmente nutraceutico, la glucobrassicina, indicata come potenziale agente chemoprotettore.

Nonostante siano stati messi a punto e sperimentati interventi a livello sia biochimico-metabolico che nutrizionale-metabolico per incrementare i livelli di produzione si è scelto come produttore il ceppo in cui la via biosintetica è stata integrata nel genoma ed è diventato oggetto di una domanda di brevetto [*Mauro Magnani, E. Bartolucci, Danilo Porro, Paola Branduardi, Vera Codazzi, Umberto Benatti, Gianluca Damonte, Giovanni Schippa e Stefano Bianchini Sviluppo di una cell factory ricombinante per la produzione di Glucobrassicina*].

Analisi specifiche sui vari intermedi di biosintesi e i loro accumuli, condotte recentemente, hanno permesso l'individuazione dei passaggi su cui focalizzare i futuri interventi per incrementare la produzione di glucobrassicina.

Riassunto

## Abstract

---



Industrial biotechnologies allow today to obtain both fine and bulk chemicals and yeasts as cell factories can produce many products belonging to both field (Branduardi *et al.*, 2008, Porro and Branduardi, 2009). Among yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* still represents the microorganism of election to develop such cell factories. As regard bioethanol production, yeasts utilization is well established for its natural fermentation ability, but new generation biofuels require the development of strain more and more robust, able to face conditions imposed by the process that should be as cheaper and more profitable as possible. In this direction, processes that use lignocellulosic feedstock for bioethanol production (the so called second generation biofuels) are still in development (NEMO project-Novel high performance Enzymes and Micro-Organisms for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol, seventh framework program). Among the many different functions, cell cytoplasmic membrane plays a key role in cell homeostasis and is deeply involved in facing and reacting to stressing conditions, so it can represent a good target for direct improvements of laboratory as well as industrial strains. Fishing in *Arabidopsis thaliana* genome, a potentially interesting gene was found, codifying for a Temperature Induced Lipocalin, named TIL. As it has positive effects in plants in unfavourable situations (Charron *et al.*, 2008), TIL was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and the recombinant strains compared with the parental counterpart under some of the stresses typical of industrial processes. The recombinant yeasts show an increased tolerance towards heat shock and to the presence of hydrogen peroxide and organic acids.

In detail TIL expressing strain generate lower levels of ROS and accumulate less amounts of reactive electrophile species generated after membrane lipids fragmentation.

Another industrial field that is gaining more and more importance is represented by bioplastics not coming from petrochemical sources. Vegetable oils derived fatty acids are interesting as bulk compounds for the synthesis of biopolymers, even if they have to be previously modified to possess two chemically reactive groups at molecules extremities. High catalytic activity and stability together with high versatility in reaction of bacteria cytochromes answered to this need.

The heterologous expressed *B. subtilis* cytochrome CYP102A2 in *S. cerevisiae* has some activity, measured based on NADPH consumption, towards fatty acids of different chain length, interestingly also towards short chain fatty acids, but, as CYP is able to catalyze different types of reaction involving NADPH consumption (hydroxylation, oxidation and epoxidation as example), the products will be further characterized to understand what kind of modifications are carried out on the tested substrates. Considering the valuable reactions that cytochromes P450 are able to catalyze on a vast variety of substrates (fatty acids, steroids and a multitude of non natural compounds such as drugs, organic solvents and hydrocarbon products), their successful expression in yeast could open the possibility to develop sustainable processes in alternative to classical chemical synthesis.

As nice and positive results *S. cerevisiae* potential of cell factory was deeper exploited for the expression of a whole plant biosynthetic pathway. In detail yeast was engineered to express the pathway leading to the formation of glucobrassicin, a nutraceutical indicated as a potential cancer chemoprotective agent. In this work we describe the construction of a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* able to produce glucobrassicin. Despite some investigation about possible strain optimization through the employment of multicopy plasmids the final producer will exploit only integrative vectors and the described findings and the process of production were deposited as patent application [*Mauro Magnani, E. Bartolucci, Danilo Porro, Paola Branduardi, Vera Codazzi, Umberto Benatti, Gianluca Damonte, Giovanni Schippa e Stefano Bianchini Sviluppo di una cell factory ricombinante per la produzione di Glucobrassicina*]. Specific analysis on biosynthetic intermediates suggest steps on which focusing the attention to further improve the glucobrassicin production levels.



## Introduction

---



Industrial biotechnologies allow today to obtain both fine chemicals, of pharmaceutical and nutritional interest, and bulk chemicals, mainly utilised as commodities, through processes that can ensure advantages compared to traditional ones.

To mention few, insulin, interferons, erythropoietin, hepatitis B vaccine, vitamin B 12, among fine chemicals (Ferrer et al., 2009) and biofuels (bio ethanol, biobutanol, biodiesel) and bioplastics among the bulk ones (Demain, 2009).

In this perspective yeasts as cell factories can produce many products belonging either to fine as well as to bulk chemicals (Branduardi *et al.*, 2008, Porro and Branduardi, 2009), covering a wide range of very different applications. Among yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* represents the microorganism of election to develop cell factories with peculiar abilities. This is mainly due to a long history of domestication, to a deep knowledge of its genome, the availability of tools for manipulation and finally for its natural robustness.

Even if *S. cerevisiae* can be exploited in several different processes, ethanol production however is likely to remain the foremost biotechnological yeast-derived commodity for many years to come (Demain, 2009). In particular, bioethanol production can make a significant contribution towards securing the long-term supply of renewable fuels. Cost-effective bioethanol production depends on, among other factors, the use of cheaper substrates, as for example renewable feedstocks such as non-food lignocellulosic biomass (Demain, 2009). The processes that use lignocellulosic feedstock for bioethanol production (the so called second generation biofuels) are still in the development phase. In this scenery, one of the objective of the NEMO project (Novel high performance Enzymes and Micro-Organisms for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol, seventh framework program) for the production of second generation bioethanol, is the development of yeast strain resistant to multiple stresses imposed by the process such as high temperature, high ethanol concentration and the presence of different growth inhibitors, among which organic acids.

Among the many different functions, cell cytoplasmic membrane plays a key role in cell homeostasis and, as delineating the interface between the cell and the environment, it thus plays a crucial role in many essential functions such as cell nutrition among which we can

find also the response to environmental modifications. is deeply involved in facing and reacting to stressing conditions (Morel *et al.*, 2006). For survival and successful growth, the microbial cell must maintain an intact plasma membrane, with its appropriate structures and properties and they might be able to change the properties of their plasma membrane in relation to the prevailing environmental physicochemical characteristics (Russell *et al.*, 1995). Because many of the industrial processes of production turn to determine highly stressful condition to the cell factory, the plasma membrane can represent a good target for direct improvements of laboratory as well as industrial strains. Looking for an interesting genes/metabolite to this purpose we addressed to plants kingdom since, living in a confined habitat during most of their life, plants frequently experience conditions different from their optimal range. In *Arabidopsis thaliana* genome we found a potentially interesting gene that codify for a Temperature Induced Lipocalin, named TIL. One of the most interesting features is that TIL expression is induced by high and low temperature and that, during oxidative stress, it may bind and scavenge peroxidated lipids, and thus help restore membrane integrity (Charron *et al.*, 2008). Effects of TIL expression in *Saccharomyces cerevisiae* would be analyzed, comparing the recombinant strains with the parental counterpart under different stress conditions, that comprise heat shock, freezing, exposure to oxidative agents, organic acids, ethanol and dehydration.

Another industrial field that is gaining more and more importance is represented by biopolymers. Because of their special characteristics and broad biotechnological applications, bioplastics are capturing the attention of researches that are aimed to develop alternative strategies to produced plastics that do not come from petrochemical sources (Montgomery, 2004).

Also in this area there is an increasing need to develop materials based on renewable resources and vegetable oil seems very attractive to this purpose. Oils, extracted from seeds or fruits, are essentially made up of tri-acyl glycerols which can be used as monomers for the synthesis of biopolymers. To that purpose they should be transformed in bi-functional monomers, that is to say with two different reactive groups at molecule extremities. The most

desirable modification is the introduction of a second carboxylic function with a reaction called  $\omega$ -oxygenation. As in nature *Candida* species are able to catalyze this kind of reaction, but their use is patent protected (WO 00/20566) and, depending on the specie, not easy to manipulate, *S. cerevisiae* exploitation will be an alternative of interest as it can be engineered to acquire the capacity to modify substrates of interest. To that purpose bacteria seems to represent the most attracting alternative to fish the desired catalytic property because of their huge varieties of metabolisms and enzymatic activities. Bacterial cytochrome, in particular, show an interesting potential from a technical point of view, since they are mostly soluble enzyme with high catalytic activity and stability. The *Bacillus subtilis* cytochrome CYP102A2 would be expressed in yeast cells in order to obtain an engineered *S. cerevisiae* able to directly modify monocarboxylic acids of interest to obtain the bulk compounds for the polymerization.

Last, it should underline that, as hinted at the beginning, *S. cerevisiae* could be used also as a cell factory for the production of fine chemicals. Among these, phytochemicals are reaching a privileged position. Phytochemicals, also referred as functional foods, are generally natural plant compounds that, by virtue of physiologically active components, provide a health benefit beyond basic nutrition. Recognised candidates as potentially health promoting compounds and ones which are currently under investigation in many research projects, include organosulphur compounds from *Brassica* species, namely glucosinolates and their degradation products (Moreno *et al.* 2006).

Glucobrassicin, the indolic-glucosinolate (as its synthesis starts from Tryptophan) is one of the less abundant, but can elicit distinct pharmacological effects (Hayes *et al.* 2008).

As plants generally produce a mix of these compounds and their extraction results quite difficult and poorly efficient, *S. cerevisiae* would be used as cell factory to produce more glucobrassicin and in a cheaper way than its extraction from natural sources. Because these secondary metabolites are specifically produced by plants, yeast would be metabolically engineered for the expression of a whole plant biosynthetic pathway, which comprises, among other, two cytochrome catalyzed reactions. In general, this study would show that *S.cerevisiae* is well suited as a host for

glucobrassicin production, made object of a patent [*Mauro Magnani, E. Bartolucci, Danilo Porro, Paola Branduardi, Vera Codazzi, Umberto Benatti, Gianluca Damonte, Giovanni Schippa e Stefano Bianchini Sviluppo di una cell factory ricombinante per la produzione di Glucobrassicina*].

## Results

---





## **Expression of the *Arabidopsis thaliana* lipocalin TIL in *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on strain resistance to stresses**

Among the many different functions, cell cytoplasmic membrane plays a key role in cell homeostasis and is deeply involved in facing and reacting to stressing conditions. Because many of the industrial processes of production turn to determine highly stressful condition to the cell factory, the plasma membrane can represent a good target for direct improvements of laboratory as well as industrial strains.

Plants kingdom is a still highly uninvestigated source for fishing interesting genes/metabolite to this purpose.

The *Arabidopsis thaliana* Temperature Induced Lipocalin, named *TIL*, seemed to be one of these potentially interesting genes.

Lipocalins are an ancient and functionally diverse family of mostly extracellular proteins found in bacteria, protocists, plants, arthropods and chordates (Charron *et al.*, 2005). Members of this family share low amino acid sequence identity but they show a simple tertiary structure. Classification of lipocalins is based on two conserved features: the presence of structurally conserved regions (SCRs) in the primary structure and the ligand-binding site.

The structural diversity of cavity and scaffold gave rise to a variety of different binding specificities, each capable of accommodating ligands of different size, shape and chemical character (Flower *et al.*, 2000).

They can bind a remarkable array of small hydrophobic molecules; the list of potential ligands is constantly growing and includes fatty acids, steroids, retinoids, pheromones and odorants. Lipocalins were early established as transport proteins, but it is becoming increasingly clear that some of them may be implicated in many other important functions such as modulation of cell growth and metabolism, binding of cell surface receptors, membrane biogenesis and repair and induction of apoptosis (Akerstrom *et al.*, 2000; Charron *et al.*, 2002).

Considering the wide distribution of lipocalins, a particular attention has been focused on plant genome for stress-regulated lipocalin-like proteins search. Analyses revealed that plants

possess, among other, proteins that can be classified as Temperature Induced Lipocalins; the first true plant lipocalins have been identified, some years ago, from wheat (*Triticum aestivum*) and *A. thaliana* (Charron *et al.*, 2002) .

Here we focus, in detail, on the only TIL found in *A. thaliana*.

In plant this protein is localized at the plasma membrane, but it does not possess an N-terminal signal peptide. Localization analyses suggests that TIL could be targeted to the membrane via an hydrophobic loop (supported by the fact that it can be extracted with urea, which interferes with hydrophobic interactions) (Charron *et al.*, 2005).

One of the most interesting feature is that *TIL* genes are induced by high and low temperature and their level of expression is associated with the plant's capacity to develop freezing tolerance (Charron *et al.*, 2008).

Plants deleted for *TIL* gene are more sensitive to freezing, to sudden and prolonged exposure to the light and to paraquat and they accumulate ROS more than the wild type (Charron *et al.*, 2008; Chi *et al.*, 2009). On the contrary, when *TIL* is overexpressed plants have a longer vegetative phase, are more resistant to sudden temperature changes and to paraquat exposure and they accumulate ROS less than the wild type (Chi *et al.*, 2009).

As the expression of this lipocalin seems linked to conditions that cause membrane stresses, its biological role in membrane biogenesis and repair through sterol transport into the membrane was firstly suggested.

However, as TIL levels increase under both heat and cold stress conditions (Charron *et al.*, 2008), which apparently require opposite adjustment in membrane fluidity, it seems unlikely that the protein plays a role in modifying the physical state of membrane.

It is believed that TIL may be involved in diminishing common detrimental factors produced under both high and low temperature stresses; heat shock as well as chilling have, in fact, been shown to increase the level of reactive oxygen species and lipid peroxidation in plants (Chi *et al.*, 2009). So the hypothesis that, during oxidative stress, lipocalins may bind and scavenge

peroxidated lipids, and thus help restore membrane integrity (Charron *et al.*, 2008), seems more reasonable.

During the bio-ethanol, and industrial in general, production process yeast has to face with a complex and stressful environment. The development of robust strain that could be more resistant to environmental stresses such as, for example, high ethanol, temperature shock, oxidative pressure and presence of inhibitors like organic acids becomes more and more important. As it has positive effects in plants in unfavourable situations, in this work TIL was expressed in *Saccharomyces cerevisiae*.

The recombinant strains are compared with the parental counterpart under different stress conditions, that comprise heat shock, freezing, exposure to oxidative agents, organic acids, ethanol and dehydration, and examined with different type of analyses. The results on the effect of TIL expression in the CEN.PK background, a laboratory strain, are here reported, even if preliminary data have been collected also using as a background the industrial ethanologenic strain Ethanol Red.

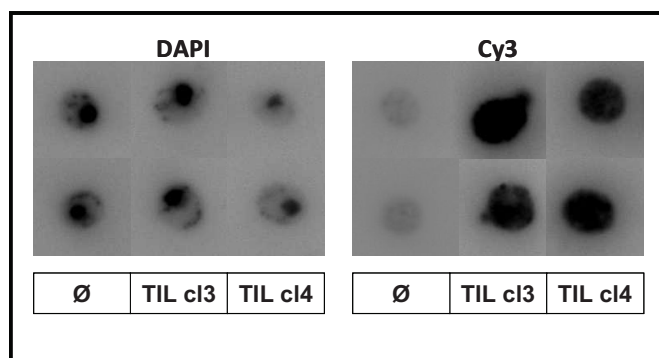
Remarkably, TIL expression renders yeast more tolerant to most of the limitation imposed, in particular to heat, oxidative, acidic and heat stress. Considering the relevance of these parameters in many and different industrial processes of production, the engineered strains can be of potential interest for further optimization and following applications.

## Results

*TIL* coding sequence, functionally fused with a detectable HA tag, was cloned into the integrative vectors pYX012 and pYX022Kan, being this last suitable for the expression into the industrial strain. Starting from these plasmids, new strains overexpressing the gene were constructed. *TIL* coding sequence integration was firstly evaluated by pcr analysis (data not shown).

### TIL localization in yeast

TIL expression could not be measured with any assays and its mechanism of action has not still been understood; as there are no examples of its expression in yeast, we firstly examined its subcellular localization (Fig. 1).



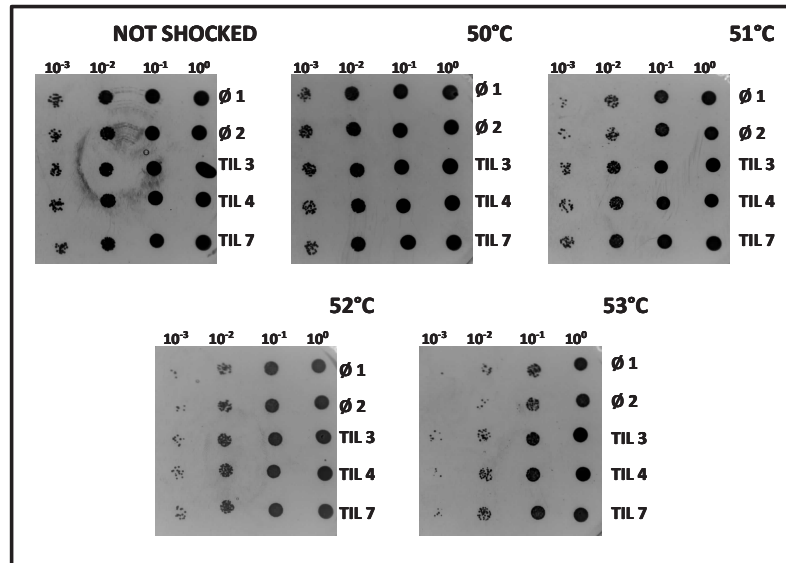
**Figure 1. TIL localization in yeast cells**

Localization was analyzed by immunofluorescence microscopy. Cover slips were incubated with an anti-HA monoclonal antibody (Sigma-Aldrich) and then with a secondary antibody Cy3-conjugated (panel on the right). DAPI staining of nuclear DNA (panel on the left).

The results confirm that the TIL::HA fusion protein is expressed in yeast cells and, as the fluorescence is visible throughout the cell, it appears to localize mainly as a (soluble) cytoplasmic protein. From the images acquired it is not possible to exclude an additional plasma membrane localization.

### Heat shock response and thermotolerance

Transformed and control cells were spotted on agar plates after a heat shock, at increasing temperature for a fixed period of time (Fig. 2).

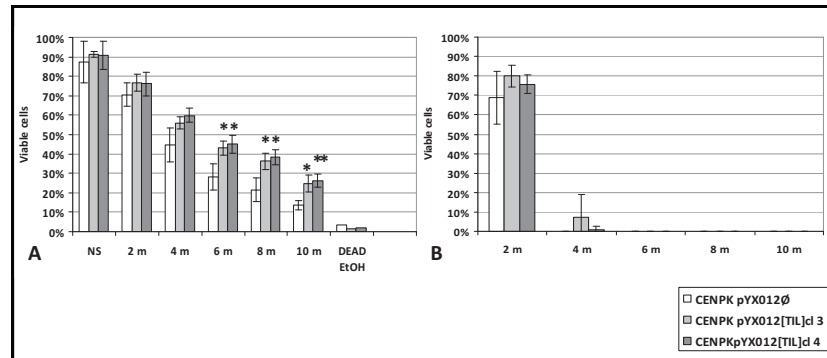


**Figure 2. Spots test after heat shock**

Growth of TIL expressing (3 independent clones named as TIL3, TIL4 and TIL 7) and control cells (empty vector, 2 independent clones indicated as Ø1 and Ø2) after 8 minutes of incubation at increasing temperature. Aliquots (5 µl) of serial dilutions (indicated at the top) are spotted on agar plates prepared with selective permissive medium and looked after 48 hours at 30°C.

While the treatment at 50°C seems not to result in growth differences if compared to the not treated samples, starting from 51°C TIL expression seems to give some advantages to the yeast. Said advantage, even if not dramatic, becomes increasingly clear with the temperature shock increase: the stronger difference between transformed and control strains appears after heat shock at 53°C. This test gave a first qualitative indication on the potential effect of TIL expression. To further characterize the differences, the temperature of 53°C was chosen to stress the cells for different period of time.

The different behaviour was evaluated through flow cytometric analyses and Colony Forming Unit (Fig. 3), in order to quantify the results.

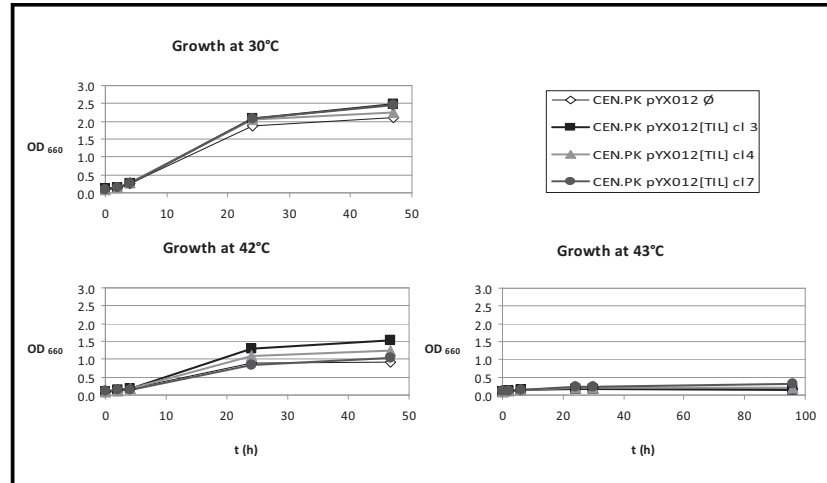


**Figure 3. Viable cells after incubation at 53°C for increasing period**

Effects of heat shock at 53°C for indicated incubation time are measured as percentage of viable cells (flow cytometric analyses, cells have been stained with propidium iodide, A) and as percentage of CFU (comparing shocked and not shocked cells, B). Values shown are the means of at least three experiments. Data significant in relation to the control are indicated with \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  (T test).

Flow cytometric analyses show that, for any stress exposure time analysed, TIL expressing yeasts show an higher viability compared to the control and these differences are more significant at longer time. Analyses on Colony Forming Units confirm this trend, but only for the shortest period of time, as at increasing time no growth could be detected.

Low viability on plates could be explained as we consider that heat shock causes severe damages at different levels, compromising cells ability to duplicate. To monitor if cells could duplicate at higher temperature we also evaluated the effect of a persistent heat shock following growth at temperature higher than 30°C, in detail 42°C and 43°C (Fig.4).



**Figure 4. Cellular growth at different temperature**

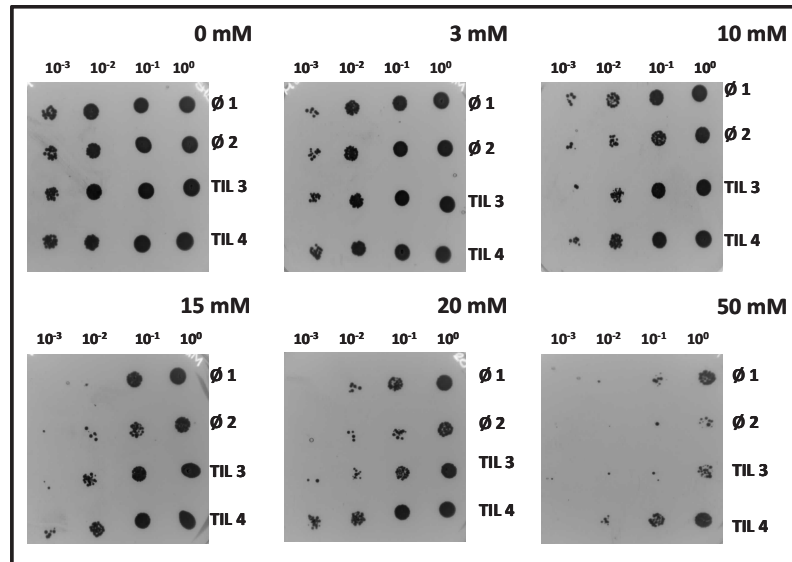
Cellular growth measured as  $OD_{660nm}$  of TIL expressing yeast (3 independent clones) compared to the control (transformed with the empty vector). Initial OD was 0.1 and cells are grown in selected permissive medium.

While at 30°C there are no differences in growth, at 42°C it's possible to appreciate a little difference between TIL expressing yeast and the control, but the difference disappears at higher temperature. Despite still far from possible real industrial applications, this is a nice result, considering that the sole expression of a plant gene in single copy could improve cellular growth at temperature higher than the optimal.

#### Resistance to oxidative stress

In literature it is suggested that *AtTIL* accumulation is associated with an increased freezing tolerance because it plays a role in protecting plants against the oxidative stress induced by chilling. They hypothesize that, during oxidative stress, lipocalins may bind and scavenge peroxidated lipids, thus helping to restore membrane integrity (Charron *et al.*, 2008). Preliminary data on response to freezing shock showed some advantages in survival of TIL expressing yeast (data not shown) and to further analyze if TIL action in yeast might be correlated to protection against oxidative stress, hydrogen peroxide was primarily used to study the effects of this type of stress. Once more, a first panel of

qualitative evaluation was performed through spots test on agar plates after imposing the stressing agent for a limited period of time ( 30 minutes in this case, Fig. 5).

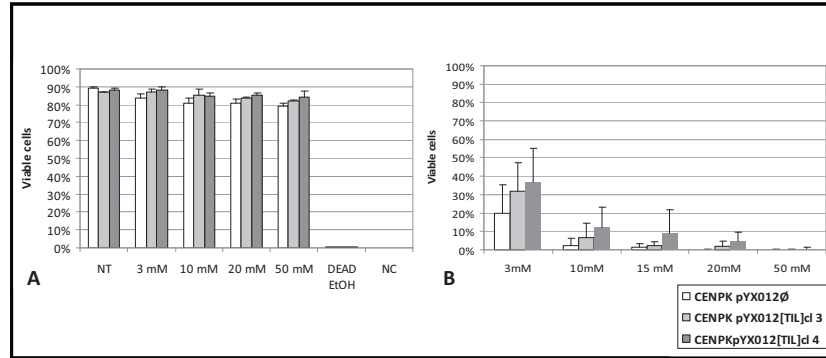


**Figure 5. Spots test after oxidative shock**

Growth of TIL expressing cells (2 independent clones named TIL3 and TIL4) and control cells (empty vector, 2 independent clones indicated as Ø1 and Ø2) after incubation for 30 minutes at 30°C (160 rpm) with increasing amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (from 0 to 50mM). Aliquots (5 µl) of serial dilutions (indicated at the top) are spotted on agar plates prepared with selective permissive medium and looked after 48 hours at 30°C.

Oxidative stress caused by 3mM hydrogen peroxide does not lead to growth differences if compared to the not treated samples, but, while the amount of the stressor increases, TIL expressing yeasts perform better. The different behaviour was further characterized through Colony Forming Unit and flow cytometric analyses (Fig. 6), in order to quantify the results.





**Figure 6. Viable cells after oxidative shock**

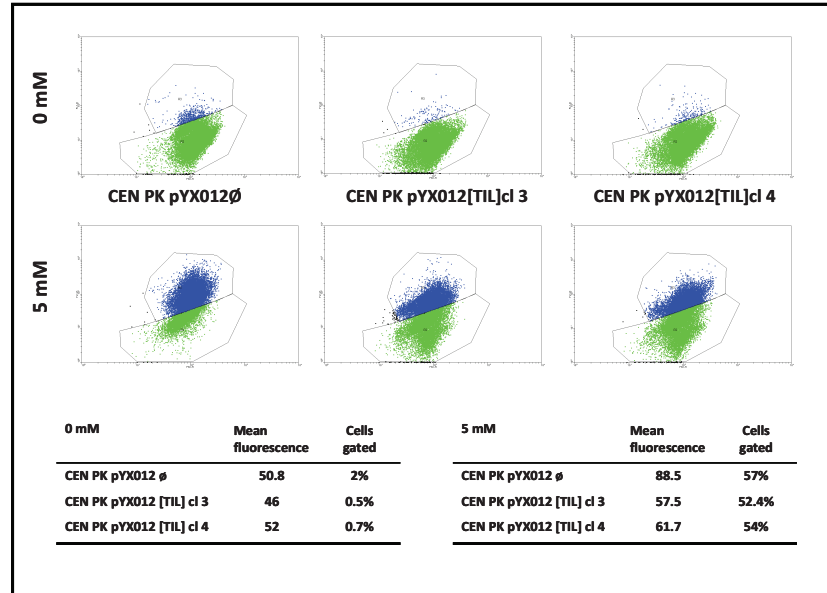
Effects of incubation at 30°C for 30 minutes with increasing amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are measured as percentage of viable cells (in flow cytometric analyses cells have been stained with propidium iodide, A) and as percentage of CFU (comparing shocked and not shocked cells, B). Values shown are the means of different experiments. Data significant in relation to the control are indicated with \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 (T test).

In flow cytometric analyses TIL expressing yeast viability is higher than in the control strain, confirming the trend seen with spots test. Here, however, value of the viability is quite high in every samples, rendering the differences less significant. Data of Colony Forming Units are in line with previous results showing a little advantage in growth of TIL expressing strain, that in this case become less evident while increasing hydrogen peroxide amount.

With the information collected up to now it is quite difficult to explain why cells with high viability analyzed at the flow cytometer fail to duplicate on agar plates.

In addition to cell viability, intracellular ROS content at single cell level was measured.

Each sample was stained with Dihydrorhodamine123 (Madeo et al., 1999) and then shocked with hydrogen peroxide 5mM. This amount of the stressor was chosen as, allowing to see some differences between recombinant and parental strains, does not completely inhibit cellular growth, cells in fact have to be metabolically active to produce ROS. Samples were analyzed with a flow cytometer and the resulting dot plots are compared in Figure 7.



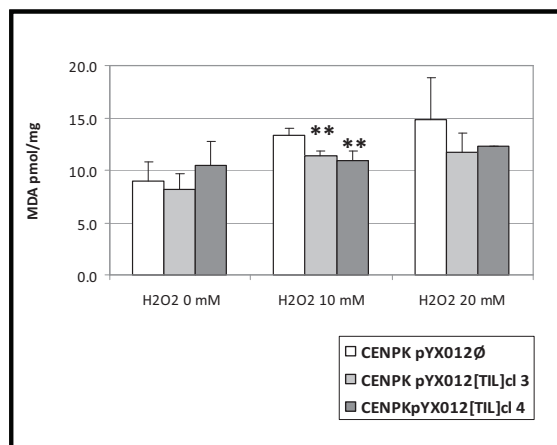
**Figure 7. Intracellular ROS content previous and after oxidative shock**

Events with high DHR123 fluorescence, corresponding to cells accumulating ROS, are gated in blue colour, while cells autofluorescence of not shocked cells in green. Control and recombinant strains are compared prior (upper panels) and after (lower panels) the shock with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5mM. X axes: forward scatter; Y axes: log scale of FL1 dihydrorodamine 123 (DHR123) fluorescence.

On the dot plots each individual cell is represented by a single dot and it is quite easy to recognize at least two distinct yeast subpopulations. Higher DHR signal (blue colour) is linked to higher intracellular ROS content. Graphs clearly show that the oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> influences the intracellular ROS content, but in TIL expressing strains a strongly decrease in ROS content compared to the parental have been registered.

These data suggest that TIL expression could improve yeast resistance to oxidative stress.

As in plant TIL seems to enhance resistance to oxidative stress acting as scavenger of lipid peroxidation intermediates (Levesque *et al.*, 2009), MalonDiAldehyde analyses (MDA analyses, ThioBARbituric - TBARS - assay, see Materials and Methods) has been carried out on yeast cells after the oxidative shock (Fig.8).



**Figure 8. Lipid peroxidation after oxidative shock**

Malondialdehyde (MDA) content on cell extracts after shock for 1 hour at 30°C, 160 rpm, with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10mM and 20mM. Lipid peroxidation is expressed as pmol MDA and referred to fresh weight. Values shown are the means of at least three experiments. Data significant in relation to the control are indicated with \*\*P < 0.01 (T test).

TBARS assay allows to measure the malondialdehyde content and, as MDA is one of the reactive electrophile species that generates from peroxidated membrane lipids, its content increases after oxidative shock and gives an estimation of the state of peroxidated lipids.

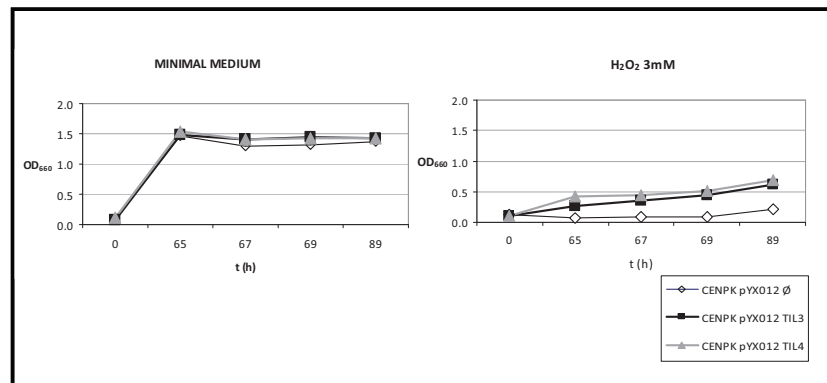
The graphs show that the MDA content is clearly influenced by the oxidative shock and it is significantly lower in the TIL expressing yeasts at the concentration of 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. These results indicate that TIL expression seems to alleviate lipid peroxidation after an oxidative shock.

Intracellular ROS and MDA results, taken together, suggest that TIL protects cells from oxidative damage, scavenging the intracellular production of ROS and/or peroxidated lipids.

From an industrial point of view such a stress could arise at a certain point and then remain throughout the process, so TIL expression effects have been evaluated also in the case of a persistent presence of the oxidative stress.

TIL expressing strains are compared in growth in the presence of limiting concentration of hydrogen peroxide. Cells, tested under

laboratory conditions, were inoculated at an initial optical density (660 nm) of 0.1 in the presence of different concentrations of  $H_2O_2$  (ranging from 2.5 to 3.5 mM). The growth was measured as optical density at specific intervals of time (Fig.9). Yeast cells were also inoculated in the same medium but without  $H_2O_2$  addition, as a control.



**Figure 9. Cellular growth in the presence of oxidative stress**

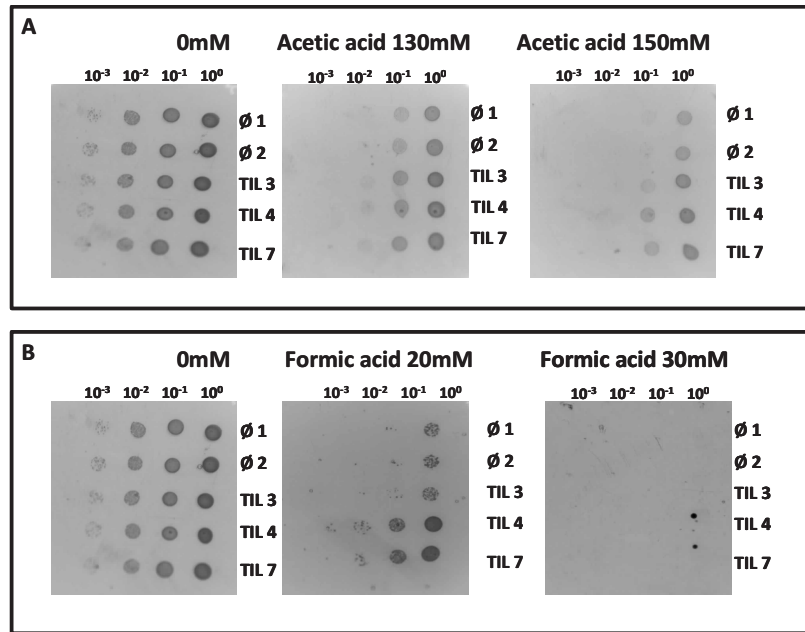
Cellular growth measured as  $OD_{660nm}$  of TIL expressing yeast (2 independent clones) compared to the control (transformed with the empty vector) in minimal medium added or not with hydrogen peroxide 3mM. Initial OD was 0.1.

In the absence of  $H_2O_2$  no differences among wild type and recombinant strains appeared. When  $H_2O_2$  was added the growth of control strains resulted negatively influenced in proportion to the hydrogen peroxide concentration, while the recombinant ones were able to resume growth earlier. When the oxidative stress is persistent TIL expression lead to an enhanced strain robustness and an increased tolerance to the stress imposed.

#### Resistance to organic acids

To test if this improved strain robustness towards oxidative stress could be extended to other environmental constraints that trigger to such intracellular damages, wild type and engineered strains were subjected to acidic stress caused by organic acids. In particular, we tested effects of acetic and formic acids, that are the strongest cell

growth inhibitory compounds found in the substrates used for the production of second generation bioethanol production. Preliminary qualitative data are referred to spots test (Fig. 10)



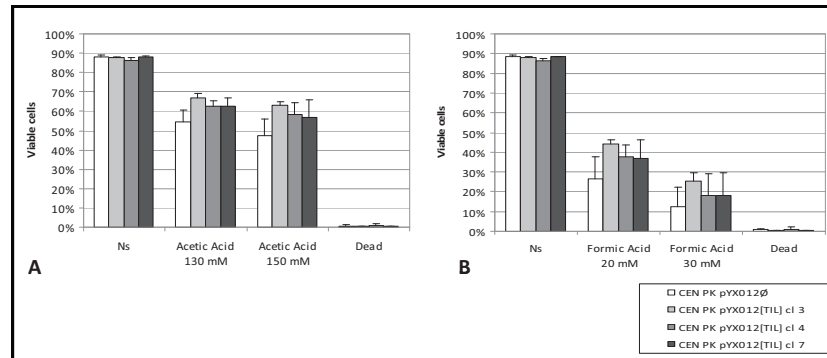
**Figure 10. Spots test after organic acids shock**

Growth of TIL expressing (3 independent clones named as TIL3, TIL4 and TIL7) and control cells (empty vector, 2 independent clones indicated as Ø1 and Ø2) after 1 hours of incubation at 30°C (160 rpm) with increasing amount of acetic acid (panel A) and Formic acid (panel B). Aliquots (5 µl) of serial dilutions (indicated at the top) are spotted on agar plates prepared with selective permissive medium and looked after 48 hours at 30°C.

Yeast growth is negatively influenced after the shock with both acetic and formic acid. Formic acid is more toxic than acetic one, as its inhibitory effects on cellular growth are already visible when present in low amounts.

After shock with acetic acid 150mM TIL expressing yeast growth results improved if compared to the control strain; same increased performances were seen after the shock with formic acid 20 mM.

Once more, to further characterize the different behaviour a first quantitative indication was carried out through Colony Forming Unit (data not shown) and flow cytometric analyses (Fig. 11)



**Figure 11. Viable cells after organic acids shock**

Effects of incubation at 30°C for 1 hours with increasing amount of Acetic acid (A) and Formic acid (B) are measured as percentage of viable cells (flow cytometric analyses, cells have been stained with propidium iodide, A) Values shown are the means of different experiments. Data significant in relation to the control are indicated with \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 (T test).

Flow cytometric analyses confirmed the trend showed by spots test results. It is possible to observe that TIL expression gave some advantages. The registered differences does not seem to have statistical significance, but this could probably be reached collecting more data. In this case also Colony Forming Units count (data not shown) goes exactly in the same direction.

Organic acids, acetic in particular, is known to trigger an oxidative stress increasing ROS intracellular content (Ludovico *et al.* 2001, 2002). TIL expressing yeast were so compared to the control when acids are present throughout the growth. The growth of TIL expressing strains was compared in the presence of Acetic acid 60mM and Formic acid 10mM; they were inoculated at an initial optical density (660 nm) of 0.1 and their growth was measured at specific intervals of time (data not shown). In both cases growth was delayed, but in the conditions tested up to now we could not see appreciable differences between TIL expressing and control strain.

## Discussion

We report for the first time the expression of a plant Temperature Induced Lipocalin in *S. cerevisiae*; it seems to be expressed as a soluble protein and mainly accumulate in the cytoplasm. Furthermore we proved that TIL expression increases yeast resistance to some of the stresses that can be encountered during industrial processes.

In particular, the recombinant yeasts show an increased tolerance towards heat shock and to the presence of hydrogen peroxide and organic acids.

In detail, TIL expressing strain generate lower levels of ROS and accumulate less amounts of reactive electrophile species generated after membrane lipids fragmentation (Pamplona, 2008). It could be hypothesize that TIL might act as a scavenger of lipid peroxidation intermediates (as indicated for *AtCHL* Levesque *et al.*, 2009). As this kind of damages can be induced also by other type of stress also freezing, dehydration (Charron *et al.*, 2008) and ethanol presence (Stanley *et al.*, 2009) will be further investigated to confirm preliminary data collected. Moreover, the effects of TIL expression in an industrial yeast strain (Ethanol Red) is currently under investigation.

## Materials and Methods

### Recombinant and genetic techniques

DNA manipulation was carried out according to standard techniques (Sambrook and Russell).

Table1	Primers used in the study
Name	Sequence (5' → 3')
TIL_5	CACTGAATTCATGACAGAGAAGAAAGAGAT
TIL_3	AGTG <u>CCCGGG</u> TTTGCCGAAGAGAGATTT

TIL1 gene was pcr amplified from the *A. thaliana* cDNA library using the oligonucleotide primers TIL\_5 and TIL\_3 (table 1). Primers were designed to allow the expression in frame with the HA-tag at the C-terminal, provided by the vector.

Amplification was obtained by using the Polymerase Pwo DNA (Roche). The annealing temperature was 58°C and the elongation time was 45 seconds. The obtained DNA fragment was sub-cloned into the shuttle plasmid vector pSTBlue-1, using the Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen) and subsequently sequenced to verify the correct amplification. The TIL gene fragment *EcoRI-XmaI* cut, was subcloned into the integrative yeast expression vectors pYX012 and pYX022Kan cut with the same enzymes.

### Yeast strains and growth conditions

*S. cerevisiae* strains used are listed in Table 2.

Table 2	Yeast strains used in this study
Strain	Relevant genotype
CEN PK 102-5B	<i>MATa, ura3-52, his3-11, leu2-3/112, TRP1, MAL2-8c, SUC2</i>

Yeast cultures were grown either in rich or in minimal medium.

Synthetic minimal medium contains 0.67% YNB (Yeast Nitrogen Base - DIFCO), 2% (w/v) glucose added with Uracil and the required aminoacids at 50mg/L.

Media for plates were solidified by the addition of 2% (w/v) agar.



Cultivation in liquid media was performed in shake flasks using 1/5 of total flask volume. Cultures were incubated at 30°C under agitation at 160 r.p.m. while plates were incubated at 30°C for 2 or 3 days. Cell density of liquid culture was determined spectrophotometrically at 660 nm.

#### **Yeast transformation and determination of plasmid stability**

Yeast transformation was performed using the Lithium Acetate/ssDNA method as described by Gietz and Wood (2002).

For yeast transformation, the integrative plasmids [pYX012TIL1] and the empty pYX012 were linearized in the *Pst*I site.

After the transformation PCR have been carried out to control the effective integration of the gene.

#### **TIL localization: microscopic immunofluorescence.**

Yeast cells, exponentially growing, were fixed on coverslips and immunostained as detailed previously (Schulte et al., 1995) using monospecific Anti-HA (Sigma-Aldrich) antibodies and Cy3-conjugated secondary anti-mouse antibodies (Jackson ImmunoResearch).

Nuclear DNA was stained with 0.04 ng/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). Immunofluorescence was performed on a Nikon Eclipse 90i fluorescence microscope. Images were taken using the software Metamorph 2.2

#### **Heat shock and thermotolerance**

The recombinant and the control strains were grown under the same conditions, in minimal synthetic medium.

Cells in early stationary phase were diluted to reach a value of 1 OD<sub>660</sub> and sampled for the required analyses.

Each sample was then shocked at a different temperature for a fixed period or time, or at a fixed temperature for different periods of time using a thermomixer (Eppendorf). They were chilled in ice and then analyzed.

In the case of growth at not optimal temperatures yeast cells were inoculated at an initial optical density of 0.1 (always 660 nm where not differently specified) and grown respectively at 30°C, 42°C and 43°C. Optical density was measured at specific intervals of time. Each experiment was repeated at least three times.

**Oxidative stress treatment**

The recombinant and the control strains were grown under the same conditions, in minimal synthetic medium.

Cells in early stationary phase were diluted into hydrogen peroxide, at the desired concentration, to have a value of 1 OD<sub>660</sub>. Each sample was shocked for 30 minutes at 30°C (160 rpm), washed twice with deionized water and then analyzed.

In the case of growth under oxidative stress condition was imposed by adding different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (specifically 2, 2.5, 3 and 3.5 mM). Yeast cells were inoculated at an initial optical density of 0.1 (always 660 nm where not differently specified) and then optical density was measured at specific intervals of time. Each experiment was repeated at least three times.

**Organic Acids treatment**

The recombinant and the control strains were grown under the same conditions, in minimal synthetic medium.

Cells in early stationary phase were diluted into a solution of organic acids at the desired concentration, to have a value of 1 OD<sub>660</sub>. Each sample was shocked for 1 hours at 30°C (160 rpm), washed twice with deionized water and then analyzed.

In the case of growth under oxidative stress condition was imposed by adding different concentrations of acetic acid (specifically 60 mM) and formic acid (specifically 10 mM). Yeast cells were inoculated at an initial optical density of 0.1 (always 660 nm where not differently specified) and then optical density was measured at specific intervals of time. Each experiment was repeated at least three times.

**Viability tests****Yeast CFU determination**

After being shocked cells are counted (it is possible to correlate OD<sub>660nm</sub> with cell number) and serially diluted in order to plate about 500 yeast cells. Plates are put at (optimal) growth temperature and then the colonies have been counted.

Viability can be expressed as a percentage of colony forming units of the sample shocked compared with not shocked one.

**Staining yeast cells with propidium iodide (PI) for live/dead distribution**

After being shocked each sample of cell suspension is centrifuged (5 min at 6000-8000 rpm;  $1 \times 10^7$  cells are enough for every sample) and washed twice in PBS. Cells are then resuspended in propidium iodide solution 0.46 mM for the identification of dead or severely compromised cells.

Samples were then analyzed using a Cell Lab Quanta™ SC flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) equipped with a diode laser (excitation wavelength 488 nm, laser power 22 mW). The fluorescence emission was measured through a 670 nm long pass filter (FL3 parameter) for PI signal. The sample flow rate during analysis did not exceed 600–700 cells/s. A total of 20,000 cells was measured for each sample. Data analysis was performed afterwards with WinMDI 2.8 software, build#13 01-19-2000 (Purdue University, Cytometry Laboratories [<http://facs.scripps.edu/software.html>]).

**ROS content analyses**

Reactive oxygen species (ROS) were detected by Dihydrorhodamine 123 as described in (Madeo *et al.*, 1999). Cells were incubated with Dihydrorhodamine 123 (DHR 123, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for 2 h, washed twice with PBS buffer and subsequently shocked with hydrogen peroxide.

Samples were then analyzed using a Cell Lab Quanta™ SC flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) equipped with a diode laser (excitation wavelength 488 nm, laser power 22 mW). The fluorescence emission was measured through a 525–550 nm band pass filter (FL1 parameter) for DHR signal. The sample flow rate during analysis did not exceed 600–700 cells/s. A total of 20,000 cells was measured for each sample. Data analysis was performed afterwards with WinMDI 2.8 software, build#13 01-19-2000 (Purdue University, Cytometry Laboratories [<http://facs.scripps.edu/software.html>]).

**Analyses of MDA, TBARS assay**

TBARS was estimated as in (Steels *et al.*, 1994). After the shock cells were pelleted, washed twice with deionized water and then mechanically disrupted with Fast Prep (Savant) for six periods of 20 s

each with an equal volume of glass beads (0-5 mm diameter) in Tris 0,1 M pH 7,8 buffer solution.

Extracts were centrifuged at 10000 rpm for 15 min and 500µl of supernatant was mixed with 1 ml of TBARS solution (TCA 15%; Thiobarbituric Acid 0,375% (w/v); HCl 0,25 N). The reaction mixture was incubated in a boiling waterbath for 1 hour and, after cooling, the  $A_{532}$  was measured. The content of malondialdehyde was calculated using a MDA calibration curve and expressed as pmol malondialdehyde per mg of fresh weight.

## **Expression of the *Bacillus subtilis* cytochrome CYP102A2 in *Saccharomyces cerevisiae* and its preliminary characterization**

In modern times, in the bulk chemicals field, biopolymers are gaining more and more importance, being more eco-compatible than traditional plastics. The European consumption of plastics, as example, is expected to reach 2-4 million tonnes by the year 2020 (Crank *et al.*, 2005) and today, plastics are almost completely derived from petrochemicals, produced from fossil oil and gas (Hopewell *et al.* 2009).

Researches are aimed to develop alternative strategies to produced plastics that do not come from petrochemical sources; so the challenge now is to use polymers of natural origin or to modify natural polymers that can be degraded from micro organisms with or without the aid of chemical, physical or mechanical actions.

Biodegradable polymers (BDPs) may be produced from natural origins (plants, animals or micro-organisms) such as polysaccharides (e.g. starch, cellulose, lignin and chitin), proteins (e.g. gelatine, casein, wheat gluten, silk and wool) and lipids (e.g. plant oils and animal fats), as well as certain polyesters either produced by micro-organism/ plant (e.g. polyhydroxyalkanoates and poly-3-hydroxybutyrate) or synthesized from bio-derived monomers (e.g. polylactic acid (PLA)).

Biodegradable plastics, therefore, often comprise polymer blends that contain partly renewable carbon derived from biomass and partly petrochemical carbon (Song *et al.*, 2009).

In this scenery it is possible to include polyesters derived from the condensation of natural monomers, in particular those derived from vegetal oils, which are a great renewable resource. These oils, extracted from plant seeds or flowers (sunflower, rape, soya or olive, as example) are mainly composed by tri-acyl glycerols and appear suitable for many industrial applications such as plastics production.

These organic acids can be used as monomers for the synthesis of biopolymers, but they should be transformed in bi-functional monomers, that is to say with two different reactive groups at molecule extremities.

Among these monomers, azelaic acid (a 9 carbon bi-carboxylic acid) plays an important role, being mainly deriving from oleic acid (18C) treatments; unfortunately, from oleic acid only one molecule of azelaic acid is formed, while the other half of carbon atoms gives a simple mono-carboxyl acid, named pelargonic acid. The bi-functionalization of pelargonic acid is highly desirable, and even more desirable would be a sustainable strategy to obtain this goal.

The most studied and exploited microorganism able to catalyze monocarboxylic acid  $\omega$ -oxidation is *Candida tropicalis*, but it is pathogenic and has a particular codon bias that limits modification at molecular level. It has been indicated that the enzymatic activity responsible for this transformation is a cytochrome (Eshenfeldt *et al.*, 2003).

Fatty acid hydroxylase CYP102A1 (also referred as P450 BM3) of *Bacillus megaterium*, characterized by the highest catalytic activity known for a P450 monooxygenases (De Mot and Parret, 2002), is also able to catalyze hydroxylation or epoxydation of long-chain saturated, unsaturated or branched fatty acids (C12-C22) preferentially at the sub-terminal positions ( $\omega$ -1,  $\omega$ -2 and  $\omega$ -3 positions). However, it is not described to have any activity towards fatty acids with a chain length of less than 12 carbon atoms, except for *p*-nitrophenoxycarboxylic acids with a chain length of 10 or 11C (10-pNCA or 11-pNCA) (Chefson and Auclair, 2006).

This cytochrome is quite peculiar as it is the result of a natural fusion between an N-terminus catalytic heme-domain together with a reductase C-terminal domain.

After a genome analysis of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, eight candidate genes which potentially code for P450 monooxygenases were found (Lentz *et al.*, 2004). Two of these genes, *CYP102A2* and *CYP102A3*, code for single-peptide monooxygenases, comprising both a heme and a FAD/FMN-containing reductase domain, and demonstrate a notable sequence similarity to *CYP102A1*.

As the use of yeast as a host for overexpression and preparation of functional cytochromes is well established and transformed yeast are easy to grow and do not require special equipment, in this work we describe the attempt to develop a sustainable process that use an engineered *S. cerevisiae* to directly modify pelargonic acid in order to obtain the bi-functional monomer.

## Results

For this type of process we chose the *S. cerevisiae* background BY4741 strain for the availability of the corresponding deleted strain in the gene *pox1*. This gene codifies for the first enzyme involved in fatty acid  $\beta$ -oxidation. In the mutant their utilization as carbon source is blocked, rendering fatty acids available for the desired transformation.

### Palargonic acid effects on yeast growth

Prior to modify the strain for the heterologous expression of the bacterial cytochrome, we tried to define what kind of effect would have the pelargonic acid on cells viability.

Industrial byproducts Fatty acids are very cheap, but also characterized by a very low bioavailability and previous data underlined their toxicity. It seems, in fact, that fatty acids, like pelargonic, could act on cell membrane, altering their structure and blocking some transmembrane enzyme (Hunkova *et al.*, 2004).

Firstly we analyzed effects on growth carried out in minimal glucose medium added with pelargonic acid at different concentrations. As BY4741 and the corresponding deleted strain showed exactly the same behaviour, here only data referred to the BY4741 are reported (Fig. 1).

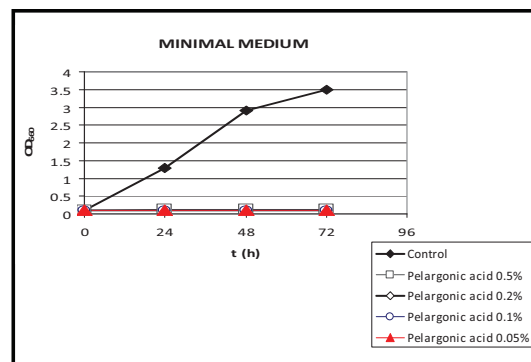
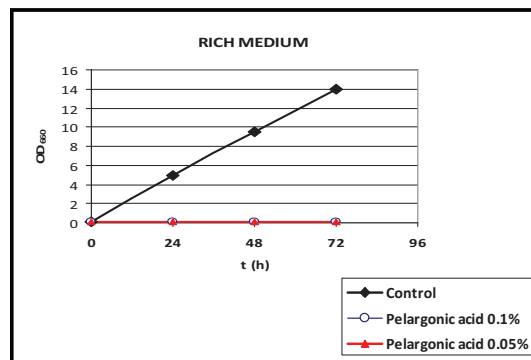


Figure 1. Cellular growth in the presence of pelargonic acid

Cellular growth measured as  $OD_{660nm}$  of BY 4741 in minimal glucose medium in the presence of different amounts of pelargonic acid, compared to the same strain grown without the addition of the acid. Initial OD was 0.1.

Pelargonic acid does not allow cellular growth at any concentration tested.

The experiment was repeated adding the fatty acid in complete rich medium (Fig.2).



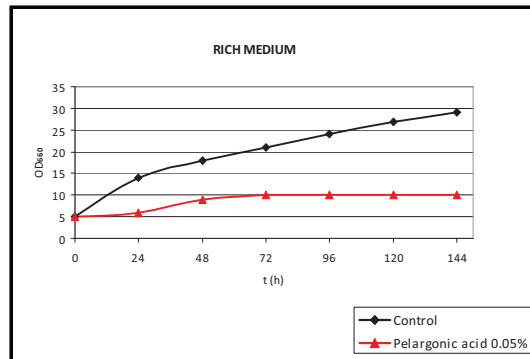
**Figure 2. Cellular growth in the presence of pelargonic acid**

Cellular growth measured as  $OD_{660nm}$  of BY 4741 in complete glucose rich medium in the presence of different amounts of pelargonic acid, compared to the same strain grown without acid. Initial OD was 0.1.

Despite rich medium is more permissive, the addition of pelargonic acid does not allow the yeast growth.

To test the inoculum effect, the experiment was repeated increasing the initial OD from 0.1 to 5 (Fig. 3).



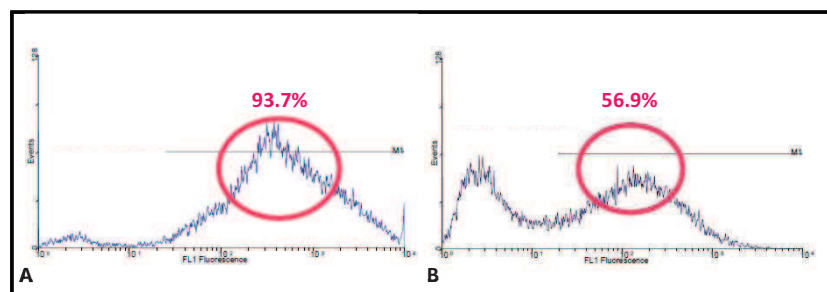


**Figure 3. Cellular growth in the presence of pelargonic acid**

Cellular growth measured as OD<sub>660nm</sub> of BY 4741 in complete rich medium in the presence of pelargonic acid, compared to the same strain grown without acid. Initial OD was 5.

It seems that after a single cell division the cellular growth is stopped. Nevertheless, what the growth curves cannot tell is if the cells are just inhibited in cell division or if they are dead.

To further understand what kind of effect could pelargonic acid elicit, cells viability was analyzed through the flow cytometer (Fig. 4).



**Figure 4. Viability measurement of cells grown for 24 hours with and without pelargonic acid**

Bar chart of fluorescence distribution linked to viable cells. Cells have been stained with fluoresceine diacetate after 24 hours of growth in complete glucose rich medium (A) added with Pelargonic acid 0.05% (B). Percentages shown refers to viable cells.

Fluorescence distribution showed that a considerable portion of cells is still alive after being in contact with the pelargonic acid for 24

hours. This suggests that pelargonic acid harms cells growth but it does not kill them all at least for 24 hours.

Despite we can only argue about the metabolic capability of cells that keep alive even in the presence of pelargonic acid, this result suggests the possibility to develop a two-step process (separated growth and biotransformation) to obtain the desired product.

#### **Expression of the bacterial cytochrome CYP102A2 in *S. cerevisiae***

The cytochrome *CYP102A2* was PCR amplified and sub-cloned into a yeast multicopy expression vector, the pYX212, harboring a yeast constitutive promoter.

Said plasmid was used to transform the BY4741 strain and the deleted strain in the gene *pox1*, BY4741POX1Δ.

The cytochrome over expression does not affect cellular growth, nor for recombinant BY4741, nor for the BY4741POX1Δ (data not shown).

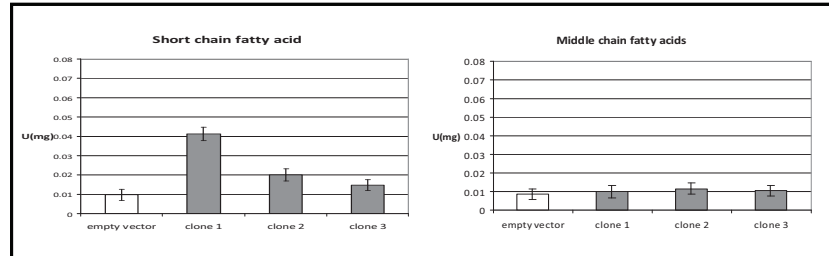
#### ***In vitro* activity**

Preliminary estimation was made using *p*-NCA as substrates. This test is based on the conversion of *p*-nitrophenoxycarboxylic acids (*p*NCAs) by  $\omega$ -hydroxylation, thereby releasing  $\omega$ -oxycarboxylic acids and the chromophore *p*-nitrophenolate (Schwaneberg *et al.*, 1999, see Materials and Methods). This was only used to discriminate between active and not active clones, as *p*-NCAs are chemically synthesised compounds, sometimes the results can differ from that obtained with the natural counterpart. Some independent clones were tested and those showing better performances were further analyzed (data not shown).

Activity was subsequently measured by determining the rate of NADPH consumption to NADP<sup>+</sup> towards short and middle chain fatty acids and compared with what measured in the corresponding strains transformed with the empty plasmid.

For both CYP102A2 expressing background (BY4741 and BY4741POX1Δ), three independent clones were analyzed.

Data concerning activity of the heterologously expressed CYP102A2 with the BY4741 yeast strain are reported first (Fig. 5-6).

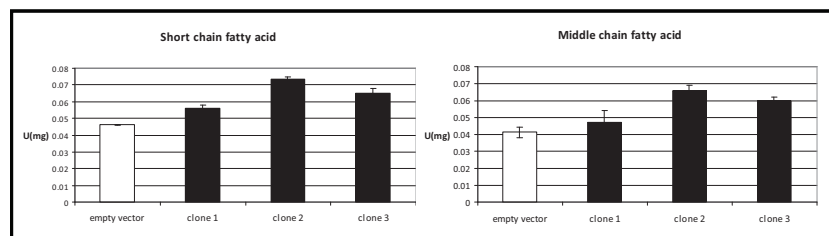


**Figure 5. Activity of CYP102A2 towards short and middle chain fatty acids**

Cytochrome activity is defined as unit of enzyme and refers to mg of total protein extract of BY4741 strain. The graph shows the activity measured in three independent recombinant clones (grey columns) and in the control (transformed with the empty vector, white column).

A significant NADPH consumption was registered when recombinant activity was tested towards short chain fatty acid (left panel), while no significant activity was registered with medium chain fatty acid (right panel).

A significant clonal differences, very likely linked to multicopy expression, is visible.



**Figure 6. Activity of CYP102A2 towards short and middle chain fatty acids**

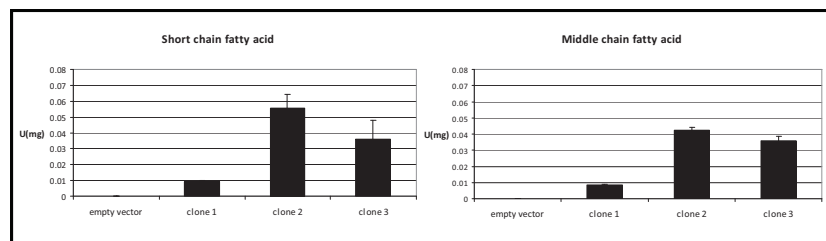
Cytochrome activity is defined as unit of enzyme and refers to mg of total cells extract proteins of BY4741POX1 $\Delta$  strain. The graph shows the activity measured in three independent recombinant clones (black columns) and in the control (transformed with the empty vector, white column).

Contrary to parental strain, the *pox1* deleted one seems to show some activity also towards middle chain fatty acids (Fig. 6). It should

be noted that activity measured on the *pox1* deleted strain has higher value, but even in the control strain, resulting in net values very similar to what measured in the BY4741. Also in this case it seems that CYP102A2 has a little preference towards short chain fatty acids and that chosen clones do not have the same performance (even if they keep the same trend with respect to different substrates).

It has been proved from literature that the addition of the heme-precursor  $\delta$ -aminolevulinic acid to the growth media could facilitate the heme group synthesis (Budde *et al.*, 2005).

Results concerning the sole *pox1* BY4741 cells expressing CYP102A2 are reported (Fig 7).



**Figure 7 : Effect of  $\delta$ -aminolevulinic acid on activity of CYP102A2 towards short and middle chain fatty acids**

Cytochrome activity is defined as unit of enzyme and refers to mg of total cells extract proteins of BY4741POX1 $\Delta$  strain. The graph shows the activity measured in three independent recombinant clones (black columns) and in the control (transformed with the empty vector, with column).

Activity measured resembles what measured on CYP produced without the  $\delta$ -aminolevulinic acid, and in this case the preference for short chain fatty acids is more slight. It remains difficult to explain why in this condition the activity measured in control strains results close to zero.

Despite low, a cytochrome activity versus fatty acids was measured in recombinant strains: what is now important is to analyse what happens to the substrates. To define the nature of the products

obtained, samples need to be analysed by specific GC/MS measurements, whose method adjustment is still in progress (Novamont, Novara).

## Discussion

In this work we reported the expression of the *B. subtilis* cytochrome CYP102A2 in *S. cerevisiae*. The heterologous enzymes seems to be at least partially active versus fatty acids, as resulted from measures based on NADPH consumption. , Interestingly, some activity was measured also towards short chain fatty acids, substrates not described for the *B. megaterium* CYP102A1 (Chefson and Auclair, 2006).

As CYP is able to catalyze different type of reaction involving NADPH consumption (hydroxylation, oxidation and epoxidation as example), it will be necessary to further characterize the products to understand if and what kind of modification are carried out on the tested substrates.

Next step will be the description of the effects of this expression *in vivo* and the GC/MS characterization of products.

In spite of this, as cytochromes P450 catalyze valuable reactions on a vast variety of substrates (fatty acids, steroids and a multitude of non natural compounds such as drugs, organic solvents and hydrocarbon products) and have a great biotechnological impact, their successful expression in yeast could open the possibility to develop other sustainable processes in alternative to classical chemical synthesis.

## Materials and methods

### Recombinant and genetic techniques

DNA manipulation was carried out according to standard techniques (Sambrook and Russell).

Table1	Primers used in the study
Name	Sequence (5'→ 3')
CYP102A2fw	ATTAGAGCTCATGAAGGAAAACAAGCCCGATTCC
CYP102A2rev	ATATCTCGAGCTATATCCCTGCCAGACATCC

CYP102A2 gene was pcr amplified using the *B. subtilis* genomic DNA as template using the oligonucleotide primers CYP102A2fw and CYP102A2rev (table 1). Amplification was obtained by using the Polymerase Pwo DNA (Roche). The annealing temperature was 64°C and the elongation time was 3 min. The obtained DNA fragment was sub-cloned into the shuttle plasmid vector pSTBlue-1, using the Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen) and subsequently sequenced to verify the correct amplification. The CYP102A2 gene fragment, *PmlI*-*MluI* cut, was subcloned into the multicopy yeast expression vector pYX212 *EcoRI* blunted-*MluI* cut.

### Yeast strains and growth conditions

*S. cerevisiae* strains used are listed in Table 2.

Table 2	Yeast strains used in this study
Strain	Relevant genotype
BY4741	Mat a, <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i>
BY4741POX1Δ	Mat a, <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>pox1::KANMX4</i>

Yeast cultures were grown either in rich or in minimal medium. Synthetic minimal medium contains 0.67% YNB (Yeast Nitrogen Base - DIFCO), 2% (w/v) glucose added with Uracil and the required aminoacids at 50 mg/L.

To evaluate pelargonic acid toxicity, growths are carried out both in minimal and rich medium adding the acid at the concentration indicated (v/v).

Media for plates were solidified by the addition of 2% (w/v) agar.

Cultivation in liquid media was performed in shake flasks using 1/5 of total flask volume. Cultures were incubated at 30°C under agitation at 160 rpm. While plates were incubated at 30°C for 2 or 3 days. Cell density of liquid culture was determined spectrophotometrically at 660 nm.

#### **Yeast transformation and determination of plasmid stability**

Yeast transformation was performed using the Lithium Acetate/ssDNA method as described by Gietz and Wood (2002). After the transformation with the expression vector, recombinant strain should be grown in YNB minimal medium added with His, Leu and Met to avoid plasmid loss.

#### **Fluoresceine diacetate (FDA) flow cytometric viability test**

Sampling of  $1 \times 10^7$  cells are centrifuged (5 min at 6000-8000 rpm) and washed twice in PBS. Cells are then resuspended in FDA solution at 10 µg/mL for the identification of viable cells.

Samples were then analyzed using a Cell Lab Quanta™ SC flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) equipped with a diode laser (excitation wavelength 488 nm, laser power 22 mW). The fluorescence emission was measured through a 525 nm long pass filter (FL1 parameter) for FDA signal. The sample flow rate during analysis did not exceed 600–700 cells/s. A total of 20,000 cells was measured for each sample. Data analysis was performed afterwards with WinMDI 2.8 software, build#13 01-19-2000 (Purdue University, Cytometry Laboratories [<http://facs.scripps.edu/software.html>]).

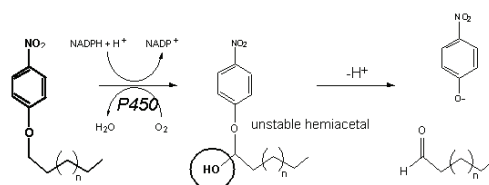
#### **Expression of CYP102A2 and preparations of cell extracts**

Recombinant yeast strains expressing the CYP102A2 were grown in 1L shake flasks containing 200mL of defined glucose minimal medium (without Uracil to keep selective pressure). When the optical density reached a value between 1.0 and 2.0, cells were harvested by centrifugation at 4000 rpm for 20 min at 4°C, washed with iced water and resuspended in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 500 mM sodium chloride, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and protease inhibitor cocktail (Roche). Cells were mechanically disrupted by FastPrep (Savant) (4-5 cycle of 30 seconds

with intervals in ice between cycles) and the cell debris was removed by centrifugation at 12000 rpm for 30 min.

### Qualitative pNCA assay procedures

All reactions were carried out in a final volume of 1 mL, in 100mM phosphate buffer pH 7 using a 6 mM solution of pNCA in DMSO and sample containing enzyme activity. The samples were pre-incubated for 5 min before the reaction was started by the addition of an aqueous solution of 10 mM NADPH.



Reaction scheme of the conversion of p-nitrophenoxycarboxylate (pNCA) by P450 BM-3. After terminal hydroxylation of pNCA, the unstable hemiacetal dissociates forming the p-nitrophenolate that can be directly monitored in a at 410 nm.[Schwaneberg *et al.*, 1999]

### Enzymatic activity Assays

Enzyme activity was measured by determining the rate of NADPH conversion to NADP<sup>+</sup> and following the decrease of absorbance at 340 nm. The final assay volume of 1mL contained 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7; 10 μl of 0.3 mM fatty acid solution in DMSO and sample containing enzyme activity. The reaction was started by adding 10 μl of 20 mM NADPH solution and monitored for 10 minutes. One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that catalyses the conversion of 1 μmol NADPH to NADP<sup>+</sup> per minute. Specific activity is then referred to mg of total cell protein extract. Protein concentration was determined by the method of Bradford using bovine serum albumin as standard.

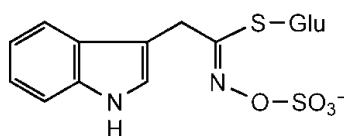


## Development of a recombinant cell factory for Glucobrassicin production

Plants can produce a wide range of secondary metabolites and *Brassicaceae*, in particular, are rich of active compounds, among which the most attractive are glucosinolates that seem to act as chemoprotective (chemical carcinogenesis inhibitors) (Fahey *et al.*, 1997; Faulkner *et al.*, 1998).

They are thioglucoside N-hydroxysulfates [also known as (Z)-(or cis)-N-hydroximiniosulfate esters or S-glucopyranosyl thiohydroximates], with a side chain (R) and a sulfur-linked-d-glucopyranose moiety.

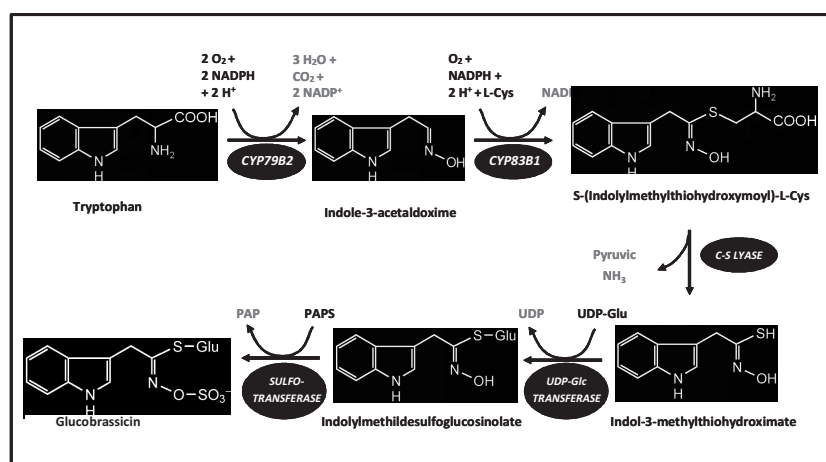
The different glucosinolate are classified with respect to the side chain which depends on the nature of the precursor amino acids (Halkier and Gershenzon 2006). Glucobrassicin, in particular, originates from tryptophan and, whilst not abundant, can elicit different pharmacological effects (Hayes *et al.*, 2008). Each class has a corresponding core structure pathway: for the indolic ones, it consists of at least five enzymatic steps that catalyze the conversion of the amino acid to the corresponding glucosinolate.



**Figure 1. General structure of indolic glucosinolates**

These include two monooxygenation reactions by cytochromes P450 from the CYP79 and CYP83 families, which, respectively, catalyze the conversion of the precursor amino acids to the corresponding oximes, followed by the conversion of oximes into reactive compounds (Halkier and Gershenzon 2006). The following step may occur spontaneously or involve a glutathione-S-transferase-type of enzyme (Hansen *et al.* 2001), and leads to the formation of S-alkylthiohydroximates. The last three enzymatic steps include a C-S lyase, which converts S-alkylthiohydroximates to thiohydroximates (Mikkelsen *et al.* 2004), a glucosyltransferase, which glucosylates these

intermediates to yield desulfoglucosinolates (Grubb et al. 2004), and a sulfotransferase, which adds a sulfate moiety to produce glucosinolates (Piotrowski et al. 2004; Klein et al. 2006).



**Figure 2. Schematic representation of glucobrassicin biosynthesis**

Glucosinolates are naturally defense-related secondary metabolites and they co-occur with endogenous thioglucosidases, named myrosinases; intact compounds have, actually, limited biological activity, but their hydrolysis leads to the formation of biologically active nitrile, isothiocyanate (ITC), or thiocyanate forms. These ones typically have a deterrent effect on generalist herbivores and are partly responsible for the characteristic flavor of *Brassica* vegetables. Furthermore, they can also act as cancer chemoprotective agents.

It appears that these effects can be related, in particular, to nitriles, isothiocyanates, thiocyanates, cyano-epithioalkanes and oxazolidine-2-thiones that seem to be able to control cancer-cell development by regulating target enzymes, inducing apoptosis and blocking the cell cycle (Moreno *et al.*, 2006). In detail, at neutral pH, hydrolysis of glucobrassicin by myrosinase does not generate an ITC, but rather gives rise to indole-3-carbinol and a thiocyanate ion that probably proceeds through a Lossen rearrangement generating an unstable ITC intermediate. At acidic pH, hydrolysis of glucobrassicin yields indole-3-acetonitrile,

hydrogen sulfide and elemental sulphur. In the acidic environment of the stomach, indole-3-carbinol condenses to form various compounds including indolo [3,2-b] carbazole and 3,3-diindolylmethane, both of which have potent pharmacological effects and they can also combine with ascorbic acid to form ascorbigen (Hayes *et al.* 2008).

The significance of plant secondary metabolism products may be reflected in the plant-based product containing glucosinolates. They can be employed in pharmaceutical and food industry as dietary supplements, as it is suggested that myrosinase activity may be present in human colonic microflora (Hayes *et al.* 2008), but also in the cosmetic preparations as they can act as bactericidal.

Plants generally produce a mix of different glucosinolates, whose extraction results quite difficult and poorly efficient. So, yeasts have been chosen as production hosts to obtain more easily the sole glucobrassicin.

In this work we describe the construction of a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* which can express all the enzymes involved in the glucobrassicin biosynthetic pathway. Despite some investigation about possible strain optimization through the employment of multicopy plasmids the final producer will exploit only integrative vectors. This ensure strain stability and could eventually allow the use of complex media during the producing process without creating problems to the recombinant strain.

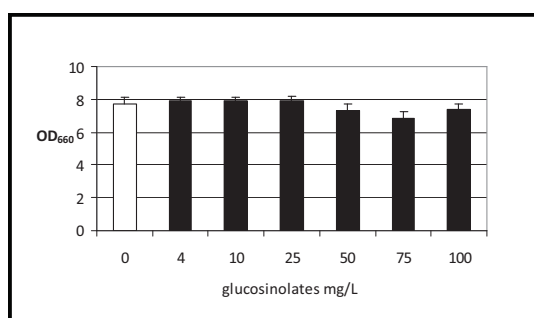
The engineering of plants, both naturally producing glucosinolates as *Arabidopsis thaliana* or not, as tobacco were previously reported (WO 99/27120; EP 1069819 B1; Mikkelsen *et al.*, 2010; Mikkelsen and Halkier, 2003) .

The only patent that refers to microorganisms (WO 2009/106985) deals with the expression in yeasts of *A. thaliana* genes for the production of glucosinolates, more specifically Met-derived and aromatic ones. This is the first example of the reconstruction of the entire Glucobrassicin biosynthetic pathway, exploiting genes of *Brassica oleracea*, in yeast.

## Results

### Analysis of the growth inhibitory effect of a glucosinolates mixture on yeast

Before constructing the recombinant strain, preliminary experiments were set up to verify the effect of glucobrassicin on yeast cells. Because of the absence of a glucobrassicin standard, *S. cerevisiae* is grown in the presence of a mixture of different intact glucosinolates, extracted from rapeseed (Mellon *et al.*, 2002), at increasing concentrations. No significant differences from control cultures can be seen till a concentration of at least 100 mg/L (Fig.1).



**Figure 1. Glucosinolates effects on *S. cerevisiae* growth**

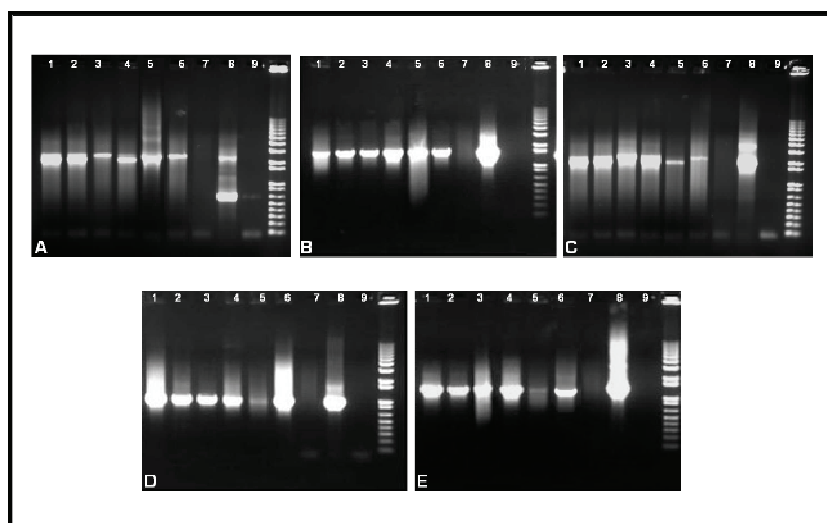
Effect of a mixture of intact glucosinolates on *S. cerevisiae* cells growth in complete rich medium (YPD). Cells are inoculated at the same OD<sub>660</sub> in YPD medium in the presence of increasing amounts of the glucosinolates mixture, (from 4 to 100mg/mL), and incubated at 30°C under vigorous shaking. After 24 hours growth is monitored at OD<sub>660</sub> and compared to the growth in the absence of these compounds (white bar).

We can not speculate about the eventual limiting concentration of glucobrassicin for cells, since we did not quantify the mixture composition. However, it can be reasonably speculated that an eventual initial production will not exceed the tested range. This can be also based on the laboratory experience on ascorbic acid production in yeasts (Sauer *et al.*, 2004).

Previous results (Brabban and Edwards, 1995) showed a reduction to 85% of the control *S. cerevisiae* growth in the presence of sinigrin (an aliphatic glucosinolate, commercially available) at a concentration of 100 mg/L. These will be of use to control possible yeast growth problems during production.

### Construction of glucobrassicin producing yeast strain

Metabolic engineering of yeast to produce glucobrassicin required the insertion of five plant genes. The vectors pYX012[CYP83-bTPI-CYP79], pYX022[UGT-bTPI-C-S-LYASE] and pYX042gap[S-TRANSFERASE], carrying the necessary plant genes, were constructed and used to transform the CEN.PK yeast strain. Three independent (prototrophic) transformants were positively confirmed to carry the glucosinolates biosynthetic genes evaluating their effective integration in the yeast genome by pcr analysis (Fig. 2).



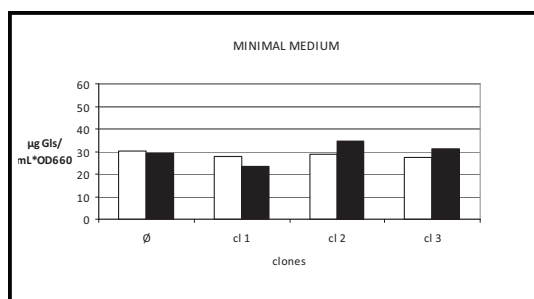
**Figure 2. Control pcr on the engineered yeasts**

pcr amplification of plant genes for glucobrassicin production using genomic DNA of independent transformant as template. Letters indicate which gene has been amplified, respectively: A- CYP79B2; B- CYP83B1; C- C-S LYASE; D- UDP-Glc TRANSFERASE and E- SULFOTRANSFERASE. In each panel lane numbers refer to the analyzed clone and in which growing condition. 1-3: independent transformants grown in minimal

selective medium. 4-6: same clones grown in YPD non-selective medium; lane 7: control strain (transformed with the empty vectors) lanes 8 and 9: positive and negative controls, respectively.

The genes integration was confirmed after several divisions not only in minimal selective medium but also in rich non-selective medium to test the effective stability of the strains not only under laboratory conditions, but also in a production process-like condition.

Preliminary evaluation of glucobrassicin production was measured spectrophotometrically (Jezeck *et al.*, 1999; see Materials and Methods) on the different independent clones. Analyses were carried out on crude cell extracts and on supernatants after growth in both minimal and rich media. Data on supernatants, in both cases, and on crude extracts of cells grown in YPD do not show any appreciable production because of an high background signal. In all likelihood this is to attribute to the assay employed, not the most correct one but the quickest to screen several samples.

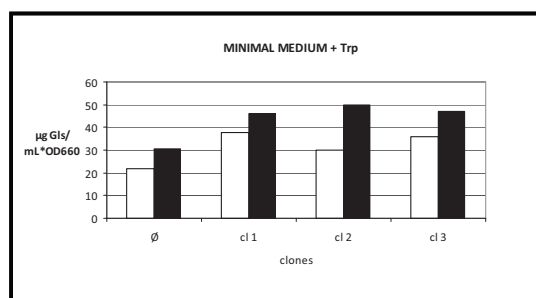


**Figure 3. Glucosinolates production after 24 and 48 hours of growth in minimal medium**

Glucosinolates production in *S. cerevisiae* cell extracts of three independent clones (cl1-3) after grown in minimal medium. Productions are expressed as  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of cell extracts and are normalized on  $\text{OD}_{660}$ .  $\emptyset$ : control strain. Glucobrassicin is estimated by the reaction with ferricyanide of alkaline degradation products on cell extracts harvested after 24 (white columns) and 48 hours (black columns).

After 24 hours no differences among the control strain and transformants are evident, while after 48 hours a higher signal in comparison to the control is appreciable. This could be linked to some products able to react with the ferricyanide after an alkaline degradation.

As the starting point for glucobrassicin biosynthesis is Tryptophan, said aminoacid was supplemented to the growing medium at the concentration of 200mg/L. After 24 hours only a slight but evaluable increase in the signal can be seen, while after 48 hours a clear rise is notable in the transformants considered (Fig. 4).



**Figure 4. Glucosinolates production in minimal medium with Tryptophan**

Glucosinolates production in *S. cerevisiae* cell extracts of three independent clones (cl1-3) after grown in minimal medium containing Tryptophan (200mg/L). Productions are expressed as  $\mu\text{g/mL}$  of cell extracts and are normalized on  $\text{OD}_{660}$ . Ø: control strain. Glucobrassicin is estimated by the reaction with ferricyanide of alkaline degradation products on cell extracts harvested after 24 (white columns) and 48 hours (black columns).

Ferricyanide is supposed to react with thiol compounds that can generate from the alkaline degradation of the glucosinolates. As the assay shows a very high background, to control that the signal was not aspecifically ascribable to other biosynthetic intermediates, the recombinant strains carrying only the first four enzymes involved in the pathway were also analysed. Here we couldn't appreciate any significant signal compared to the control

strain (data not shown), suggesting that differences appreciated in the producers might be correlated to the presence of glucosinolates.

Because of this positive result, next efforts were dedicated to improve production levels through both biochemical-metabolic and nutritional-metabolic modifications.

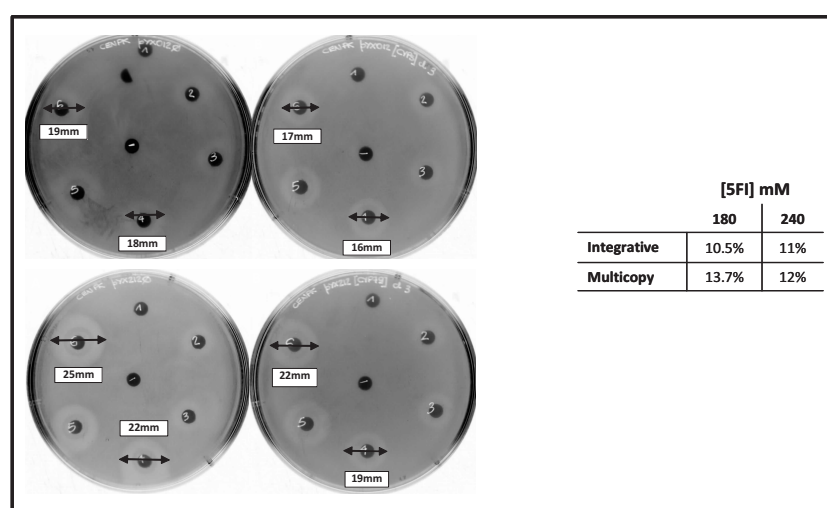
As the expression of active membrane associated plant cytochromes in yeast seems to be not so obvious (Chung *et al.*, 2004), we initially focused on *CYP79B2*, the most putative bottleneck. This enzyme is highly substrate-specific and therefore represents the entrance point for biosynthesis of the core structure of glucosinolates (Nafisi *et al.*, 2006). An indirect way for testing the successful expression of *CYP79B2* is the resistance to toxic analogues of Tryptophan, as already reported for *Arabidopsis* or recombinant yeast (Hull *et al.*, 2000). It was therefore possible to test the recombinant yeasts evaluating their resistance to 5 Fluoro-indole (5FI). This screen takes advantage of the toxicity of this indole analogue. In yeast, 5FI is converted to the toxic compound 5-fluorotryptophan (5FT) by tryptophan synthase b: 5FT gets incorporated into proteins and disrupts protein function, and mimics Tryptophan in its ability to feedback-inhibit anthranilate synthase, thus shutting down further Tryptophan biosynthesis (Miozzari *et al.*, 1977).

Taking into account the original subcellular localization of the plant cytochromes, in addition to process reason, the first choice fall on the use of an integrative vector (pYX012), to avoid a great metabolic burden, linked to the folding and localization of a membrane protein. The assay employed proved that *CYP79B2* expressing yeasts are able to detoxify 5 Fluoro-indole, showing a less growth inhibition halo compared to the control (Fig. 5, panel above). This result, supported by data on production, suggested on one side that the cytochrome is actively expressed and, on the other, that this test could be used to indirectly analyze *CYP79B2*.

First attempt to increase the production was linked to the use of a multicopy vector (pYX212) to verify if a greater copy number can be linked to a greater specific activity.



Effects of this attempt are evaluated with the resistance to 5-Fluoro Indole test (Fig.5).



**Figure 5. 5FI toxicity test: Comparison between single and multicopy expression system for CP79B2.**

Yeast expressing *CYP79B2* resistance to 5FI. A saturated culture was mixed with molten 0.7% agar and plated onto complete minimal medium lacking uracil. After the top agar had solidified, sterile filter disks were placed onto the surface and 5FI at different concentrations (-: water; 1:  $1\text{CHCl}_3$ ; 2:  $120\ \mu\text{M}$ ; 3:  $150\ \mu\text{M}$ ; 4:  $180\ \mu\text{M}$ ; 5:  $210\ \mu\text{M}$  and 6:  $240\ \mu\text{M}$ ) was pipetted onto the filter. Yeast plates were incubated at  $30^\circ\text{C}$  for 48 h and photographed. In the upper panel the cytochrome is expressed through an integrative vector (pYX012) while in the lower panel through the multicopy one (pYX212). A: control strain; B: clone 3 (chosen as example). The table shows percentage of inhibition halo diameter reduction in respect to the control.

Positive results suggest that folding should not represent a limiting step in the expression of an active *CYP79B2*, and a multicopy expression system allow to better exploit enzyme potentialities.

However, this improvement did not reflected in a spectrophotometrically detectable increase of product formation (data not shown).

In view of an industrial production process, then, a multicopy system of expression does not represent a good choice and results obtained

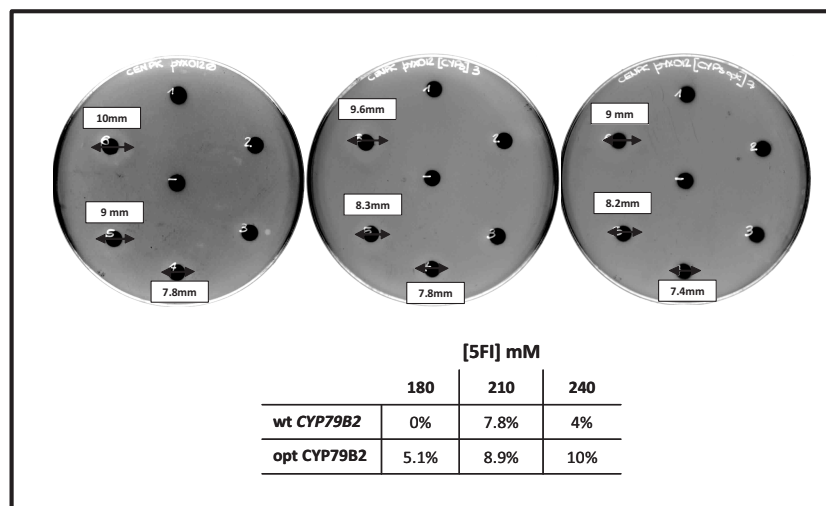
don't give a good reason for taking into account multiple gene integration.

Based on literature data, next attempt relies on N-terminal protein recoding, on the basis of *S. cerevisiae* codon bias (Hehn *et al.*, 2002) Some common structural features of membrane-anchored proteins, such as P450s and P450 reductases, imply a high frequency of strongly biased codons at the N terminus. The presence of frequent low-usage codons was reported to cause severe translational inhibition or errors. Fifteen clusters of rare codons, especially tandem repeats, are more likely to lead to translation failure when they were located close to the initiation site than when they were located farther in the coding sequence. It was assumed that stalling of ribosomes at the beginning of a message interferes with the formation of new initiation complexes or that the stability of the translation complex, and the chances of the ribosomes not to fall off when pausing becomes too long at a minor codon, increases as a function of the distance already translated.

Clustering of biased codons near the translation start of P450s or P450 reductases offers the possibility to selectively exchange unfavorable codons for those preferred by the host organism just at the 5' end of the coding sequences.

This strategy is often sufficient to obtain dramatic increases in the production of recombinant proteins, as (1) it suppresses problems of translation initiation and (2) it probably also helps to decrease the total number of codons corresponding to rare tRNAs (the so-called hungry codons) below the threshold that causes a complete depletion of the pool and early translation termination.

The obtained N-terminal optimised cytochrome *CYP79B2* has been cloned both in integrative and empty vector, and transformants were once more tested for resistance to 5-Fluoro Indole (Fig. 6).



**Figure 6. 5FI toxicity test: Comparison between wild type and N-term optimized *CP79B2*.**

Yeast expressing *CYP79B2* resistance to 5FI. A saturated culture was mixed with molten 0.7% agar and plated onto complete minimal medium lacking uracil. After the top agar had solidified, sterile filter disks were placed onto the surface and 5FI at different concentrations (-: water; 1:  $1\text{CHCl}_3$ ; 2:  $120\ \mu\text{M}$ ; 3:  $150\ \mu\text{M}$ ; 4:  $180\ \mu\text{M}$ ; 5:  $210\ \mu\text{M}$  and 6:  $240\ \mu\text{M}$ ) was pipetted onto the filter. Yeast plates were incubated at  $30^\circ\text{C}$  for 48 h and photographed to compare the control strain (A), the one which express the wt CYP (B) and the one expressing the optimized cytochrome (C). The table shows percentage of inhibition halo diameter reduction in respect to the control.

With this optimization a smaller but still significant improvement is visible; however, once more the spectrophotometric analysis does not suggest a real improvement in production levels (data not shown). Nevertheless, we can not exclude that a combination of N-terminal optimization with a multicopy expression would end up with a production improvement.

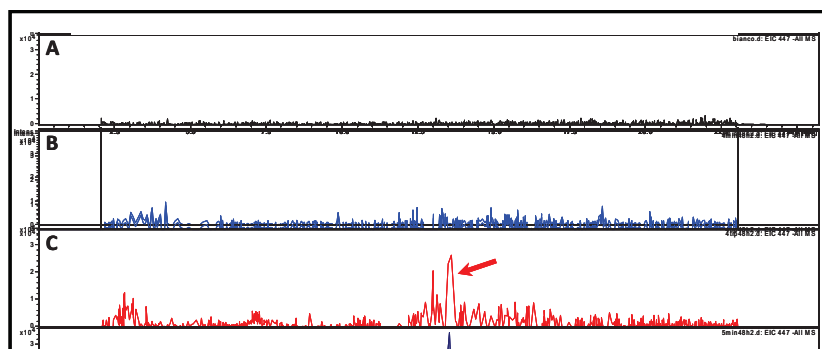
As already underlined, plant cytochromes are membrane bound (*CYP79B2* was suggested to be targeted to the chloroplast, Hull *et al.*, 2000) requiring an auxiliary NADPH-cytochrome P450 reductase, able to regenerate the cofactor (Bernhardt, 2006).

Even if yeast contains an endogenous NADPH cytochromes P450 reductase (Guengerich *et al.*, 1991), overexpression of heterologous

cytochromes is often carried out in strains modified in order to overexpress the endogenous yeast NADH-P450 reductase or the *A. thaliana* one and they are respectively the W(R)the WAT11 strains. Here, to avoid eventual codon bias problem, the yeast reductase, named *Ncp1*, was used. It was sub-cloned into a centromeric expression plasmid with a dominant marker, pZ<sub>3</sub> (see Material and Methods). Once more this expression determined a little improvement in the resistance to 5Fl, but not in product production (data not shown).

Since no significant advantages result from NADPH-reductase expression, this additional modification was not included in the production strain, avoiding an additional metabolic burden. However, it cannot be excluded that this expression would become necessary once the production levels will be increased.

Because the tested optimization did not resulted in considerable improvement, the first and simpler recombinant strain, was further analysed through HPLC analyses. The method, set up by *Laboratorio di Analisi, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Genova*, required considerable optimization. (Fig. 7).



**Figure 7. HPLC analyses to identify glucobrassicin production**

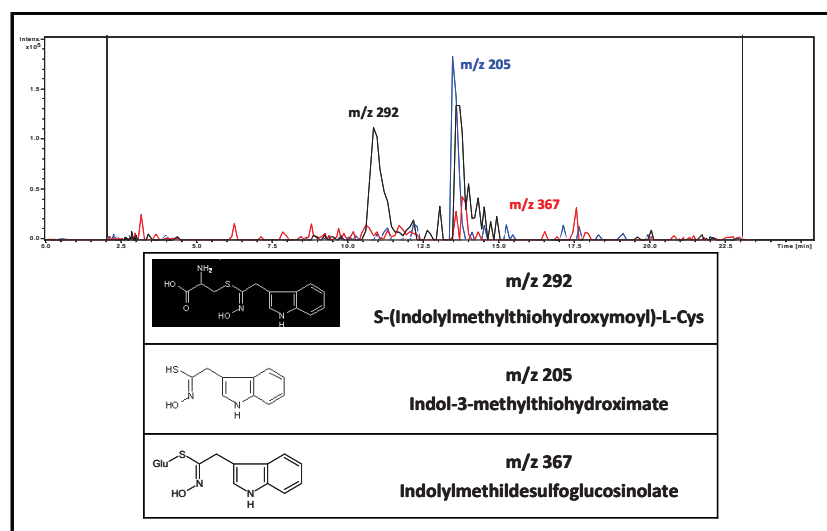
HPLC profile of recombinant strain grown in minimal medium (B) and in minimal medium added with Trp (C) referred to a control strain analyzed in the same conditions (A). The arrow indicates the peak that after MS analyses has been indicated as glucobrassicin.

These data validated our previous spectrophotometric results, confirming a positive difference in production when cells were grown

in the presence of Tryptophan, even if a little signal could be seen also after growth in minimal medium.

The recombinant strain is so able to produce glucobrassicin, even if in small amounts. The described findings and the process of production were deposited as patent application [Mauro Magnani, E. Bartolucci, Danilo Porro, Paola Branduardi, Vera Codazzi, Umberto Benatti, Gianluca Damonte, Giovanni Schippa e Stefano Bianchini **Sviluppo di una cell factory ricombinante per la produzione di Glucobrassicina**].

Meanwhile, HPLC method has been further developed also to identify the biosynthetic intermediates (Fig. 8).



**Figure 8. HPLC analyses to identify glucobrassicin biosynthetic intermediates.**

HPLC profile of recombinant strain grown in minimal medium added with Trp. The peaks, corresponding to the intermediates are indicated with their m/z ratio and explicated in the table below.

HPLC profile seems to confirm our previous indications, confirming the activity of both cytochromes expressed and suggesting the steps which might be also optimized.

In particular, the reactions catalyzed by C-S LYASE and by the SULFOTRANSFERASE can be improved. Modifications on both biochemical and nutritional level can be planned.

The enzymes levels can be improved adapting their codon usage, if necessary, changing the expression system or providing the needed co-factors. On the other side also growth media composition would be fine-tuned to promote the unfavoured reactions.

HPLC analyses will help to monitor the effect of each modification and we can not exclude that a combination of them would end up with a final production improvement.

## Materials and methods

### Yeast strains

The following *Saccharomyces cerevisiae* strains were utilized for the presented work:

The parental strain CEN.PK 102-5B (*MATa*, *ura3-52*, *his3-11*, *leu2-3/112*, *TRP1*, *MAL2-8c*, *SUC2*)

The control strain generated is the following: CEN.PK 102-5B (*Mat a*, *his 3Δ1*) [pYX012] [pYX022] [pYX042gap]. The respective producing strain is the following: CEN.PK 102-5B (*Mat a*, *his 3Δ1*)[pYX012CYP83-bTPI-CYP79][pYX022UGT-bTPI-C-S-LYASE][pYX042gapS-TRANSFERASE],

### Microorganism growth media and conditions

Yeast cultures were grown either in rich or in minimal medium.

Tolerance experiments were performed in YPD medium containing 2% (w/v) glucose, 2% (w/v) tryptone and 1% (w/v) yeast extract; After extraction from commercial rapeseed [Mellon et al., (2002)] intact glucosinolates mixture was added at higher concentration: 4, 10, 25, 50, 75, and 100 µg/µL.

Productions were performed in YNB (1.34% w/v) minimal medium (Yeast Nitrogen Base - DIFCO) containing 5% (w/v) glucose added or not with Tryptophan at 200mg/L; further supplementation are specified. Pre-cultured were performed in liquid glucose minimal medium

Media for plates were solidified by the addition of 2% (w/v) agar.

Cultivation in liquid media was performed in shake flasks using 1/5 of total flasks volume. Cultures were incubated at 30°C under agitation at 160 r.p.m. while plates were incubated at 30°C for 2 or 3 days.

### Extraction of intact glucosinolates from seeds [Mellon et al. (2002)] and horseradish

Seeds were first oven dried at 100°C for 24 h to inactivate myrosinase activity. Samples were rapidly homogenised in 70% v/v methanol with a pestle and mortar. The homogenate was transferred into microtube and the pestle and mortar were washed with further 70% v/v methanol, which was added to the original homogenate. The tubes were sealed and heated at 70°C for 30 min with vortex mixing every 5 min. After being cooled the samples were centrifuged

(17,000g, 4°C, 15 min) to pellet insoluble material. The supernatant was removed filtered and dried. The supernatant is removed, filtered and dried. The residues were resuspended in water.

### Recombinant and genetic techniques

DNA manipulation was carried out according to standard techniques. Sambrook and Russell

Table1	Primers used in the study
Name	Sequence (5' → 3')
TPI probe	TTTGTTATTTGTTATACCGATGTAGTCTCT
ter Kpn	GGGGTACCCAGCTGGAGCTAGACAAAGAC
CYP83_5'	ATGGATCTCTTATTGATTATAGCCGGCATGG
CYP83_3'	CCACACCAACCCCATCACGCCTGAT
UGT_5'	ATGGCGGAAACAACAACAACAACAACAGCG
UGT_3'	TCAATGTTTCTTCCCTAAACTCTCCACAACTC
DES_5'	ATGGAATCAAAGACAACCCAAAACGGATCCGAACACGAACTCTCG
DES_3'	GATCTCGGCTTTCAGTTATCATGTTGAAGCAAGCCAGTATCTCTA
CYP79_3'	CACTGCTAGCTCACTTCACCGTCGGGTAAAGATGCTCCGG
CYP79_5'	CACTACTAGTATGAACACTTTCACTTCTAACTCTTCTGACTTGACTTCTACT ACTAGACAAACTTGGTCTTTCTCTAACATGTACT
CYP79_	CAAACCTGGTCTTTCTCTAACATGTACTTGTGACTACTTTCGAAGCTTTC
follow	GTTGCTATAACCTTAGTGATGCTTCTC
Ncp_5'	CACTTCTAGAATGCCGTTTGGGAATAGACAACACC
Ncp_3'	AGTGGGGCCCTTACCAGACATCTTCTTG

### Yeast expression plasmids

The *Z. bailii* TPI promoter gene was PCR amplified using the pZ<sub>3</sub> plasmid as template, utilizing the TPI probe and ter Kpn primers (table 1). Amplification was obtained by using the Polymerase Pwo DNA (Roche). The annealing temperature was 55.8°C and the elongation time was 2 min. The obtained DNA fragment was sub-cloned into the shuttle plasmid vector pSTBlue-1, using the Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen) and subsequently sequenced to verify the correct amplification. The *bTPI* gene fragment was obtained by *KpnI* cut of the plasmid.

The *P. pastoris* GAP promoter gene was *BglII-HincII* excised from pGAPZ vector (Invitrogen) and sub-cloned into the shuttle plasmid vector pSTBlue-1, using the Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen). *S. cerevisiae* TPI promoter of the pYX042 (R&D Systems) *EcoRI* blunted-*AatII* cut was replaced by the GAP promoter *EcoRI* blunted-*SnaB* I excised.



Enzymes involved in the glucobrassicin biosynthetic pathway have been identified through the screening of two cDNA library of *Brassica oleracea v. botrytis* and made available in prokaryotic expression plasmid (Università degli Studi di Urbino).

*CYP83* was *NcoI-BamI* cut from pET3 plasmid (Novagen) and ligated into the pYX012 (R&D Systems) expression plasmid (cut with the same enzymes). Then *bTPI* promoter was inserted into the *KpnI* site and *CYP79*, cut *BglII-BamHI* from pET3 vector inserted in the *XbaI* blunted site.

*UGT* was *EcoRI* cut from pCR2.1 plasmid (Invitrogen) and ligated into the pYX022 (R&D Systems) expression plasmid (cut with the same enzyme). *bTPI* promoter was inserted into the *KpnI* site and *C-S-LYASE* gene, excised *EcoRV-SpeI* from pCR2.1 vector inserted in the blunted *XbaI* site.

S-TRANSFRASE gene was *NcoI-FspI* cut from pET3 plasmid and ligated into the pYX042gap expression plasmid *NcoI-SmaI* cut .

*NCP1* gene was amplified from *S. cerevisiae* CEN. PK genome using Ncp primers (table 1). Amplification was obtained by using the PCR Extender Mix (5 PRIME). The annealing temperature was 67.5°C and the elongation time was 2 min. The obtained DNA fragment was subcloned into the shuttle plasmid vector pSTBlue-1, using the Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen) and subsequently sequenced to verify the correct amplification. *NCP1* gene, *Apal* cut, was subcloned into the pZ<sub>3</sub> expression plasmid (cut with the same enzyme).

<b>Plasmid</b>	<b>Type</b>	<b>Selection</b>	<b>Promoter</b>	<b>Heterologous product</b>	<b>Origin</b>
pYX012 <i>CYP83B1-bTPI-CYP79B2</i>	INT	URA3	<i>ScTPI</i> <i>ZbTPI</i>	<i>CYP83B1</i> <i>CYP79B2</i>	This work
pYX022 <i>UGT-bTPI-C-S-LYASE</i>	INT	HIS3	<i>ScTPI</i> <i>ZbTPI</i>	<i>UGT</i> <i>C-S LYASE</i>	This work
pYX042g <i>SULFOTRANSFERASE</i>	INT	LEU2	<i>PpGAP</i>	<i>SULFO-TRANSFERASE</i>	This work
pYX012 <i>CYP83B1-bTPI-CYP79B2*</i>	INT	URA3	<i>ScTPI</i> <i>ZbTPI</i>	<i>CYP83B1</i> opt <i>CYP79B2</i>	This work
pYX212 <i>CYP79B2</i>	2μ	URA3	<i>ScTPI</i>	<i>CYP79B2</i>	This work
pYX212 <i>CYP79B2*</i>	2μ	URA3	<i>ScTPI</i>	opt <i>CYP79B2</i>	This work
pZ <sub>3</sub> <i>NCP1</i>	2μ	KAN	<i>ScTPI</i>	<i>NCP1</i>	This work

### Yeast transformation and determination of plasmid stability

Yeast transformation was performed using the Lithium Acetate/ssDNA method as described by Gietz and Wood (2002).

For yeast transformation, the integrative plasmids [pYX012*CYP83-bTPI-CYP79B1*] and the empty pYX012 were linearized in the *StuI* site; [pYX042gap*S-TRANSFERASE*] was linearized in the *BstXI*, while the empty pYX042gap in the *HpaI* site; [pYX022*UGT-bTPI-C-S-LYASE*] and pYX022 were linearized in the *BssHI* site.

PCR to control the effective integration of all five plant gene is carried out with specific primers as regards *CYP83*, *UDP-GLYCOSILTRANSFERASE* and *DESULFOGLUCOSINOLATE-SULFOTRANSFERASE* genes, while using TPI probe and ter Kpn primers for *CYP79* and *C-S LYASE* (table 1).

### Recoding of CYP79B2 N-terminus

Using JCat tool we recodify first 106 nucleotide of the sequence according to *S. cerevisiae* codon bias

<b>CYP79</b>	<b>ATGAACACTTTTACCTCAAACTCTTCGGATCTTACTTCCACTACTAGCAAACA TGGTCG</b> 60
<b>CYP79opt</b>	<b>ATGAACACTTTCACCTCAAACTCTTCGGATCTTACTTCCACTACTAGCAAACA TGGTCT</b> 60
<b>CYP79</b>	<b>TTCAGCAACATGTATCTCCTCACGACTCTTCAAGCCTTGTGGCTATAACCTTAGTGATG</b> 120
<b>CYP79opt</b>	<b>TTCCTAACATGTACTTGTGACTACTTTGCAAGCCTTTCGTGCTATAACCTTAGTGATG</b> 120

### Comparison between wt and optimized N-terminus of CYP79B2

The picture shows differences (underlined in red) between wild type and optimized nucleotide sequence of the cytochromes.

The optimized sequence has been obtained after two sequential PCR, Recoding is performed by polymerase chain reaction (PCR) using *PCR Extender Mix* (5 Prime); two sequential reaction were carried out using first CYP79\_follow and CYP79\_3' then CYP79\_5' and CYP79\_3' primers (table 1). Conditions for the pcr are chosen so as to minimize errors, i.e., using high concentrations of template and small numbers of amplification cycles. Typically, the PCR mix contains 100 ng of template DNA, 100 nM of each primer, 50 mM dNTPs. Amplification is performed using four cycles of 1 min 30 sec at 94°C, 2 min 30 sec at 50°C, and 3 min 30 sec at 72°C, followed by nine cycles of 1 min 30

sec at 94°C, 2 min 30 sec at 53°C, 3 min 30 sec at 72°C, and 10 min elongation at 72°C.

#### **Indirect evaluation of CYP79B2 through 5-fluoroindole resistance**

As yeast expressing CYP79B2 are resistant to 5-fluoroindole (5FI), this can be exploited to understand if the enzyme is expressed in the active form.

A culture, grown during the night, of the yeast carrying either CYP79B2 and CYP83B1 genes, or only the first one, was mixed with 8 ml of molten 0.7% agar and plated onto complete minimal medium lacking uracil. After the top agar had solidified, sterile filter disks were placed onto the surface and 10 µl of the following concentration of 5FI was pipetted onto the filter: 40, 80, 100, 120 and 240 µM. Yeast plates were incubated at 30°C for almost 48 h and photographed.

#### **Analysis of produced glucosinolates**

##### **Determination of glucosinolates using their alkaline degradation and reaction with ferricyanide [Jezeck *et al.* (1999)]**

The method relies on the measurement of the reaction between ferricyanide with the breakdown products of the alkaline degradation of glucosinolates. The assays are performed on cell extracts samples, obtained by mechanical rupture of cells in phosphate buffer 0.2M at pH 7.

For each sample, 50 µL of cell extract is mixed with an equal volume of NaOH (2M) and incubated for 30 minutes at room temperature. After that concentrated HCl is added to neutralize the solution; after centrifugation (13200 rpm, 6 minutes) the supernatant is mixed with an equal volume of ferricyanide (2mM in phosphate buffer 0.2 M, pH7) and the absorbance is measured within 15 seconds against phosphate buffer at 420 nm.

The content of total glucosinolates is calculated from the absorbance reading using a standard sinigrin calibration curve.

Results

## Discussion

---



The necessity for biological processes utilizing renewable resources becomes critical in part due to global warming and depletion of petroleum. Most biological engineering efforts have been focused on developing microbial systems that can be genetically altered to produce high-value chemicals and petroleum substitutes. Among the host exploited to build up such systems, *Saccharomyces cerevisiae* still represents a microorganisms of election, despite the growing interest in exploiting the great biodiversity existing among yeast (i.e., use of “non-conventional” yeasts).

In this study, the extreme versatility of *S. cerevisiae* is confirmed.

Exploiting the huge variety of metabolism and enzymatic activities found in nature, it can be used as host for the expression, as example, of bacterial genes as well as plant ones and it is able to carry on also a production that requires the expression of a whole heterologous biosynthetic pathway.

Depending on the process, it should also be underlined that yeast could fit to very different conditions. During industrial processes it is exposed to several stresses that can decrease production, productivity and yield of the product.

As regard bioethanol production, yeasts utilization is well established for its natural fermentation ability, but new generation biofuels require the development of strain more and more robust, able to face conditions imposed by the process that should be as cheaper and more profitable as possible. The interest in this field is so focused to find new determinants, in which TIL could represent an example of unexplored molecule able to confer yeast the ability to tolerate some of the stresses imposed, lowering the efforts to maintain the natural equilibrium in such conditions.

On the other side, *S. cerevisiae* might be employed for the production of high-value compounds of different nature. In this field molecules of pharmaceutical interest have a privileged position, but nutraceuticals are gaining more and more attention in public opinion.

These compounds are mainly of plant origin and their extraction from their natural source results in some cases difficult and expensive. To overtake this limitation the look for alternative production moved on the use of recombinant strain, as well proved by resveratrol (Becker *et al.*, 2003), artemisinic acid (Ro *et al.* 2006), and we can also mention glucobrassicin, production by engineered yeast, as reported in this work.

It should, however, be considered that, when forced to do something far from its natural ability and need, yeast could reveal its limitations, as the case of pelargonic acid modification.

This is one of the motivations that drive through the search for new hosts having the best fitness for a specific production/process, exploiting what nature can offer, but also through the creation of a biological system capable of replication, fed only by simple carbon and energy sources and virtually able to do the sole reaction or pathway of interest (Lartigue *et al.*, 2009).



## References

---



Akerstrom BD, Flower R and Salier JP (2000) Lipocalins: unity in diversity. *Biochim Biophys Acta* 1482: 1-8.

Becker JV, Armstrong GO, van der Merwe MJ, Lambrechts MG, Vivier MA, and Pretorius IS (2003) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Res.* 4:79–85.

Bernhardt R (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol* 124: 128-145.

Brabban AD and Edwards C (1995) The effects of glucosinolates and their hydrolysis products on microbial growth. *J. Appl. Bacteriol.* 79(2):171-177.

Branduardi P, Smeraldi C and Porro D (2008) Metabolically Engineered Yeasts: 'Potential' Industrial Applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* 15:31-40

Budde M, Maurer SC, Schmid RD and Urlacher VB (2005) Cloning, expression and characterisation of CYP102A2, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 180–186.

Çakar ZP, Urtu OS, Tamerler C, Sonderegger M and Sauer U (2005) Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 5:569–578

Charron J-B Frenette, Oullet F, Houde M and Sarhan (2008) The plant Apolipoprotein D ortholog protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *BMC Plant Biol.* 8:86

Charron J-B Frenette, Oullet F, Pelletier M, Danyluk J, Chauve C and Sarhan F (2005) Identification, Expression, and Evolutionary Analyses of Plant Lipocalins. *Plant Physiology* 139: 2017-2028

Charron J-B Frenette, Breton G, Badawi M and Sarhan F (2002) Molecular and structural analysis of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 517: 129-132.

Chefson A and Auclair K (2006) Progress towards the easier use of P450 enzymes. *Mol. BioSyst.* 2: 462-469.

Chi W-T, Fung RWM, Liu H-C, Hsu C-C and Charng Y-Y (2009) Temperature-induced lipocalin is required for basal and acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant, Cells and Environ.* 32:917-927

Chung WG, Sen A, Wang-Buhler JL, Yang YH, Lopez N, Merrill GF, Miranda CL, Hu CH, and Buhler DR (2004) cDNA-directed expression of a functional zebrafish CYP1A in yeast. *Aquatic Toxicology* 70: 111–121

Crank M, Patel M, Marscheider-Weidemann F, Schleich J, Hüsing B, Angerer G and Wolf O (2005) Techno-economic feasibility of large-scale production of bio-based polymers in Europe. <http://ipts.jrc.ec.europa.eu/publications/pub.cfm?id=1343>

Demain AL (2009) Biosolutions to the energy problem. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:319-332.

De Mot R and Parret AHA (2002) A novel class of self-sufficient cytochrome P450 monooxygenases in prokaryotes. *TRENDS in Microbiol.* 10 (11): 502-507.

Eshenfeldt WH, Zhang Y, Samaha H, Stols L, Eirich LD, Wilson CR and Donnelly MI (2003) Transformation of fatty acids catalyzed by cytochrome P450 monooxygenase enzymes of *Candida tropicalis*. *Appl Environ. Microb.* 69: 5992-5999.

Fahey JW, Zhang Y and Talalay P (1997) Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (19):10367-10372.

Faulkner K, Mithen R and Williamson G (1998) Selective increase of the potential anticarcinogen 4-methylsulphinylbutyl glucosinolate in broccoli. *Carcinogenesis* 19 (4): 605-609.

Ferrer-Miralles N, Domingo-Espín J, Corchero JL, Vázquez E and Villaverde A: Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* 2009, 8:17.

Flower DR, North AC and Sansom CE (2000) The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim et biophys Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology* 1482: 9-24.

- Gietz RD and Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* 350:87–96.
- Halkier BA, and Gershenzon J (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 303-333.
- Hansen CH, Du L, Naur P, Olsen CE, Axelsen KB, Hick AJ, Pickett JA and Halkier BA (2001) CYP83B1 Is the Oxime-metabolizing Enzyme in the Glucosinolate Pathway in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 276 (6): 24790-24796.
- Hayes JD, Kelleher MO and Eggleston IM (2008) The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *Eur J Nutr* 47 (Suppl 2): 73-88.
- Hehn A, Morant M and Werck-Reichhart D (2002) Partial Recoding of P450 and P450 Reductase cDNAs for Improved Expression in Yeast and Plants. *Meth. Enzymol.* 357: 343-351.
- Hopewell J, Dvorak R and Kosior E (2009) Plastics recycling: challenges and opportunities. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364: 2115–2126.
- Hull AK, Vij R and Celenza JL (2000) *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *PNAS* 97 (5): 2379-2384.
- Hunkova Z (2004) Toxic effect of fatty acids on yeast cells: possible mechanisms of action. *Biotechn Bioengin* 20: 1235-1247.
- Jezek J, Haggett BGD, Atkinson A, and Rawson DM (1999) Determination of Glucosinolates Using Their Alkaline Degradation and Reaction with Ferricyanide. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (11), 4669-4674.
- Lartigue C, Vashee S, Algire MA, Chuang RY, Benders GA, Ma L, Noskov VN, Denisova EA, Gibson DG, Assad-Garcia N, Alperovich N, Thomas DW, Merryman C, Hutchison CA 3rd, Smith HO, Venter JC and Glass JI: Creating Bacterial Strains from Genomes That Have Been Cloned and Engineered in Yeast. *Science* 325:1693-6.
- Levesque-Tremblay G, Havaux and Ouellet F (2009) The chloroplastic lipocalin AtCHL prevents lipid peroxidation and protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *The Plant Journal*.

- Lentz O, Urlacher V, Schmid RD (2004) Substrate specificity of native and mutated cytochrome P450 (CYP102A3) from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology* 108: 41–49.
- Ludovico P, Rodrigues F, Almeida A, Silva MT, Barrientos A and Corte-Real M (2002) Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 13: 2598–2606.
- Ludovico P, Sousa MJ, Silva MT, Leao C and Corte-Real M (2001) *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology* 147: 2409–2415.
- Madeo F, Frohlich E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, et al. (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 145: 757–767.
- Mellon FA, Bennett RN, Holst B and Williamson G (2002) Intact Glucosinolate Analysis in Plant Extracts by Programmed Cone Voltage Electrospray LC/MS: Performance and Comparison with LC/MS/MS Methods. *Analytical Biochemistry* 306, 83–91.
- Mikkelsen MD, Olsen CE and Halkier BA (2010) Production of the Cancer-Preventive Glucoraphanin in Tobacco. *Molecular Plant* 3 (4): 751–759.
- Mikkelsen MD, Naur P and Halkier BA (2004) *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *The Plant Journal* 37: 70-77.
- Mikkelsen MD and Halkier BA (2003) Metabolic Engineering of Valine- and Isoleucine-Derived Glucosinolates in *Arabidopsis* Expressing CYP79D2 from *Cassava*. *Plant Physiology* 131: 773–779.
- Miozzari G, Niederberger P and Hütter R. (1977) Action of tryptophan analogues in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* 15; 115(3): 307-316.
- Montgomery Rex (2004) Development of biobased products. *Bioresource Technology* 91: 1–29
- Morel J, Claverol S, Mongrand S, Furt F, Fromentin J, Bessoule JJ, Blein JP and Simon-Plas F (2006) Proteomics of Plant Detergent-resistant Membranes. *Molecular & Cellular Proteomics* 5.8: 1396- 1411.

Moreno DA, Carvajal M, López-Berenguer C and García-Viguera C (2006) Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *J Pharm Biomed Anal* 41: 1508-1522.

Nafisi M, Sønderby IE, Hansen BG, Geu-Flores F, Nour-Eldin HH, Nørholm MHH, Jensen NB, Li J and Halkier BA (2006) Cytochromes P450 in the biosynthesis of glucosinolates and indole alkaloids. *Phytochem Rev* (2006) 5:331-346.

Porro D and Branduardi P (2009) Yeast cell factory: fishing for the best one or engineering it? *Micr Cell Factories* 8:51- 54.

Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MC, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R and Keasling JD (2006) Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440: 940-943.

Russell NJ, Evans RI, ter Steeg PF, Hellemons J, Verheul A and Abee T (1995) Membranes as a target for stress adaptation. *Int J Food Microbiol* 28: 255-261.

Sambrook and Russell. *Molecular Cloning*. CSHL Press

Sauer M, Branduardi P, Valli M and Porro D (2004) Production of L-ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. *Appl Environ Microbiol* 70: 6086–6091.

Schulte D, Burkhardt R, Musahl C, Hu B, Schlatterer C, Hameister H and Knippers R. (1995) Expression, phosphorylation and nuclear localization of the human PI protein, a homologue of the yeast Mcm3 replication protein. *J. Cell Sci.* 108: 1381 -1389.

Schwaneberg U, Schmidt-Dannert C, Schmitt J and Schmid DA (1999) Continuous Spectrophotometric Assay for P450 BM-3, a Fatty Acid Hydroxylating Enzyme, and Its Mutant F87A1. *Analytical Biochemistry* 269, 359–366.

Song JH, Murphy RJ, Narayan R and Davies GBH (2009) Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364: 2127–2139.

#### References

Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ and Stanley GA (2010) The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microb* 109: 13-24.

Steels EL, Learmonth RP and Watson K (1994) Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology* 140:69-576.



Domanda di Brevetto  
Per INVENZIONE INDUSTRIALE

Numero di domanda : RM2010A000062  
CCIAA di deposito: ROMA  
Data di deposito: 16/02/2010

A. RICHIEDENTE:

CONSORZIO DI RICERCHE APPLICATE ALLA  
BIOTECNOLOGIA, Codice fiscale: 00295050660,  
Indirizzo: Avezzano (AQ)  
Natura Giuridica: Persona Giuridica

C. TITOLO

SVILUPPO DI UNA CELL FACTORY PER LA PRODUZIONE  
DI GLUCOBRASSICINA

D. INVENTORE DESIGNATO

MAGNANI MAURO  
BARTOLUCCI ELENA  
PORRO DANILO  
BRANDUARDI PAOLA  
CODAZZI VERA  
DAMONTE GIANLUCA  
SCHIPPA GIOVANNI  
BIANCHINI STEFANO

E. CLASSE PROPOSTA

C12N – MICRORGANISMI ED ENZIMI; COMPOSIZIONI CHE  
LI CONTENGONO; COLTURA E CONSERVAZIONE DI  
MICRORGANISMI; TECNICHE DI MUTAZIONE GENETICA;  
MEZZI DI COLTURA

SVILUPPO DI UNA CELL FACTORY RICOMBINANTE PER LA PRODUZIONE DI  
GLUCOBRASSICINA

DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda la produzione di glucosinolati in cellule ospiti di lievito geneticamente modificate attraverso introduzione del materiale genetico capace di esprimere l'intero pathway biosintetico necessario alla loro sintesi (cell factory).

Stato della tecnica anteriore

I Glucosinolati sono importanti metaboliti secondari connessi alla difesa naturale e presenti in tutte le piante del gruppo delle *Brassicaceae*. I glucosinolati intatti hanno un'attività biologica limitata, ma la loro idrolisi porta alla formazione di un ampio range di prodotti di degradazione biologicamente attivi. Questi composti hanno differenti effetti sui patogeni che attaccano la pianta, e agiscono su molti organismi, quali virus, batteri e funghi, fino agli erbivori.

I glucosinolati sono maggiormente responsabili del caratteristico aroma e sapore che hanno gli ortaggi appartenenti all'ordine delle *Brassicaceae*. Si è anche notato che i glucosinolati possono avere un ruolo come agenti chemio-protettivi contro l'insorgenza di tumori.

Le *Brassicaceae* generalmente, sono ricche di sostanze potenzialmente chemioprotettive, e tra queste i Glucosinolati sono degli inibitori chimici della carcinogenesi [Fahey *et al.* (1997); Faulkner *et al.* (1998)] e gli indole -3- carbinoli sono molto efficaci contro il cancro della ghiandola mammaria [Cover *et al.* (1998); Cover *et al.* (1999)]. i glucosinolati sono sostituiti  $\beta$ -thioglucoside-N-hydroxysulfates (**Fig. 1**) derivati da alcuni aminoacidi;

In particolare, la Glucobrassicina è un glucosinolato indolico derivato dal triptofano e, sebbene non abbondante, esercita interessanti effetti farmacologici [Mikkelsen *et al.* (2002)]. Sembra che questi effetti siano connessi con alcuni suoi prodotti di degradazioni *in vivo*. Questi composti sono in grado di regolare lo sviluppo delle cellule tumorali modulando enzimi target, controllando l'apoptosi e bloccando il ciclo cellulare [Hayes *et al.* (2008)], effetti che conferirebbero alla glucobrassicina proprietà anticancerogene.

La domanda internazionale WO-A-03004619 (The Regent of University of California) descrive acidi nucleici da *Brassica* codificanti gli enzimi della biosintesi dei glucosinolati ed il loro uso per la produzione di piante geneticamente modificate, capaci di produrre alte quantità di glucorafanina e di sinigrina.

La domanda di brevetto WO-A-2009/106985 (University of Copenhagen) descrive la trasformazione di cellule ospiti attraverso introduzione nella cellula del materiale genetico necessario ad esprimere l'intero pathway biosintetico dei glucosinolati. Gli enzimi utilizzati in questo lavoro ed i loro corrispondenti geni sono ottenuti dal genere *Arabidopsis*. Scopo dell'invenzione oggetto della domanda WO-A-2009/106985 è l'ottenimento di piante geneticamente modificate, preferibilmente di tabacco (*Nicotiana benthamiana*), o di *Brassica*. La domanda ipotizza, tuttavia senza alcun supporto sperimentale, anche l'espressione in microrganismi geneticamente modificati.

Infine questa domanda contiene una sperimentazione essenzialmente limitata alla produzione di glucosinolati derivanti dall'aminoacido metionina, attraverso una fase preliminare di allungamento della catena laterale con ottenimento di di-omometionina, utilizzata poi come precursore. La stessa

domanda descrive la produzione di indol-3-il-metilglucosinolati in *Nicotiana benthamiana* trasformata geneticamente ed integrante un pathway biosintetico che consiste di sette passaggi metabolici controllati da altrettanti enzimi.

Scopo della presente invenzione è l'elaborazione di un nuovo procedimento di produzione del glucosinolato glucobrassicina o suoi precursori, che sia semplice, efficace e riproducibile rispetto ai procedimenti dell'arte anteriore.

#### **Sommario dell'invenzione**

La presente invenzione si fonda sulla scoperta che una *cell factory* di cellule di lievito modificate può essere vantaggiosamente utilizzata per la produzione di glucobrassicina.

L'invenzione si basa sulla trasformazione genetica di lieviti, il cui fenotipo naturale è incapace di produrre glucosinolati. La trasformazione avviene per introduzione nella cellula ospite di acido nucleico eterologo, capace d'essere espresso nella cellula ospite e di produrre il corredo enzimatico responsabile dell'intero *pathway* biosintetico della glucobrassicina o di una sua parte.

Pertanto oggetto di una prima forma di realizzazione dell'invenzione riguarda un metodo di modificazione genetica di cellule di lievito, che prevede l'introduzione nella cellula ospite del materiale nucleico eterologo in forma di uno o più vettori o cassette d'espressione comprendenti sequenze nucleotidiche codificanti uno o più polipeptidi funzionali ad attività enzimatica responsabili per la totalità o solamente per una parte del *pathway* biosintetico della glucobrassicina.

In una seconda forma di realizzazione, il *pathway* biosintetico della glucobrassicina consiste in cinque enzimi appartenenti alle seguenti famiglie: CYP79s, CYP83s, C-S liasi, UDP-glucosil transferasi, sulfotransferase, e il materiale nucleico eterologo comprende sequenze nucleotidiche codificanti tali cinque enzimi.

In particolare dette sequenze nucleotidiche codificano uno o più dei seguenti polipeptidi aventi attività enzimatica equivalente a quella degli enzimi: CYP79B1, CYP83B1, SUR1, UGT74B1, AtST5a.

In una terza forma di realizzazione dette sequenze nucleotidiche sono ottenute da piante del genere *Brassica*.

In una quarta forma di realizzazione la cellula di lievito appartiene al genere *Saccharomyces* o al genere *Pichia*.

In una quinta forma di realizzazione dette sequenze nucleotidiche sono integrate stabilmente nel genoma della cellula di lievito, o introdotte in maniera transiente nella cellula di lievito.

In un'ulteriore forma di realizzazione, detto materiale nucleico comprende sequenze nucleotidiche aggiuntive codificanti per uno o più polipeptidi con attività enzimatica capaci di modificare la molecola della glucobrassicina.

Un secondo oggetto della presente invenzione sono cellule di lievito comprendenti sequenze nucleotidiche eterologhe codificanti uno o più polipeptidi con attività enzimatica responsabile per la totalità o per una parte del *pathway* bio-sintetico della glucobrassicina.

In particolare cellule di lievito capaci di produrre glucobrassicina, un suo intermedio o un suo derivato ottenibile mediante il metodo secondo l'invenzione.

Altri oggetti dell'invenzione sono acidi nucleici isolati da pianta del genere *Brassica* aventi sequenza nucleotidica scelta tra SEQ ID NO: 33, 35, 37, 39, 41 o una loro variante con percentuale d'identità almeno del 98%. Vettori di clonaggio o di espressione in lievito comprendenti tali acidi nucleici legati in maniera operativa con sequenze di controllo della loro replicazione ed

espressione. Cellule ospiti comprendenti gli stessi vettori o gli acidi nucleici. Oligonucleotidi aventi sequenza SEQ ID NO: 1 a 20 e SEQ ID NO: 23 a 32.

Ulteriori oggetti dell'invenzione sono le cellule di lievito modificate per uso come medicamento o come nutraceutico; composizioni farmaceutiche o alimenti comprendenti le stesse cellule e uno o più eccipienti e/o veicolanti farmaceuticamente accettabili o un mezzo idoneo per l'alimentazione.

Oggetto dell'invenzione è anche un metodo di produzione della glucobrassicina, o di un suo precursore o suo derivato, comprendente un passaggio in cui cellule di lievito modificate sono poste in coltura in un mezzo idoneo alla crescita di lieviti; ovvero un metodo comprendente passaggi addizionali in cui le cellule di lievito sono separate dal mezzo di coltura ed opzionalmente lisate, ed in cui la glucobrassicina è ottenuta nel mezzo di coltura o nel lisato cellulare; in particolare un metodo comprendente un passaggio addizionale di estrazione e purificazione della glucobrassicina o suo precursore o suo derivato.

Infine, oggetto dell'invenzione è un metodo per la determinazione della concentrazione di glucosinolati in un campione attraverso la tecnica HPLC-ESI-TRAP-MS (*high performance liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry*) comprendente i passaggi in cui si prepara una soluzione del campione da analizzare in un solvente idoneo per HPLC; la soluzione è caricata su colonna HPLC ed eluita con una miscela di 0.1% di acido formico (FOA) in acqua; come eluente A, e 0.1% di FOA in aceto nitrile, come eluente B, con gradiente crescente a step, da 2% a 20% e a 52%, di eluente B; le frazioni eluite con 20-52% di eluente B sono sottoposte a spettroscopia di massa tipo *electrospray ion trap mass spectrometry*.

L'ingegnerizzazione di microorganismi può essere considerata la scelta d'elezione per la produzione di biomolecole presenti normalmente in *Brassicaceae*. L'introduzione del *pathway* biosintetico in microorganismi e lo scale up della produzione in bio-reattori offre indiscussi vantaggi quali:

- Una maggiore quantità di glucosinolati rispetto all'estrazione da fonti naturali;
- La produzione di un singolo glucosinato;
- Un più facile ed eco-sostenibile processo *dowstream*;
- Una conoscenza più approfondita della biosintesi dei glucosinolati.

In particolare, il metodo alternativo qui proposto, cioè la produzione di glucobrassicina mediante lieviti geneticamente modificati, offre il vantaggio del basso costo dei componenti dei mezzi di coltura, l'indipendenza dalla stagionalità degli ortaggi, la produzione in continuo su larga scala e protocolli di estrazione standardizzati e facili. Al meglio della nostra conoscenza, la presente invenzione è il primo esempio che dimostra la produzione di glucosinolati mediante lieviti ricombinanti.

#### **Breve descrizione delle figure**

Figura 1. La figura illustra la struttura chimica di un glucosinato. Il gruppo R rappresenta il residuo aminoacidico.

Figura 2. La figura illustra schematicamente il pathway biosintetico in *B. oleracea* Var. *Botrytis* della glucobrassicina e le strutture di tutti gli intermedi. Il primo e il secondo step sono catalizzati da due CYP 450, vale a dire Cyp79B1 Cyp83B1. Cyp79B1 converte il Triptofano in Indole-3-acetoalossima che è immediatamente trasformato in S-(indolylmethylthiohydroximoyl)-L-cysteine

per opera del Cyp83B1; nel terzo step il thiohydroximate è formato da una C-S liasi ed in seguito l'UDP-Glucosiltransferasi catalizza la sua conversione in desulfoglucosinolato. L'ultimo enzima, una sulfo-trasferasi, catalizza la sulfonazione con la conseguente formazione di Glucobrassicina.

**Figura 3.** La figura illustra gli effetti dei glucosinolati intatti sulle cellule di *S. cerevisiae* cresciute in terreno ricco completato (YPD). Le cellule sono state inoculate alla medesima OD<sub>660</sub> in mezzo YPD in presenza di concentrazioni crescenti di una miscela di glucosinolati, (da 4 a 100µg/µL), e incubate a 30°C in agitazione vigorosa. dopo 24 ore di crescita è stata misurata l'OD<sub>660</sub> e comparata con la crescita del lievito in assenza di glucosinolati.

**Figura 4.** Produzione di Glucosinolati in estratti cellulari di *S. cerevisiae* in seguito alla crescita in terreno minimo senza (A) e in presenza (B) di triptofano (200mg/L). La produzione è espressa come µg/mL di estratto cellulare e la densità cellulare è stata normalizzata (cellule/ml) tramite lettura della Densità Ottica (OD) a 660nm. I dati riguardanti la produzione del ceppo di controllo sono nella prima posizione del grafico. La Glucobrassicina è stimata mediante la reazione con ferricianide [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> e i prodotti di degradazione alcalina su estratti cellulari prelevati a 24 h e a 48 h

**Figura 5.** Cromatogramma della corrente ionica totale (Total ion current chromatogram ) (A) dell'analisi HPLC-MS dei glucosinolati totali estratti da semi di rapa (*Brassica Napus*). In B è mostrato il cromatogramma della corrente ionica estratta (Extracted Ion Chromatograms) corrispondenti ai glucosinolati trovati. Il picco indicato come ione 447 [M-H]<sup>-</sup> è quello relativo alla glucobrassicina.

**Figura 6.** Cromatogramma TIC (A) dell'analisi HPLC-MS degli estratti da *S. cerevisiae* Clone 4 e 5, cresciuti su terreno YEPD per 48 h con o senza triptofano. In B è stato visualizzato il cromatogramma EIC corrispondente ai glucosinolati trovati.

**Figura 7.** Costruzione di tutti i vettori d'espressione batterica; (A) Cyp 79B1 è stato tagliato con Nco I e Bam HI con ottenimento di due frammenti. Per primo poi è stato clonato il frammento con estremità Nco I-Bam HI nel plasmide pEt 3d. Una volta confermato il giusto inserimento si è proceduto a clonare anche il frammento con estremità Nco I.

(B) Cyp83B1 e il plasmide pEt 3d sono stati tagliati con Nco I- Bam HI e poi ligati insieme.

(C) C-S Lyase e il plasmide pEt 9a sono stati tagliati con Nde I- Bam HI e poi ligati insieme.

(D) UGT e il plasmide pEt 9a sono stati tagliati con l'enzima Nde I e poi ligati insieme.

(E) Sulfo-Transferase è stata tagliata con gli enzimi Nco I- Bgl II, mentre il plasmide pEt 9a è stato tagliato con la coppia Nco I- Bam HI infine sono stati ligati insieme.

**Figura 8:** Costruzione di tutti i vettori d'espressione in lievito; (A), (B), (C).

#### **Descrizione dettagliata dell'invenzione**

##### **Gli enzimi responsabili della biosintesi della glucobrassicina**

Il pathway biosintetico della glucobrassicina comprende cinque stadi di conversione enzimatica che partendo dal substrato L-triptofano giungono alla glucobrassicina.

Gli enzimi responsabili della biosintesi della glucobrassicina sono descritti di seguito.

Il primo ed il secondo enzima appartengono al gruppo degli enzimi Citocromo P450 (CYP450). Il primo appartiene alla famiglia degli enzimi ad attività N-idrossilasica, e converte il nucleo di triptofano ad indol-3-acetoaldoxima. Esempi di tali enzimi sono gli enzimi CYP79s, quali CYP79B1, CYP79B2, CYP79B3, CYP79A2 o enzimi funzionalmente equivalenti.

Il secondo enzima appartiene alla famiglia degli enzimi responsabili dell'introduzione di un gruppo sulfidrilico nella molecola, legando all'ossima una cisteina. L'enzima converte il substrato indol-3-acetoaldossima in S-(indolil-metil-tiodrossimoil)-L-cisteina. Esempi di tali enzimi sono gli enzimi CYP83s, quali CYP83B1, CYP83B3, CYP83B2 o enzimi funzionalmente equivalenti.

Il terzo enzima appartiene alla famiglia delle C-S liasi che produce l'intermedio indolil-metil-tiodrossamato. Componente unico di tale categoria è rappresentato da SUR 1; infatti, a fronte di una elevata variabilità di enzimi per i primi due steps della sintesi dei glucosinolati, è presente un unico enzima capace di convertire tutti gli idrossimoil-L-Cisteina in tiodrossimato, indipendentemente dalla catena laterale.

Il quarto enzima appartiene alla famiglia degli enzimi ad attività glucosil-transferasi, precisamente una UDP-glucosil transferasi che converte l'intermedio indolil-metil-tiodrossamato a indolil-metil-desulfoglucosinolato. Esempi di tali enzimi sono gli enzimi UGT74s, quali UGT74B1, oppure UGT74C1, anche se di quest'ultimo non è stato ancora pienamente capito il suo ruolo nella sintesi dei glucosinolati. [Gachon *et al.* (2005)]

Il quinto enzima appartiene alla famiglia degli enzimi ad attività sulfotransferasica, e produce il prodotto finale, vale a dire la glucobrassicina (anche detta indolilmetil-glucosinolato o indol-3-il-metil-glucosinolato). Esempi di tale famiglia sono gli enzimi del gruppo AtST5s, quali AtST5a, AtST5b e AtST5c, o enzimi funzionalmente equivalenti. [Grubb *et al.* (2006),]

Per enzima funzionalmente equivalente ad un enzima di riferimento si intende un enzima che pur avendo sequenza polipeptidica differente da quella dell'enzima di riferimento è capace di eseguire la stessa trasformazione chimica dello stesso substrato, se pur con rese ed in condizioni operative differenti.

Opzionalmente, il prodotto finale, glucobrassicina, può essere ulteriormente modificato sul nucleo indolico, per esempio per introduzione di un radicale alchile o alcossi minore, quale un gruppo metile, etile, metossi o etossi in posizione 4, 5, 6 o 7 del nucleo indolico. A tale scopo si possono utilizzare enzimi noti per esempio della famiglia CYP81s, quale un enzima CYP81F, o enzimi funzionalmente equivalenti.

#### **Le specie appartenenti alla famiglia Brassicacee.**

Benché il materiale genetico utilizzabile nella presente invenzione possa essere ottenuto da qualsiasi pianta della famiglia delle *Brassicaceae* (anche dette *Cruciferae*) (per esempio cavolo, cavolo di Brussels, rapa, cavolfiore, broccoli, colza, etc), nella misura in cui tale materiale è capace d'essere espresso in cellula di lievito, gli enzimi utilizzati nella presente invenzione sono preferibilmente ottenuti da differenti specie, sottospecie e varietà appartenenti al genere *Brassica*.

Esempi di specie utilizzabili sono ad esempio *B. oleracea*, *B. nigra*, *B. rapa*, *B. napus*, *B. carinata*, *B. Juncea*, *B. carinata*, *B. juncea*, *B. napus*.

Sottospecie o Varietà preferite sono per esempio *B. oleracea* var. *Botrytis*, *B. oleracea* var. *Italica*, *B. oleracea* var. *Capitata*, *B. oleracea* var. *Viridis*, *B. oleracea* var. *Gemmifera*.

#### **Geni codificanti per uno o più polipeptidi coinvolti nel *pathway* bio-sintetico della glucobrassicina.**

Il materiale nucleico eterologo usato nel metodo dell'invenzione comprende i geni codificanti per uno o più polipeptidi coinvolti nel *pathway* biosintetico della glucobrassicina o di suoi derivati, da qui in poi definiti come geni d'interesse.

Sono geni d'interesse, idonei per la realizzazione dell'invenzione, tutte le sequenze polinucleotidiche, varianti o frammenti che codificano per polipeptidi con un'attività enzimatica compresa nel *pathway* biosintetico della glucobrassicina o di suoi derivati.

Ad esempio sono geni d'interesse, i geni che codificano per gli enzimi CYP79s, quali CYP79B1, CYP79B2, CYP79B3, CYP79A2, i geni che codificano per gli enzimi CYP83s quali CYP83B1, CYP83B3, CYP83B2, i geni che codificano per gli enzimi C-S liasi, quale SUR1, i geni che codificano per gli enzimi UDP-glucosil transferasi, quali UGT74B1, i geni che codificano per gli enzimi AtST5s, quali AtST5a. Opzionalmente, i geni che codificano per gli enzimi CYP81s.

Enzimi come il CYP81F2 (At5g57220 gene entry: NM\_125104.2 GeneID:835828) sono responsabili delle modificazioni secondarie dei glucosinolati; in questo caso il CYP81F2 partecipa alla regolazione dell'accumulo di due glucosinolati indolici, 4-hydroxy-indole-3-yl-methyl e 4-methoxy-indole-3-yl-methyl glucosinolate, essendo il responsabile della sintesi del primo dei due glucosinolati modificati, (4-hydroxy-indole-3-yl-methyl glucosinolate) [Pfalz M, *et al* (2009 )]

Gene ID	Gene name	Enzymatic activity
AT2G20610	AT2G20610	alkylthiohydroximate C-S lyase
AT5G57220	AT5G57220	CYP81F2 monooxygenase
AT1G18590	AtSOT17 indole-3-methyl-desulfoglucosinolate sulfotransferase	
AT1G74090	AtSOT18-	indolylmethyl-desulfoglucosinolate sulfotransferase
AT1G74100	AtSOT16	indole-3-methyl-desulfoglucosinolate sulfotransferase
AT1G24100	AT1G24100	UDP-glucose:thiohydroximate S-glucosyltransferase
AT4G31500	AT4G31500	CYP83B1 monooxygenase
AT4G39950	At4g39950	CYP79B2 tryptophan monooxygenase
AT2G22330	At2g22330	CYP79B3 tryptophan monooxygenase
AT1G62560	GS-OX3	5-methylthiopenylglucosinolate S-oxygenase
AT1G62540	GS-OX2	5-methylthiopenylglucosinolate S-oxygenase
AT1G65860	GS-OX1	5-methylthiopenylglucosinolate S-oxygenase
AT1G74090	AtSOT18	5-methylthiopenyl-desulfoglucosinolate sulfotransferase
AT1G18590	AtSOT17	5-methylthiopenyl-desulfoglucosinolate sulfotransferase
AT1G74100	AtSOT16	5-methylthiopenyl-desulfoglucosinolate sulfotransferase
AT1G24100	AT1G24100	UDP-glucose:thiohydroximate S-glucosyltransferase
AT2G20610	AT2G20610	alkylthiohydroximate C-S lyase
AT4G13770	AT4G13770	CYP83A1 6-methylthiohexanaldoxime monooxygenase
AT1G16410	AT1G16410	CYP79F1 trihomomethionine monooxygenase

#### Metodi d'ottenimento dei geni d'interesse

Nella misura in cui i geni sono noti e disponibili, questi possono essere isolati utilizzando sonde oligonucleotidiche da librerie di cDNA della specie di pianta d'interesse.

Librerie di cDNA e sonde oligonucleotidiche in grado d'ibridizzare con i geni d'interesse possono essere ottenute commercialmente o prodotte in modo ovvio con tecniche note al tecnico del settore (e.g. vedi Sambrook "Molecular Cloning" third edition Vol 2 capitoli 9, 10 e 11).

È anche possibile costruirsi una libreria di cDNA utilizzando kit presenti in commercio, ormai facilmente reperibili dalla maggior parte di ditte del settore biomolecolare come ad esempio cDNA library construction kit . invitrogen ecc. Esempi di librerie di cDNA o DNA genomico da cui è possibile ottenere i geni

d'interesse sono disponibili commercialmente specialmente per alcuni organismi come ad esempio per *Arabidopsis thaliana* (SuperScript™ *Arabidopsis* cDNA Library – Invitrogen).

In alternativa i geni possono essere ottenuti attraverso procedimenti di estrazione noti come di seguito descritti.

#### Estrazione RNA

I geni possono essere ottenuti come prodotto di retrotrascrizione e amplificazione (RT-PCR) di RNA totale estratto da pianta.

Il materiale di partenza per l'estrazione di RNA, e ottenimento del cDNA dei geni d'interesse, può essere rappresentato da molte porzioni della pianta come ad esempio foglie, fiori, fusto, radici e cotiledoni.

L'isolamento di cellule dal materiale vegetale può avvenire mediante una qualsiasi delle tecniche note all'esperto del settore. È possibile effettuare un'estrazione di RNA totale mediante uno qualsiasi dei kit presenti in commercio le cui condizioni operative sono riportate nelle istruzioni del fornitore. A titolo d'esempio è possibile partire da foglie cotiledonari di 15 giorni dalla data di germinazione ed utilizzare il kit commerciale QIAGEN RNeasy plant mini kit.

#### Retrotrascrizione ed Amplificazione dei geni d'interesse

I passaggi di retrotrascrizione dell'RNA a cDNA ed di amplificazione possono essere effettuati seguendo le procedure usuali, descritte per esempio in manuali di biologia molecolare ampiamente utilizzati in laboratorio.

A tale scopo sono stati disegnati *primer* specifici per i geni di interesse sulla base della loro sequenza nucleotidica. In una delle possibili forme di realizzazione dell'invenzione, i primer potranno essere quelli riportati nella Tabella 1 come SEQ ID NO: 1 a 10.

Tabella 1

Primer	Gene	Sequenza
Cyp 79 ATG	CYP79B1	5'-AAC ATG AAC ACT TTT ACC TCA AAC-3' SEQ ID NO: 1
Cyp 79 STOP	CYP79B1	5'-TCT CAC TTC ACC GTC GGG TA-3' SEQ ID NO: 2
Elisa STOP	CYP83B1	5'-CCA CAC CCC ATC ACG CCT GAT C-3' SEQ ID NO: 3
Elisa ATG	CYP83B1	5'-GGA TCT CTT ATT GAT TAT AGC CGG-3' SEQ ID NO: 4
C-S ATG	C-S lyase	5'-ATG AGC GAA GAA CAA CCA CAC GC-3' SEQ ID NO: 5
C-S Stop	C-S lyase	5'-TCA AAC CCA GAG CAT CCC CT-3' SEQ ID NO:6
TIOHATG	UGT	5'-ATG GCG GAA ACA ACA ACA AC-3' SEQ ID NO:7



TIO STOP	UGT	5'-TCA ATG TTT CTT CCC TAA ACT C-3' SEQ ID NO:8
S-TRANS ATG	Sulfo- transferase	5'-CCG CAA TGG AAT CAA AGA CAA-3' SEQ ID NO:9
S-TRANS STOP	Sulfo- transferase	5'-CCG CAC CAA ATA ACA GAA GGA-3' SEQ ID NO: 10

Inoltre, è possibile retrotrascrivere l'RNA isolato mediante l'utilizzo di kit commerciali. In questo caso l'esperto del settore dovrà semplicemente seguire le indicazioni del produttore.

Contestualmente all'amplificazione, si possono inserire nella sequenza nucleotidica dei geni amplificati siti di restrizione che affianchino l'intero gene, allo scopo di facilitarne l'inserimento in opportuni vettori di clonaggio o di espressione. A tale fine, potranno essere utilizzati primer contenenti la specifica sequenza nucleotidica riconosciuta dall'enzima di restrizione scelto, quali ad esempio quelli riportati in Tabella 2 come SEQ ID NO: 11 a 20.

Tabella 2

Primer	Gene	Sequenza
CYP 79 Nco 1	CYP79B1	5'- AGA TTA CCA TGG ACA CTT TTA CCT C-3' SEQ ID NO:11
CYP 79 BamH1	CYP79B1	5'-CCA GGA TCC GTG ATT TCT CAC TTC-3' SEQ ID NO:12
Cyp83ATG NcoIP	CYP83B1	5'-TGC AGA ATT CGC CAT GGA TCT C-3' SEQ ID NO:13
Cyp83STOP BamHI	CYP83B1	5'-GCT GGA ATT CGC GAT CCA CAT C-3' SEQ ID NO:14
2 csliasi ATG nde	C-S lyase	5'-CTG CAG AAT Tca tat Gag CGA AGA AC-3' SEQ ID NO:15
2 C-sliasi Bamhi	C-S lyase	5'-GTG TGC TGG GAT CCG GCT TCA AAC-3' SEQ ID NO:16
Tio ATG Nde I	UGT	5'- TA TCT GCA GAA TTC GGC ATA TGG CGG-3' SEQ ID NO:17
Tio STOP Nde I	UGT	5'- CAG TGT GCT GGc Ata tGG CTT TCA ATG-3' SEQ ID NO:18
S-Trans Nco I	Sulfo- transferase	5'-GAA TTC GGC ccA TGG AAT CAA AG -3' SEQ ID NO:19
S-TRANS Bgl II	Sulfo- transferase	5'- GGA TAT CTG CAG ATC TCG GCT TTC AG-3' SEQ ID NO:20

La fase di amplificazione mediante PCR è avviata aggiungendo allo stampo di cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione, una DNA polimerasi termostabile, (un enzima con attività 5'→ 3' polimerasica) in presenza di una o più coppie di primers specifiche per la/e sequenza/e di interesse che si desidera amplificare.

Dal momento che i primers impiegati per l'isolamento dei cDNA sono stati disegnati su sequenze depositate in bancadati, di geni omologhi appartenenti ad altre specie (e quindi con un'identità di

sequenza presunta intorno al 90%) le reazioni di RT-PCR eseguite sono state effettuate ad una temperatura di anealing piuttosto bassa (dai 45 ai 50 °C) per favorire l'attacco dei primers anche a sequenze non del tutto identiche

La reazione di RT-PCR per il CYP79B1 per esempio prevede il seguente protocollo di tempi e temperature:

50 °C per 30 minuti  
 94 °C per 15 minuti  
 94 °C per 30 secondi  
 45 °C per 30 secondi  
 72 °C per 2 minuti  
 72 °C per 7 minuti

} 30 cicli

Ciascun frammento di DNA è stato quindi purificato, sottoposto a digestione enzimatica con la coppia di enzimi appropriata (Tabella 3).

Tabella 3

Gene	Plasmide	Gene cut	Plasmid cut
CYP79B1	pET 3d	Nco I – Bam HI	Nco I – Bam HI
CYP83B1	pET 3d	Nco I – Bam HI	Nco I – Bam HI
C-S lyase	pET 9a	Nde I – Bam HI	Nde I – Bam HI
UGT	pET 9a	Nde I	Nde I
Sulfo-transferase	pET 3d	Nco I – Bgl II	Nco I – Bam HI

In una forma di realizzazione esemplificativa della presente invenzione, le sequenze nucleotidiche dei geni idonei e dei corrispondenti polipeptidi codificati sono di seguito rappresentate come:

SEQ ID NO 33 (seq. nucl. CYP79B1 di Brassica oleracea var Botrytis)

SEQ ID NO 34 (seq. pept. CYP79B1 di Brassica oleracea var Botrytis)

SEQ ID NO 35 (seq. nucl. CYP83B1 di Brassica oleracea var Botrytis )

SEQ ID NO 36 (seq. pept. CYP83B1 di Brassica oleracea var Botrytis)

SEQ ID NO 37 (seq. nucl. C-S liasi (SUR1) di Brassica oleracea var Botrytis)

SEQ ID NO 38 (seq. pept. C-S liasi (SUR1) di Brassica oleracea var Botrytis)

SEQ ID NO 39 (seq. nucl. UGT (UGT74B1) di Brassica oleracea var Botrytis)

SEQ ID NO 40 (seq. pept. UGT (UGT74B1) di Brassica oleracea var Botrytis )

SEQ ID NO 41 (seq. nucl. sulfo transferasi (AtST5a) di Brassica oleracea var Botrytis)

SEQ ID NO 42 (seq. pept. sulfo transferasi (AtST5a) di Brassica oleracea var Botrytis)

Tali sequenze sono nuove e sono state sequenziate dai presenti inventori

Le sequenze nucleotidiche dei geni di interesse possono presentare delle piccole differenze specie- o varietà-specifiche. Tuttavia tali geni sono altamente conservati nell'ambito dell'intera famiglia delle

Brassicacee. Per questo le sequenze aventi un livello di identità non inferiore al 90% o meglio al 95%, 98%, 98,5%, 99% o 99,5% rispetto alle sequenze SEQ ID NO 33, 35, 37, 39 e 41, sono da ritenersi idonee per la realizzazione della presente invenzione.

Esempi di sequenze omologhe alle SEQ ID NO 31 a SEQ ID NO 41 sono le sequenze:

Gene ID	Gene name
Cyp79B1	GU584124
Cyp83B1	GU584125
C-S_Lyase	GU584126
UGT	GU584127
Sulfo-Transferase	GU584128

#### Clonaggio/espressione in batteri

Le sequenze nucleotidiche dei geni di interesse ottenute come sopra descritto, possono essere, opzionalmente clonate, sequenziate ed eventualmente espresse all'interno di una cellula batterica ospite previo inserimento di dette sequenze nucleotidiche in vettori di clonazione e/o espressione.

Tali passaggi, benché opzionali ai fini dell'invenzione, consentono di confermare, in maniera più agevole rispetto ad altri sistemi, la correttezza delle sequenze nucleotidiche di interesse, isolate ed amplificate e la funzionalità dell'intera *cell factory*.

Per vettore di clonaggio si intende un vettore in grado di contenere tutte le sequenze di controllo e segnali necessari alla cellula ospite per moltiplicare le copie del frammento di DNA clonato. Ai fini della presente invenzione può essere utilizzato qualsiasi vettore di clonaggio o espressione noto al tecnico del settore in grado di permettere l'amplificazione in una cellula batterica delle sequenze dei geni di interesse ottenuti come prodotti di PCR.

Esempi di vettori di clonaggio utilizzabili per un inserimento diretto dei prodotti di PCR sono per esempio il vettore pDrive (Qiagen) e/o vettori appartenenti alla classe pCR (Invitrogen) come, ad esempio, il vettore pCR 2.1. La scelta di questi vettori presenta il vantaggio di un clonaggio immediato dei prodotti ottenuti mediante PCR. Vettori di espressione procariotici possono essere per esempio i vettori della classe pET.

L'utilizzo dei vettori di clonaggio, l'inserimento nel loro polylinker delle sequenze di interesse, e la trasformazione di cellule ospiti batteriche, sono operazioni sperimentali descritte puntualmente in manuali di laboratorio (e.g. vedi Sambrook "Molecular Cloning" third edition Vol 1 capitolo 1), o, nel caso di vettori commerciali e cellule ospiti commerciali, nelle indicazioni del fornitore.

Allo scopo di sequenziare i geni clonati, sono stati disegnati primer idonei tenendo conto della mappa del vettore utilizzato. Esempi di tali vettori sono riportati come SEQ ID NO: 21 a 32 in **tabella 4**.

tabella 4

Primer	Gene	Sequenza
M13 FORWARD	Plasmid pCR 2.1 and pDrive	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' SEQ ID NO:21

M13 reverse	Plasmid pCR 2.1 and pDrive	5'-AACAGCTATGACCATG-3' SEQ ID NO:22
T7	pET vector	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' SEQ ID NO:23
T7 terminator	pET vector	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' SEQ ID NO:24
79 seq F	CYP79B1	5'-GATCACCGTCACATGCCCTAAG-3' SEQ ID NO:25
79 seq R	CYP79B1	5'-GGAGGTTAAAGGCGGCGACAGG-3' SEQ ID NO:26
Cyp83 atg	CYP83B1	5'-AAATGGATCTCTATTGATTATAGCCG-3' SEQ ID NO:27
Cyp83 969 down	CYP83B1	5'-GCTTTCTTCATTGCTTCAGGG-3' SEQ ID NO:28
Cyp 83 UP2	CYP83B1	5'-AGACGAGACTCTTGACCCTAACCGC-3' SEQ ID NO:29
C-S 308 Primer F	C-S lyase	5'-CAATTCTTACTGTCCCGGAGCTG-3' SEQ ID NO:30
Tio seq	UGT	5'-T CGAAGGGTTAGAGACACAAGG-3' SEQ ID NO:31
309 S-TRANS	Sulfo-transferase	5'- GAACCCGCTCCTCAAACGTAACCC-3' SEQ ID NO:21

I primers di sequenza M13 forward, M13 reverse, T7 e T7 terminator sono sequenze commerciali e sono utilizzate per sequenziare frammenti di DNA clonato in un plasmide. Tutti gli altri primers sono stati disegnati su sequenze di Brassica oleracea var Botrytis ottenute con un walking sul gene. Altri primer alternativi possono essere facilmente disegnati, essendo nota la mappa dei vettori scelti. Il sequenziamento può essere effettuato, secondo metodologie ben note al tecnico del settore anche avvalendosi di sequenziatori automatici.

#### Clonaggio in vettori di espressione in lievito

I geni di interesse sono clonati in vettori idonei per l'espressione di proteine in lievito. Dopo ogni passaggio di clonaggio anche in vettori di espressione, i geni sono stati sequenziati per confermarne l'identità utilizzando idonei primers come quelli riportati in tabella 4 (in realtà i geni sono stati sequenziati prima del clonaggio nei plasmidi d'espressione).

L'inserimento di detti geni nello specifico vettore di espressione di lievito è reso possibile dalla presenza di siti di restrizione utilizzabili nel vettore di clonaggio che è stato fornito all'unità operativa responsabile del clonaggio in lievito.

Ai fini della presente descrizione con l'espressione "vettore di espressione" si intende un vettore in grado di garantire, per la presenza di opportune sequenze controllo, la trascrizione e la traduzione all'interno della cellula ospite del gene o dei geni di interesse in esso inseriti.

Esempi di vettori idonei per l'espressione in cellule di lievito utilizzabili a questo scopo sono: i vettori YEp (yeast episomal plasmid), i vettori YRp, (yeast replication plasmid), i vettori YAC (yeast artificial chromosome), i vettori YLp (yeast integrative plasmid) ed i vettori pYX, per esempio pYX012, pYX022 o pYX042.

I vettori YEp (yeast episomal plasmid) sono detti episomali e possiedono la capacità di replicarsi grazie alla presenza della sequenza 2 $\mu$ . I vettori YRp (yeast replication plasmid) sono anch'essi capaci di replicazione autonoma grazie alla sequenza ARS (autonomously replicating sequence). Gli YAC (yeast artificial chromosome) sono dei vettori lineari. I vettori YIp (yeast integrative plasmid) sono plasmidi di tipo integrativo, cioè plasmidi che contengono una particolare sequenza che permette la loro integrazione nel genoma del lievito stabilmente.

Un vettore idoneo per l'espressione in lievito potrà contenere diversi elementi quali ad esempio uno o più marcatori idonei per la selezione in lievito, uno o più sequenze di controllo quali promotori o terminatori, uno o più origini di replicazione.

Esempi di promotori utilizzabili a questo fine sono i promotori TPI (Trioso Fosfato Isomerasi) da *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, *Z. rouxii*, GAP (Gliceraldeide Fosfato Deidrogenasi) da *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, ADH (Alcol deidrogenasi, versione costitutiva) da *S. cerevisiae*, HXT (Trasportatore di Esosi, versione costitutiva) da *S. cerevisiae*, GAL1-10 (Galattochinasi, inducibile) da *S. cerevisiae*, per nominarne alcuni.

Esempi di marcatori utilizzabili sono i marcatori di selezione *URA3*, *LEU2*, *HIS3*, *TRP1*, *ADE2*, *MET1*, *LYS2*.

Ogni vettore di espressione può comprendere uno, due o più geni di interesse. Per esempio, tutti i geni che codificano l'intero pathway biosintetico possono essere inseriti in un unico vettore o in due, tre, quattro o cinque vettori di espressione.

In una forma di realizzazione dell'invenzione un primo vettore può comprendere i geni codificanti due enzimi del gruppo CYP450, per esempio CYP79B e CYP83B, un secondo vettore i geni codificanti gli enzimi ad attività C-S Liasica e UGTasica, ed un terzo vettore il gene dell'enzima ad attività sulfotransferasica o eventuali geni addizionali per l'ottenimento di derivati della glucobrassicina. Tuttavia, in altre forme di realizzazione, la distribuzione dei geni nei plasmidi di espressione può essere differente.

Ogni vettore contiene indipendentemente un promotore, per esempio il promotore *bTPI*, oppure il promotore *GAP*, ed un marcatore di selezione quale *URA3*, *HIS3*, o *LEU2*.

#### **Cellula ospite di lievito**

I vettori di espressione di lievito comprendenti i geni d'interesse sono usati per trasformare cellule ospiti di lievito (*cell-factory*).

La *cell-factory* è costituita da qualsiasi specie di lievito della famiglia delle *Saccharomycetaceae* del gruppo dei GRAS (Generally Recognized as Safe) dalla FDA USA e per la quale la glucobrassicina, un suo intermedio o un suo derivato non risultino tossici. Il tecnico del settore sarà in grado senza attività inventiva e sulla base della presente descrizione di selezionare la specie o ceppi di lievito idonei.

Esempi di specie idonee sono tutte le specie appartenenti al genere *Saccharomyces*, ad esempio le specie *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, *S. bayanus*, *S. rouxii*, *S. sake*, o *S. tavarum*, al genere *Pichia* ad esempio la specie *Pichia Pastoris*.

I lieviti vengono descritti, a titolo di esempio, nel seguente testo: N. J. W. Kreger-van Rij, "The Yeasts," Vol. 1 of Biology of Yeasts, Ch. 2, A. H. Rose and J. S. Harrison, Eds. Academic Press, London, 1987.

In una forma di realizzazione dell'invenzione, i generi di lievito utilizzabili, tra gli altri, possono essere *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Debaromyces*, *Nadsonia*, *Lipomyces*, *Torulopsis*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Trigonopsis*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Aureobasidium*, *Phaffia*, *Rhodotorula*, *Yarrowia*, o *Schwanniomyces*. Di preferenza il lievito verrà selezionato dai generi *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, o *Kluyveromyces*.

Vantaggiosamente possono essere usati ceppi di lievito modificati geneticamente in modo tale da essere resi auxotrofici, e quindi dipendenti per la crescita da un fattore, aminoacido o nucleotide, normalmente sintetizzato. L'incapacità del ceppo mutato di sopravvivere in un terreno privo di tale fattore è utilizzata come marcatore genetico metabolico per visualizzare la riuscita di esperimenti di trasformazione mediante un passaggio di selezione. Esempi di ceppi di lievito geneticamente modificati idonei sono GRF18U (*MATa*, *ura*; *leu2-3,112*; *his3-11,15*; *cir+*, Brambilla *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, **171**: 133–140), W3031B, BY4742 (EuroScarf Accession No. Y10000), CEN.PK strains 102-5B (*MATa*, *ura3-52*, *his3-11*, *leu2-3/112*, *TRP1*, *MAL2-8c*, *SUC2*) and 113-11C (*MATa*, *ura3-52*, *his3-11*, *TRP1*, *MAL2-8c*, *SUC2* - Dr. P. Kötter, Institute of Microbiology, Johann Wolfgang Goethe-University, Frankfurt, Germany).

Requisito essenziale della cellula ospite è la resistenza alla glucobrassicina o ai suoi derivati o ai suoi intermedi. A questo scopo, esperimenti preliminari hanno mostrato che i lieviti utilizzati come cellule ospiti nella presente invenzione, per esempio *S. cerevisiae*, sono in grado di crescere in presenza di una miscela di glucosinolati fino a concentrazioni di 100 ng/L<sup>-1</sup> senza significative differenze rispetto le colture controllo (vedi esempio 5 e Fig.3).

#### **Metodo di trasformazione delle cellule ospiti**

La trasformazione dei lieviti è effettuata seguendo metodi noti in letteratura in cui sono usati vettori d'espressione di lievito come precedentemente descritti comprendenti almeno un gene d'interesse.

Esempi di metodi di trasformazione che possono essere usati sono il metodo del litio acetato (LiAc/ssDNA/PEG, vedi Gitz e Woods 2002), dell'elettroporazione, degli sferoplasti. In particolare, il metodo del Litio Acetato sfrutta la destabilizzazione della membrana determinata da questo sale, in concomitanza ad uno shock termico, per favorire l'ingresso del DNA esogeno. L'ingresso viene veicolato da un frammento di acido nucleico a singolo filamento (nel caso si tratti di DNA, questo viene denaturato ed in seguito mantenuto a basse temperature fino al momento della trasformazione).

In una specifica forma di realizzazione, i vettori d'espressione prima di essere usati per la trasformazione possono essere linearizzati con idonei enzimi di restrizione, per favorirne l'integrazione, quali gli enzimi *StuI*, *BssHII*, *HpaI*, *BstXI* o altri.

Per esempio, il vettore pYX012 può essere linearizzato con l'enzima *StuI*, il plasmide pYX022 con l'enzima *BssHII*, il plasmide pYX042 con l'enzima *HpaI* o *BstXI*. In una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, la cellula ospite è trasformata con vari vettori d'espressione cumulativamente comprendenti tutti i 5 geni che compongono l'intero cammino biosintetico della glucobrassicina. In questo caso, la cellula esprime i cinque enzimi, per esempio CYP79B1,

CYP83B1, C-S liase, UGT e Sulfotransferase, che sintetizzano la glucobrassicina quando il mezzo di coltura contiene idonee quantità di triptofano.

In altre forme di realizzazione dell'invenzione, la cellula ospite è trasformata soltanto con gli ultimi quattro enzimi, oppure gli ultimi tre, o gli ultimi due o addirittura solo l'ultimo enzima del cammino biosintetico della glucobrassicina.

In questi casi, la cellula ospite è capace di produrre glucobrassicina solo se il mezzo di coltura comprende sufficienti quantità del corrispondente composto intermedio, come substrato di partenza. Per esempio quando la *cell factory* trasformata comprende solo quattro geni: CYP83B, C-S liasi, UGT e Sulfotransferasi il mezzo di coltura dovrà contenere come substrato l'indolo-3-acetoaldossima. Se la cellula ospite comprende solo tre geni: C-S liasi, UGT e Sulfotransferasi, il substrato sarà l'S(indolylmethylthio-hydroximoyl)-L-cysteine. Se i geni eterologhi sono i due finali, il substrato sarà l'indolil-metil-tioidrossimato o l'indolil-metil-desulfoglucosinolato nel caso in cui la cellula ospita contenga il solo gene dell'enzima Sulfotransferasi.

In alcune situazioni può anche essere utile produrre un prodotto intermedio della glucobrassicina: in questi casi la *cell factory* comprenderà solo i primi 4 geni del cammino biosintetico ed il prodotto finale è l'indolylmethyl-desulfoglucosinolato, oppure solo 3 geni ed il prodotto finale sarà l'indolil-metil-tioidrossimato, oppure solo due geni ed il prodotto finale sarà l'S(indolylmethylthio-hydroximoyl)-L-cysteine oppure un solo gene ed il prodotto finale sarà l'indolo-3-acetoaldossima.

#### **Crescita e selezione delle cellule trasformate di lievito**

Le cellule di lievito trasformate come descritto precedentemente sono sottoposte opzionalmente ad un passaggio di selezione. Come riportato sopra possono essere utilizzati ceppi di lievito modificati geneticamente in modo tale da essere resi auxotrofi, e quindi dipendenti per la crescita, da un fattore quale un aminoacido o un nucleotide, normalmente sintetizzato. L'incapacità del ceppo mutato di sopravvivere in un terreno privo del composto per cui è stato reso auxotrofo viene utilizzata come marcatore genetico metabolico per selezionare le cellule che hanno incorporato i geni d'interesse. Nel vettore, oltre ai geni di interesse per la trasformazione, sarà inserita una copia funzionante del gene mutato che determina l'auxotrofia nel ceppo; se il vettore viene quindi inserito nella cellula ospite, il prodotto del gene ripristinerà il fenotipo prototrofo evidenziando la riuscita della trasformazione attraverso uno screening su un terreno selettivo privo del nutriente necessario per la crescita del ceppo auxotrofo. A titolo d'esempio se si utilizzerà un ceppo di lievito che non è in grado di sintetizzare l'Uracile ed un vettore comprendente il gene per la sintesi dell'Uracile sarà utilizzato un terreno di selezione privo di Uracile. La scelta del terreno di selezione e delle condizioni operative dipenderà quindi dal ceppo di lievito e dal vettore d'espressione selezionato.

Usualmente, i trasformanti di lievito sono selezionati dopo crescita a 30°C per un periodo da 24 a 48 o a 72 h su piastre di terreno selettivo in seguito alla complementazione delle rispettive auxotrofie. A seguito della comparsa delle colonie i cloni indipendenti possono essere ripiastrati su terreno selettivo per un'ulteriore selezione.

L'effettiva incorporazione dei geni d'interesse nelle cellule di lievito può essere verificata ad esempio tramite PCR o analizzando la produzione di glucobrassicina di un suo intermedio o di un suo derivato.

Per ragioni di chiarezza è bene sottolineare che l'espressione "lievito trasformato" ha essenzialmente il medesimo significato di "lievito ricombinante". Il lievito trasformato può essere una

cellula che direttamente riceve il vettore utilizzato durante la trasformazione o anche la progenie di tale lievito.

#### **Metodo di ottenimento della glucobrassicina da cellule di lievito e purificazione**

Cellule di lievito modificate secondo l'invenzione sono coltivate in terreni di diverso tipo, ad esempio terreni complessi, sintetici o selettivi. Tipicamente le cellule sono coltivate in terreno YPD opportunamente integrato o in terreno minimo, contenenti triptofano o una fonte adeguata di triptofano. Concentrazioni idonee di triptofano nel terreno di crescita variano da 100 a 250 mg/L per esempio 110, 120, 130, 140, 150, 200, 210, 220 mg/L.

La glucobrassicina prodotta dalla *cell factory* dell'invenzione, o un suo precursore o derivato, può essere ottenuta dall'estratto cellulare. Le cellule ospiti sono separate dal mezzo di cultura, per esempio attraverso centrifugazione o filtrazione, e lisate utilizzando tecniche note quali la rottura meccanica, ultrasuoni, osmosi, pressione, in soluzione tampone, usualmente tampone fosfato a pH 7.

La separazione del surnatante dai frammenti cellulare è condotta attraverso centrifugazione, filtrazione, filtrazione su colonna cromatografica e tecniche equivalenti. Il surnatante contiene la glucobrassicina e può essere utilizzato in quanto tale o sottoposto ad ulteriore estrazione e purificazione della glucobrassicina stessa.

Alternativamente, la glucobrassicina può essere ottenuta per estrazione dal terreno di coltura con solventi idonei, quali metanolo, etanolo ect. e successiva purificazione. Nei due casi, il prodotto finale può essere purificato con tecniche cromatografiche quali la gel filtrazione, la cromatografia per scambio ionico, o la cromatografia per interazione idrofobica o per affinità. Il metodo di preparazione può comprendere un passaggio finale di essiccamento o di liofilizzazione.

Gli inventori, per esempio hanno impiegato queste due metodiche per reperire Glucobrassicina dalle cellule e dal terreno di crescita al fine di analizzarne il contenuto:

#### **Preparazione da pellet cellulari**

I campioni, pellet cellulari e semi omogenati, sono stati portati ad un volume di 2 ml con acqua, tale operazione è stata effettuata in ghiaccio, dove sono rimasti per circa 10 minuti, quindi è stato effettuato un ciclo di congelamento e scongelamento. 800 µl di tale soluzione sono stati prelevati e trasferiti in una provetta Corex® da 15 ml contenente 4 ml di acqua a circa 80 °C. L'estrazione è avvenuta in continua agitazione per 20 minuti, dopodiché il campione è stato centrifugato a 1500xg per 5 minuti. Il surnatante è stato separato dal fondo, contenente le cellule, tramite una siringa. Sulle cellule è stata fatta una seconda estrazione con 2 ml d'acqua per 15 minuti utilizzando le stesse condizioni riportate sopra. Anche questo campione è stato centrifugato a 1500xg per 5 minuti e il surnatante separato riunito a quello ottenuto in precedenza. Tale soluzione è stata filtrata con filtri da 0,2 µm Minisart® (Sartorius Stedim Biotech), posta in un pallone e portata a secco tramite evaporatore rotante. Si è ripreso il tutto con 3 ml di H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH (30:70) per valutare la presenza di una frazione proteica nel precipitato, quindi si è centrifugato a 1500xg per 5 minuti, il surnatante è stato recuperato e portato a secco con evaporatore rotante. Il residuo è stato ripreso con 2 ml d'acqua e caricata su colonnina SPE C18/scambio anionico Strata X-AW.

#### **Preparazione da mezzo di coltura**



Sono stati prelevati 10 ml di campione, posti in una provetta Corex® e centrifugati a 3000 rpm per 5 min. Il surnatante è stato separato dal fondo di colore bianco, quindi filtrato con filtri da 0,2 µm Minisart. Tale soluzione è stata ridotta con evaporatore rotante ottenendo un residuo oleoso giallo scuro. Il tutto è stato ripreso con 5 ml di H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH (30:70), nuovamente ridotto e successivamente ripreso con 2 ml d'acqua e caricata su colonna SPE C18/scambio anionico Strata X-AW.

#### **Metodo di identificazione e determinazione della concentrazione di glucosinolati**

La determinazione dei glucosinolati è eseguita mediante degradazione alcalina e reazione con ferricianide come descritto da Jezeck et al. (1999, "Determination of glucosinolates using their alkaline degradation and reaction with ferricyanide" *J. Agric. Food Chem.* 47:4669-4674)

Il metodo si basa sulla misura della reazione tra ferricianide e i prodotti derivati dalla degradazione alcalina dei glucosinolati. Il saggio è stato fatto su campioni di estratti cellulari, ottenuti mediante rottura meccanica delle cellule in buffer fosfato 0.2M at pH 7. Il metodo può essere ugualmente condotto su campioni del terreno di coltura. I campioni sono trattati con ferri cianite, dopo degradazione alcalina e quindi misurata l'assorbanza a 420 nm.

Alternativamente, la determinazione qualitativa/quantitativa dei glucosinolati e, nello specifico della glucobrassicina o suoi derivati, può essere eseguita col tecnica HPLC-ESI-TRAP-MS (high performance liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry).

Il campione da analizzare contenente glucosinolati ottenuti secondo il metodo dell'invenzione o attraverso altri metodi, per esempio da semi del genere Brassica, e deidratato e poi ridissolto in un solvente idoneo per l'HPLC, per esempio miscele acquose di solventi organici polari quali acido formico, acido trifluoroacetico o acetonitrile; il campione da analizzare può essere un lisato cellulare o un surnatante cellulare o un estratto vegetale. La separazione attraverso HPLC è effettuata con miscela acquosa di solvente organico in gradiente crescente di quest'ultimo su una colonna di tipo idrofobico. In un esempio di realizzazione la separazione in HPLC è eseguita utilizzando 0.1% di acido formico (FOA) in acqua come eluente A e 0.1% di FOA in aceto nitrile come eluente B. Il gradiente è stato mantenuto al 2% di B per qualche minuto, poi linearmente portato al 20% di B e successivamente al 52% di B. Infine l'eluente B ha raggiunto il 100% fino ad eluizione totale.

L'eluato dalla colonna è precipitato ed analizzato in spettrometria di massa del tipo *electrospray ion trap mass spectrometry* per visualizzare la presenza dei rapporti m/z aspettato per i glucosinolati e per ottenere pattern di frammentazione utili per la caratterizzazione strutturale.

La medesima procedura è stata applicata per analizzare sia le cellule che il surnatante: le cellule sono state raccolte e risospese in acqua (1/25 del volume di coltura approssimativamente), mentre son stati utilizzati 10 ml del medium di coltura.

#### **Formulazione delle cellule comprendenti la cell factory**

Le cellule di lievito contenenti la *cell factory* dell'invenzione possono essere utilizzate come medicamento, come nutraceutico o come reattori per la produzione di glucobrassicina.

È noto infatti che i glucosinolati quali la glucobrassicina hanno un'attività biologica, e che la loro idrolisi *in vivo* porta alla formazione di un ampio spettro di prodotti di degradazione biologicamente e farmacologicamente ancor più attivi, quali gli indolo-3-carbinoli. Questi composti hanno differenti effetti sui patogeni che attaccano la pianta, e agiscono su molti organismi, quali virus, batteri e funghi. Si è inoltre notato che i glucosinolati possono avere un ruolo come agenti chemio protettivi

contro l'insorgenza di tumori. In particolare, gli indolo-3-carbinoli, che derivano dal metabolismo *in vivo* della glucobrassicina, sono molto efficaci contro il cancro della ghiandola mammaria [Cover *et al.* (1998); Cover *et al.* (1999)].

A fine farmaceutico o alimentare, le cellule di lievito secondo l'invenzione sono formulate in qualsiasi tipo di composizione che ne preservi la vitalità e la funzionalità nel tempo. Le composizioni potranno essere in forma liquida, quali soluzioni, sospensioni, emulsioni, solida, per esempio una polvere o un granulato liofilizzati, o semisolida. Le cellule possono inoltre essere immobilizzate su un supporto solido che ne preservi la vitalità e permetta il loro uso continuativo, anche a livello industriale, come "reattori" per la produzione di glucobrassicina.

Composizioni farmaceutiche o alimentari potranno comprendere uno o più veicoli, diluenti e/o eccipienti farmaceuticamente accettabili o idonei all'alimentazione. Composizioni idonee per l'assunzione orale sono capsule, compresse, pasticche, tavolette, polveri, granuli, soluzioni, sospensioni emulsioni in liquidi acquosi o non acquosi, emulsioni olio in acqua o acqua in olio, schiume o battuti commestibili.

In particolare il mercato dei nutraceutici (functional foods), ovvero degli alimenti di uso comune e ben diffusi sul mercato e addizionati di sostanze con attività probiotica (siano essi singole molecole o interi organismi), rappresenta un ideale applicazione pratica; i prodotti formulati, sfruttando la glucobrassicina purificata come addizionante, potranno spaziare dagli yogurt, similmente a quanto presente già sul mercato con prodotti dedicati al controllo della ipercloestolemia tramite addizionamento di steroli vegetali, fino a marmellate o bevande e tisane. Inoltre la possibilità di poter raggiungere gradi di purezza intermedi rispetto alle formulazioni farmaceutiche garantisce il controllo dei costi di produzione e quindi la possibile diversificazione dei mercati di riferimento.

Le composizioni potranno contenere idonei agenti aromatizzanti, conservanti, disperdenti e coloranti. al fine di garantirne una buona attività biologica nei prodotti distribuiti, il mantenimento di questa attività nel tempo, caratteristiche sensoriali appetibili e la capacità di poter raggiungere il distretto corporeo nel quale esplicare la attività benefica.

Specifiche forme di realizzazione dell'invenzione sono descritte in maniera dettagliata nei seguenti esempi, che hanno semplice scopo illustrativo e non limitativo dell'ambito di protezione conferita.

#### **Esempio 1: Preparazione dei vettori per la trasformazione di cellule di lievito (FIG. 8A)**

##### **Preparazione dei promotori**

La sequenza del promotore *Z. bailii TPI* (Triose Phosphate Isomerase) è stata amplificata per PCR dal plasmide pZ<sub>3</sub>. Per l'amplificazione, sono stati utilizzati i seguenti primers:

TPI probe: 5'-TTT GTT ATT TGT TAT ACC GAT GTA GTC TCT-3'; SEQ ID NO: 43

ter Kpn: 5'-GGG GTA CCC CAG CTG GAG CTA GAC AAA GAC-3'. SEQ ID NO:44

L'amplificazione è stata ottenuta utilizzando la DNA polimerasi Pwo DNA (Roche). La temperature di annealing è stata settata su 55.8 °C ed il tempo di allungamento era di 2 minuti.

I frammenti di DNA ottenuti sono poi stati subclonati in un plasmide shuttle pSTBlue-1 utilizzando il Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen) e successivamente sequenziati per verificare la corretta amplificazione. Il frammento *bTPI* è stato ottenuto con un taglio *KpnI* del plasmide.

La sequenza del promotore di *P. pastoris GAP* è stata tagliata con una reazione enzimatica *BglII-HinII* dal vettore pGAPZ (Invitrogen) e sub-clonata nel vettore plasmidico shuttle pSTBlue-1,

utilizzando il kit Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen). Il plasmide pYX042gap è stato ottenuto mediante il rimpiazzo del TPI promoter di *S. cerevisiae* nel plasmide pYX042 (R&D Systems) con il promotore GAPr. Il promotore originale è stato tagliato con *EcoRI* blunted-*AatII* e il promotore GAP è stato esciso con *EcoRI* blunted-*SnaBI* dal plasmide pSTBlue-1gap.

#### **Costruzione del plasmide pYX012[CYP83 bTPI-CYP79] (FIG. 8A)**

Il gene CYP83B1 è stato exciso dal vettore pET3 (Novagen) utilizzando gli enzimi di restrizione *NcoI* e *BamHI*, quindi inserito nel vettore d'espressione per lievito pYX012 (R&D Systems, allegato 1, marcatore di selezione *URA3*) tagliato con gli stessi enzimi di restrizione. Il vettore così ottenuto è stato digerito con l'enzima *KpnI*, defosforilato e ligato con la sequenza corrispondente al promotore *bTPI* exciso mediante lo stesso enzima *KpnI* dal vettore pSTBluebTPI. Il vettore a questo punto è stato digerito con l'enzima *XbaI*, bluntato e defosforilato e ligato al gene CYP79B1, exciso mediante gli enzimi *BglII* e *BamHI* dal plasmide pET3, dopo aver anche in questo caso bluntato entrambe le estremità.

#### **Costruzione del plasmide pYX022[UGT bTPI-C-S lyase] (FIG. 8B)**

Il gene UGT è stato exciso dal vettore pCR2.1 (Invitrogen) attraverso l'enzima *EcoRI* quindi inserito nel vettore d'espressione per lievito pYX022 (R&D Systems, allegato 2, marcatore di selezione *HIS3*) linearizzato con lo stesso enzima di restrizione. Il vettore così ottenuto è stato digerito con l'enzima *KpnI*, defosforilato e ligato con la sequenza corrispondente al promotore *bTPI* exciso mediante lo stesso enzima *KpnI* dal vettore pSTBluebTPI. Il vettore a questo punto è stato digerito con l'enzima *XbaI*, bluntato e defosforilato e ligato al gene C-S lyase, exciso mediante gli enzimi *EcoRV* e *SpeI* dal plasmide pCR2.1, dopo esser stati entrambi bluntati.

#### **Costruzione del plasmide pYX042gap[Sulfo-Transferase] (FIG. 8C)**

Il gene Sulfo-Transferase è stato exciso dal vettore pET3 (Novagen) utilizzando gli enzimi di restrizione *NcoI* e *FspI* quindi inserito nel vettore d'espressione per lievito pYX042gap (R&D Systems, allegato 3, marcatore di selezione *LEU2*) tagliato con gli enzimi di restrizione *NcoI* e *SmaI*.

#### **ESEMPIO 2 (Trasformazione e selezione delle cellule di lievito)**

Il ceppo CENPK di *S. cerevisiae* è stato trasformato con tre distinti plasmidi integrativi descritti nell'esempio 1, recanti i 5 geni di pianta, codificanti per l'intero pathway biosintetico. La trasformazione del ceppo di lievito d CEN.PK di *S. cerevisiae* è stata eseguita seguendo il metodo del Litio Acetate/ssDNA, come descritta da by Gietz and Woods (2002), i vettori d'espressione, e i rispettivi vettori di controllo, sono stati linearizzati per favorirne l'integrazione nel corrispondente marcatore auxotrofico presente nel genoma in forma mutata, e quindi non funzionale; in dettaglio:

- pYX012 : *StuI*
- pYX012[CYP83 bTPI-CYP79]: *StuI*
- pYX022 : *BssHII*
- pYX022[UGT bTPI-C-S lyase]: *BssHII*
- pYX042gap: *HpaI*
- pYX042gap[Sulfo-Transferase]: *BstXI*

I trasformanti di lievito sono stati selezionati dopo crescita a 30°C per 48-72h su piastre di terreno selettivo in seguito alla complementazione delle rispettive auxotrofie. A seguito della comparsa delle colonie, 8 cloni indipendenti sono stati ristricciati sempre su piastre di terreno selettivo.

Da 6 trasformanti indipendenti sono state fatte le PCR di controllo per verificare l'inserimento dei geni di interesse, ed in seguito i trasformanti sono stati analizzati per le prove di produzione, valutate

tramite metodo spettrofotometrico. Da tali prove sono poi stati selezionati i tre ceppi migliori per le ulteriori analisi di produzione in HPLC.

### **ESEMPIO 3: Produzione e purificazione della glucobrassicina**

Metodi applicativi per la purificazione di glucobrassicina da colture di lievito sono paragonabili a quelle impiegate per l'analisi qualitativa della stessa e dei suoi intermedi.

#### **Purificazione tramite SPE C18/scambio anionico**

La purificazione di tutti i campioni è avvenuta tramite SPE C18/scambio anionico Strata X-AW (Phenomenex® Polymeric weak anion - Reversed Phase & Weak Anion Exchange), utilizzando tutto il campione a disposizione (2ml) per quanto riguarda "pellet cellulare e surnatante", e 100µl diluiti 10 volte con acqua per quanto riguarda i semi di colza e il rafano.

Il condizionamento della colonnina è stato effettuato con 3 ml di metanolo, la successiva operazione di equilibratura con lo stesso volume d'acqua. Dopo l'introduzione del campione sono stati eseguiti due lavaggi della colonna, prima con acqua e poi con metanolo, entrambi utilizzando un volume di 3 ml. L'eluizione è stata condotta con 5 ml di CH<sub>3</sub>CN:NH<sub>4</sub>OH (98:2), tale soluzione è stata portata a secco con evaporatore rotante, quindi il residuo è stato ripreso con 1,2 ml di H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (98:2).

#### **Analisi HPLC-MS**

Sono stati iniettati 50µl di campione derivante dai semi di colza e dal rafano e 100µl di campione derivante dai "pellet cellulari" e "dai surnatanti". La cromatografia è stata eseguita con un cromatografo HPLC Agilent® 1100 utilizzando come eluenti: A) H<sub>2</sub>O + 0,1 % FOA (acido formico), B) H<sub>2</sub>O + 0,1 % FOA. Nelle seguenti tabelle sono riportate le caratteristiche della colonna e i parametri operativi utilizzati:

Colonna cromatografia: Phenomenex® Jupiter 250x2,00 mm RP C18 5µm

Gradiente di eluizione (% di B): 0'-2%, 3'-2%, 8'-20%, 20'-35%, 23'-100%, 25'-100%

Temperatura colonna: 35 °C

Flusso: 300 µl/min

Volume d'iniezione: 100 µl

Lunghezze d'onda monitorate: 220, 260, 280 nm

Lo spettrometro di massa utilizzato è stato un Agilent® ion trap MSD 1100 con sorgente di ionizzazione elettrospray. L'analisi è stata effettuata in modalità ioni negativi utilizzando. I parametri operativi impiegati sono i seguenti:

Flusso "drying gas": 10,00 ml/min

Pressione "drying gas": 40 psi

Temperatura: 350 °C

Intervallo di acquisizione: 2-40 min

Range di m/z: 100-700 m/z

Tensione capillare: 3200 V

Tensione controlettrodo: -500 V

Tensione uscita del capillare: -90,0 V

Tensione "skimmer": -30,0 V

"Trap drive": 45,0 V

### **ESEMPIO 4: Ottenimento del DNA codificante**

### Materiale vegetale e preparazione dell'RNA

I semi di *Brassica oleracea* var. *Botrytis* sono stati seminati in normale terreno da semina e fatti germogliare. La crescita è stata approntata con un fotoperiodo di 16 h di luce e 8 h di buio.

0.1 g di foglie cotiledonari di 15 giorni dalla data della germinazione, sono poi state utilizzate come materiale di partenza per l'estrazione di RNA, effettuata con il kit Qiagen RNeasy plant min kit. Tutti gli estratti sono stati utilizzati o freschi oppure mantenuti a -80 °C.

### Isolamento dei geni

La sintesi del cDNA è stata fatta utilizzando il kit Qiagen One-step RT-PCR impiegando primers specifici per ciascun gene (Tabella 1).

Il DNA amplificato è stato inizialmente clonato come prodotto di PCR nei plasmidi pDrive (Qiagen) oppure pCR 2.1 (Invitrogen) e sequenziato per confermarne l'identità. I plasmidi pDrive e pCR 2.1 sono sostanzialmente molto simili, permettono infatti il clonaggio immediato di un prodotto di PCR. Il plasmide pDrive, commercializzato da Qiagen, è stato utilizzato per il clonaggio di Cyp 79B1 solamente; in seguito si è passato all'utilizzo del vettore pCR 2.1, utilizzato quindi per Cyp83B1, C-S Liasi, UGT e sulfotransferasi.

Per tutte le amplificazioni mediante PCR sono stati impiegati dei protocolli simili, variando semplicemente il tempo di estensione della replicazione del DNA e la temperatura di anealing.

Esempi di tali procedure sono riportati in tabella 5

Tabella 5

Gene	Coppia di primers	T anealing	Tempo di estensione
CYP79B1	SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 2	45 °C	2 minuti
CYP79B1	SEQ ID NO: 11 - SEQ ID NO: 12	50 °C	2 minuti
CYP83B1	SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 4	45 °C	2 minuti
CYP83B1	SEQ ID NO: 13 - SEQ ID NO: 14	52 °C	2 minuti
C-S lyase	SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 6	54 °C	1 minuto e 30 secondi
C-S lyase	SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 8	54 °C	1 minuto e 30 secondi
UGT	SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 8	52 °C	2 minuti
UGT	SEQ ID NO: 17 - SEQ ID NO: 18	54 °C	2 minuti
Sulfo-transferase	SEQ ID NO: 9 - SEQ ID NO: 10	52 °C	2 minuti
Sulfo-transferase	SEQ ID NO: 19 - SEQ ID NO: 20	50 °C	2 minuti

### Ceppi Batterici

Sono stati utilizzati per il presente lavoro i seguenti ceppi batterici di *E. coli*.

QianEz (Qiagen) e Top 10F' (Invitrogen) per il clonaggio di prodotti da PCR. Nova blue e BL21 DE3 (Novagen) sono stati impiegati per il clonaggio e poi l'espressione dei vettori pEt.

### Condizioni e terreni di crescita

I batteri sono stati cresciuti in terreno liquido LB broth (Tryptone 10 g/L, Yeast Extract 5g/L e NaCl 10 g/L, pH 7.5) con l'aggiunta del corretto antibiotico, cioè Ampicillina 100 mg/L per QianEz e Top 10F<sup>+</sup>, Ampicillina 50 mg/L per Nova blue e BL21 DE3 con il pEt 3d e Kanamicina 30 mg/L per Nova blue e BL21 DE3 con il pEt 9a. Tutte le crescite batteriche sono state effettuate a 37 °C.

#### **ESEMPIO 4: Sequenziamento**

Dopo ogni passaggio di clonaggio anche in vettori di espressione, i geni sono stati sequenziati per confermarne l'identità utilizzando i primers di Tabella 4.

Tutti i geni sono stati sequenziati da un ABI PRISM 310 Genetica Analyzer (Applied Biosystem), utilizzando il "Big Dye Terminator v 1.1, Cycle Sequencing" kit (Applied Biosystem) e sono stati impiegati sia i primers sul vettore che quelli gene specifici come mostrato nella tabella 4.

#### **ESEMPIO 5: Resistenza della cellula ospite ai glucosinolati.**

Esperimenti preliminari hanno dimostrato che *S. cerevisiae* è in grado di crescere in presenza di una miscela di glucosinolati fino a concentrazioni di 100 ng L<sup>-1</sup> senza differenze rimarchevoli rispetto le colture controllo (**Fig. 3**).

Il risultato è in linea con i dati precedentemente descritti in letteratura, in cui è stato riportato che la crescita di *S. cerevisiae* è ridotta dell'85% rispetto al valore del controllo quando viene aggiunto al medium di crescita della singrina (allylglucosinolate o 2-propenylglucosinolate, un glucosinolato alifatico) a concentrazioni di 100 mg L<sup>-1</sup> [Brabban and Edwards (1995)].

Esperimenti di tolleranza sono stati effettuati crescendo le cellule di lievito in YPD medium contenente 2% (w/v) glucosio, 2% tryptone, 1% yeast extract; nel terreno di crescita veniva quindi aggiunta o meno la miscela di glucosinolati. Dopo l'estrazione dei glucosinolati dai semi di rapa in commercio [Mellon et al., (2002)], la miscela di glucosinolati intatti è stata aggiunta in quantitativi crescenti: 4- 10- 25- 50-75- 100µg/mL.

Per testare la produzione di glucobrassicina, la coltura di trasformati indipendenti è stata fatta in YNB (1.34% w/v) terreno minimo (Yeast Nitrogen Base - DIFCO) con 5% (w/v) di glucosio; il triptofano è stato aggiunto ad una concentrazione finale di 200 mg/L. Le cellule di lievito sono state pre-coltivate in terreno minimo con glucosio e poi re-inoculate nei terreni indicati. La crescita dei lieviti è stata fatta sempre a 30 °C in shake flasks in agitazione vigorosa, come indicato.

#### **ESEMPIO 6: Procedure di preparazione di diversi tessuti per l'analisi dei glucosinolati**

##### **Estrazione da semi di colza [Brassica napus - ERM®-BC367]**

2 g di semi sono stati sminuzzati accuratamente in un mortaio di agata, quindi trasferiti in un becker contenente 50 ml di acqua alla temperatura di circa 80 °C. Tale operazione è stata svolta sotto continua agitazione per un tempo di 20 minuti. La soluzione di colore giallo intenso è stata filtrata sotto vuoto utilizzando filtri di carta Whatman® 540. I residui dei semi rimasti sul filtro dopo la filtrazione, sono stati sottoposti ad una seconda estrazione in un becker con 25 ml di acqua ad 80 °C per 15 minuti, sempre in agitazione costante. La soluzione filtrata è stata riunita e ridotta con rotavapor sino ad ottenere un olio molto denso di colore giallo scuro. Il residuo giallastro è stato ripreso con 5 ml di una soluzione H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH (30:70). La soluzione è stata centrifugata a 15000xg per 5 minuti per separare il precipitato formatosi dal surnatante limpido e di colore giallo chiaro. Infine 100µl di tale soluzione è stata portata ad 1ml con H<sub>2</sub>O e caricata su colonna SPE C18/scambio anionico Strata X-AW.

**Estrazione da radice di rafano [*Armoracia rusticana*]**

4 g di radice sono stati tagliati in pezzi molto piccoli e trasferiti in un becker con 100 ml di acqua a 80 °C. Questa operazione è stata effettuata in agitazione costante per 20 minuti. La soluzione è stata filtrata sotto vuoto utilizzando filtri di carta Whatman® 540, quindi la radice è stata sottoposta ad una seconda estrazione. Il rafano rimasto è stato sminuzzato accuratamente con un mortaio di agata, quindi la seconda operazione di estrazione è stata effettuata con 50 ml d'acqua a 80 °C per un tempo di 15 minuti. La soluzione ottenuta è stata filtrata come la precedente frazione, quindi i due filtrati ottenuti sono stati riuniti e ridotti di volume con evaporatore rotante. Il residuo risulta oleoso molto denso di color giallo scuro, questo è stato ripreso con 5 ml di H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH (30:70). La centrifugazione a 15000xg per 5 minuti ha permesso la separazione del fondo e del surnatante limpido di colore giallo intenso. Infine 100µl di tale soluzione è stata portata ad 1ml con H<sub>2</sub>O e caricata su colonna SPE C18/scambio anionico Strata X-AW.

**Estrazione da pellet cellulare**

I campioni sono stati portati ad un volume di 2 ml con acqua, tale operazione è stata effettuata in ghiaccio, dove sono rimasti per circa 10 minuti, quindi è stato effettuato un ciclo di congelamento e scongelamento. 800 µl di tale soluzione sono stati prelevati e trasferiti in una provetta Corex® da 15 ml contenente 4 ml di acqua a circa 80 °C. L'estrazione è avvenuta in continua agitazione per 20 minuti, dopodiché il campione è stato centrifugato a 1500xg per 5 minuti. Il surnatante è stato separato dal fondo, contenente le cellule, tramite una siringa. Sulle cellule è stata fatta una seconda estrazione con 2 ml d'acqua per 15 minuti utilizzando le stesse condizioni riportate sopra. Anche questo campione è stato centrifugato a 1500xg per 5 minuti e il surnatante separato riunito a quello ottenuto in precedenza. Tale soluzione è stata filtrata con filtri da 0,2 µm Minisart® (Sartorius Stedim Biotech), posta in un pallone e portata a secco tramite evaporatore rotante. Si è ripreso il tutto con 3 ml di H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH (30:70) per valutare la presenza di una frazione proteica nel precipitato, quindi si è centrifugato a 1500xg per 5 minuti, il surnatante è stato recuperato e portato a secco con evaporatore rotante. Il residuo è stato ripreso con 2 ml d'acqua e caricata su colonna SPE C18/scambio anionico Strata X-AW.

**Estrazione dal mezzo di coltura**

Sono stati prelevati 10 ml di campione, posti in una provetta Corex® e centrifugati a 3000 rpm per 5 min. Il surnatante è stato separato dal fondo di colore bianco, quindi filtrato con filtri da 0,2 µm Minisart. Tale soluzione è stata ridotta con evaporatore rotante ottenendo un residuo oleoso giallo scuro. Il tutto è stato ripreso con 5 ml di H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH (30:70), nuovamente ridotto e successivamente ripreso con 2 ml d'acqua e caricata su colonna SPE C18/scambio anionico Strata X-AW.

**ESEMPIO 7: Determinazione della concentrazione di glucosinilati in semi di pianta e da colture cellulari di lievito****Estrazione dei glucosinolati intatti da semi [Mellon et al. (2002)]**

- La mirosinasi è stata inattivata lasciando i semi in stufa a 100°C per 24h
- I campioni sono stati omogeneizzati in Metanolo 70% con mortaio e pestello
- Gli omogenati sono quindi trasferiti in tubi da 1.8 ml
- I tubi sono quindi riscaldati a 70°C per 30 min con agitazione ogni 5 minuti con vortex
- Dopo essere stati raffreddati i campioni sono centrifugati (17000rcf, 4°C, 15min)
- Il supernatante è stato rimosso, filtrato e portato a secco.

**Determinazione dei glucosinolati mediante degradazione alcalina e reazione con ferricianide [Jezeck et al. (1999)] (FIG. 4)**

Il metodo si basa sulla misura della reazione tra ferricianide e i prodotti derivati dalla degradazione alcalina dei glucosinolati. Il saggio è stato fatto su campioni di estratti cellulari, ottenuti mediante rottura meccanica delle cellule in buffer fosfato 0.2M at pH 7. Per ciascun campione, 50 µL di estratto cellulare è stato miscelato con un egual volume di NaOH (2 M) ed incubato a 30 minuti a temperatura ambiente. È stato quindi aggiunto a ciascun campione HCl concentrato al fine di neutralizzare la reazione; dopo la centrifugazione (13200 rpm, 6 minutes) il soprannatante è stato miscelato con un egual volume di ferricianide (2 mM in tampone fosfato 0.2 M, pH 7) ed è stata quindi misurata l'assorbanza a 420 nm entro 15 secondi contro tampone fosfato come riferimento.

Il contenuto dei glucosinolati totali è calcolato utilizzando una curva di calibrazione fatta con standard di singrina.

**Sviluppo di un metodo e misure HPLC-MS (Fig. 6 A-B)**

Un metodo HPLC-ESI-TRAP-MS (high performance liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry) per l'analisi quantitative dei glucosinolati (e nello specifico per la glucobrassicina) è stato messo a punto iniziando da semi di rapa (*Brassica napus*) [certificate del campione ERM-BC 366] utilizzando uno strumento a trappola ionica 1100 MSD HPLC-MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Dopo l'estrazione dei glucosinolati totali dai semi effettuata come riportato precedentemente, il campione deidratato è stato risospeso con 0.1% di acido trifluoroacetico (TFA) in acqua e ulteriormente purificato mediante separazione SPE-RP/scambio anionico debole (Phenomenex® Polymeric weak anion - Reversed Phase & Weak Anion Exchange). Brevemente ciascun campione da analizzare viene caricato su una colonna SPE, la colonna viene lavata con 3 volumi di colonna con metanolo e con 3 volumi di colonna con acqua. Dopo caricamento del campione la colonna viene lavata con acqua (3 volumi di colonna) e con metanolo (3 volumi di colonna). L'eluizione viene condotta con 5 ml di una miscela di acetonitrile:ossido di ammonio 98:2, l'eluato viene quindi portato a secchezza con evaporatore rotante, ed il residuo viene ripreso con 1,2 ml di una miscela di acqua:acetonitrile 98:2. per poter poi eseguire l'analisi mediante HPLC-MS. La separazione in HPLC è stata effettuata in gradiente su una colonna Phenomenex Jupiter RP-C18 250mm x 2.00 mm ID (5 µm particle size) utilizzando 0.1% di acido formico (FOA) in acqua come eluente A e 0.1% di FOA in acetonitrile come eluente B. Il gradiente è stato mantenuto al 2% di B per 3 minuti, poi linearmente portato al 20% di B in 8 minuti, al 35% di B in 12 minuti, al 100% di B in 3 minuti e mantenuto al 100% di B per 2 minuti. La temperatura della colonna è stata settata a 35 °C e il flusso è stato mantenuto a 300µl/min.

Il metodo di spettrometria di massa è stato sviluppato in *negative ion mode* accoppiando l'eluente dell'HPLC alla fonte ionica dell'electrospray (ESI) dello spettrometro di massa. Sia gli esperimenti di Full scan che quelli di MS<sup>2</sup> sono stati condotti per visualizzare la presenza dei rapporti m/z aspettato per i glucosinolati e per ottenere pattern di frammentazione utili per la caratterizzazione strutturale.

La medesima procedura è stata applicata per analizzare sia le cellule che il surnatante: le cellule sono state raccolte e risospese in acqua (1/25 del volume di coltura approssimativamente), mentre son stati utilizzati 10 ml del medium di coltura.

**ESEMPIO 8: Clonaggio nei vettori procariotici pET3d e pET9a**

La correttezza delle sequenze nucleotidiche clonate e polipeptidiche espresse è stata verificata in cellula batterica che rappresenta un sistema di più pratica e veloce elaborazione. Pertanto di seguito



è descritta la preparazione di vettori contenenti i geni di interesse idonei per il clonaggio e l'espressione in *E.coli*. Tali vettori non fanno parte della presente invenzione, ma sono semplici strumenti per la realizzazione pratica della stessa.

I cinque geni di interesse di Brassica, codificante gli enzimi appartenenti alla famiglia CYP79s, CYP83s, C-S liasi, UGT74s, AtST5s, isolati e amplificati come precedentemente descritto, sono inseriti all'interno di vettori di espressione procariotici. I vettori di espressione utilizzabili sono vettori della classe pET.

Ciascun gene di interesse è stato amplificato con la coppia di primer indicata in Tabella 1 e 2, contenenti o meno siti di restrizione, utilizzando preferibilmente una DNA proof reading al fine di minimizzare l'inserimento di errori durante la replicazione. Tutte le operazioni di purificazione, digestione enzimatica, l'inserimento nel polylinker dei frammenti di interesse e la trasformazione di cellule ospiti batteriche sono state eseguite seguendo protocolli ben noti all'esperto del settore (Sambrook "Molecular Cloning" third edition).

Il vettore di espressione contenete la/e sequenza/e nucleotidica codificante la/e proteine di interesse è successivamente utilizzato per trasformare un ceppo batterico. Ceppi batterici utilizzabili per l'espressione dei geni codificanti per enzimi appartenenti alla famiglia CYP79s, CYP83s, C-S liasi, UGT74s, AtST5s sono ceppi batterici di *E.coli* come, ad esempio, BL21DE3.

Una volta confermata la sequenza i geni sono stati clonati in vettori di espressione della famiglia dei vettori pEt (Novagen). Nella **tabella 2** sono indicate tutti i primers impiegati per inserire il sito di taglio sull'ATG e dopo il codon di stop. Ciascun gene è stato amplificato con la corretta coppia di primers utilizzando una DNA polimerasi proof reading (KOD XL DNA polymerase [Novagen]) al fine di minimizzare l'inserimento di error durante la replicazione. Ciascun frammento di DNA è stato quindi purificato, sottoposto a digestione enzimatica con la coppia di enzimi appropriata riportata in Tabella 3. La FIG.7A-B-C-D-E illustra schematicamente la struttura dei vari costrutti.

#### RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la modificazione genetica di una cellula di lievito comprendente un passaggio di introduzione in detta cellula di materiale nucleico eterologo, in cui detto materiale comprende sequenze nucleotidiche codificanti uno o più polipeptidi con attività enzimatica responsabile per la totalità o per una parte del *pathway* bio-sintetico della glucobrassicina.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1 in cui il *pathway* bio-sintetico della glucobrassicina consiste in cinque enzimi appartenenti alle seguenti famiglie: CYP79s, CYP83s, C-S liasi, UDP-glucosil transferasi, sulfotransferase, e in cui il materiale nucleico eterologo comprende sequenze nucleotidiche codificanti i detti cinque enzimi.
3. Metodo secondo le rivendicazioni 1 o 2 in cui dette sequenze nucleotidiche codificano uno o più dei seguenti polipeptidi aventi attività enzimatica equivalente a quella degli enzimi: CYP79B1, CYP83B1, SUR1, UGT74B1, AtST5a.
4. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3 in cui dette sequenze nucleotidiche sono ottenute da piante del genere *Brassica*.
5. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4 in cui detta cellula di lievito appartiene al genere *Saccharomyces* o al genere *Pichia*.
6. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, in cui dette sequenze nucleotidiche in plasmidi episomali, centromerici o multicopia.

7. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6, in cui detto materiale nucleico comprende sequenze nucleotidiche aggiuntive codificanti per uno o più polipeptidi con attività enzimatica capaci di modificare la molecola della glucobrassicina.
8. Cellula di lievito comprende sequenze nucleotidiche eterologhe codificanti uno o più polipeptidi con attività enzimatica responsabile per la totalità o per una parte del *pathway* biosintetico della glucobrassicina.
9. Cellula di lievito capace di produrre glucobrassicina, un suo intermedio o un suo derivato ottenibile mediante il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 7.
10. Acido nucleico isolato da pianta del genere *Brassica* avente sequenza nucleotidica scelta tra SEQ ID NO: 33, 35, 37, 39, 41 o una loro variante con percentuale d'identità almeno del 98%.
11. Vettori di clonaggio o di espressione in lievito comprendenti gli acidi nucleici secondo la rivendicazione 10 legati in maniera operativa con sequenze di controllo della loro replicazione ed espressione.
12. Cellule ospiti comprendenti i vettori della rivendicazione 11 o i gli acidi nucleici della rivendicazione 10.
13. Oligonucleotidi aventi sequenza SEQ ID NO: 1 a 20 e SEQ ID NO: 25 a 32.
14. Cellula di lievito secondo le rivendicazioni 8 o 9 per uso come medicamento o come nutraceutico.
15. Composizione farmaceutica comprendente cellula di lievito secondo le rivendicazioni 8 o 9 e uno o più eccipienti e/o veicolanti farmaceuticamente accettabili.
16. Alimento comprendente cellula di lievito secondo le rivendicazioni 8 o 9 in un mezzo idoneo per l'alimentazione.
17. Metodo di produzione della glucobrassicina, o di un suo precursore o suo derivato, comprendente un passaggio in cui cellule di lievito secondo le rivendicazioni 8 o 9 sono poste in coltura in un mezzo idoneo alla crescita di lieviti.
18. Metodo secondo la rivendicazione 17 comprendente passaggi aggiuntivi in cui le cellule di lievito sono separate dal mezzo di coltura ed opzionalmente lisate, ed in cui la glucobrassicina è ottenuta nel mezzo di coltura o nel lisato cellulare.
19. Metodo secondo la rivendicazione 18, comprendente un passaggio aggiuntivo di estrazione e purificazione della glucobrassicina o suo precursore o suo derivato.
20. Metodo per la determinazione della concentrazione di glucosinolati in un campione attraverso al tecnica HPLC-ESI-TRAP-MS (*high performance liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry*) comprendente i passaggi in cui:  
si prepara una soluzione del campione da analizzare in un solvente idoneo per HPLC;  
la soluzione è caricata su colonna HPLC ed eluita con una miscela di 0.1% di acido formico (FOA) in acqua; come eluente A, e 0.1% di FOA in aceto nitrile, come eluente B, con gradiente crescente a step, da 2% a 20% e a 52%, di eluente B;  
le frazioni eluite con 20-52% di eluente B sono sottoposte a spettroscopia di massa tipo *electrospray ion trap mass spectrometry*.

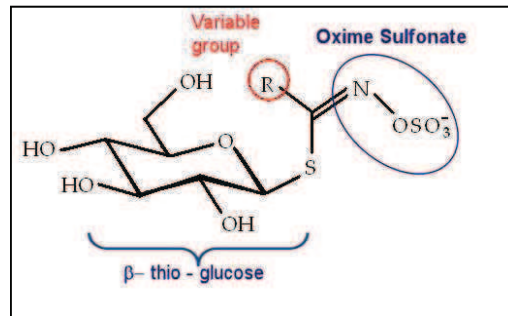


FIG.1

2/14

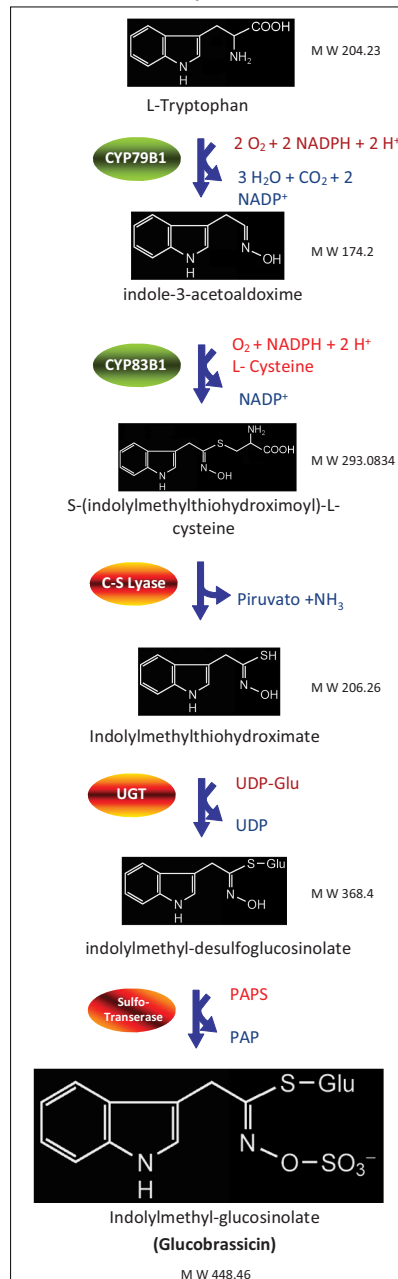


FIG.2

3/14

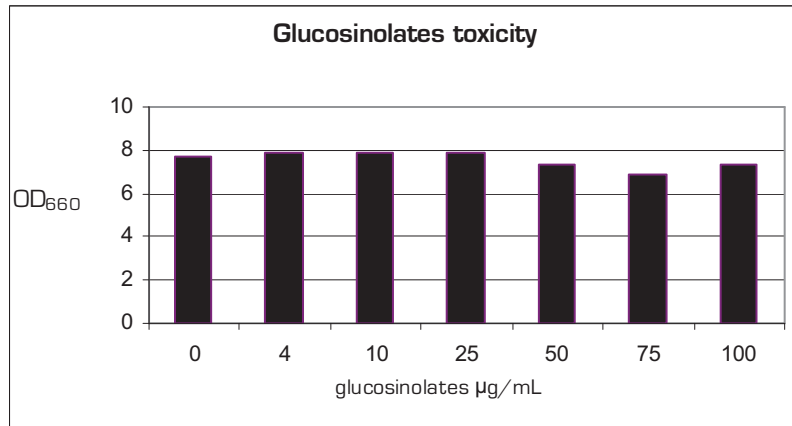


FIG. 3

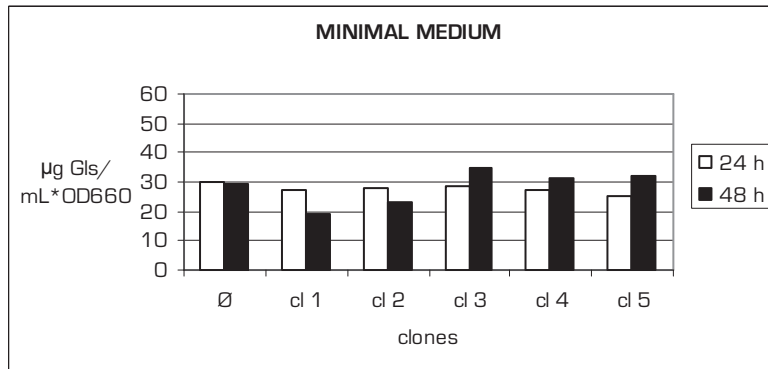
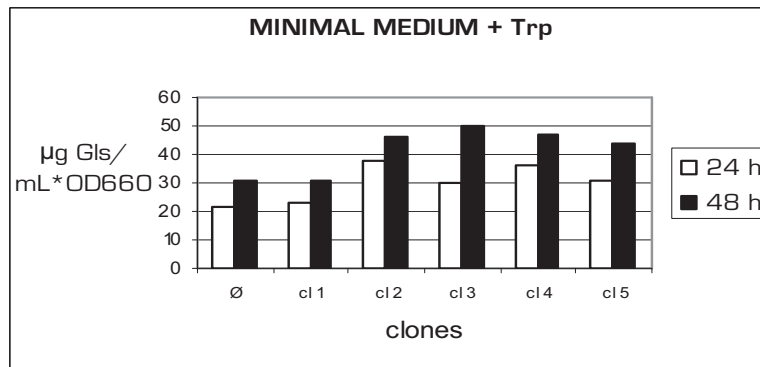
**A****B**

FIG. 4

5/14

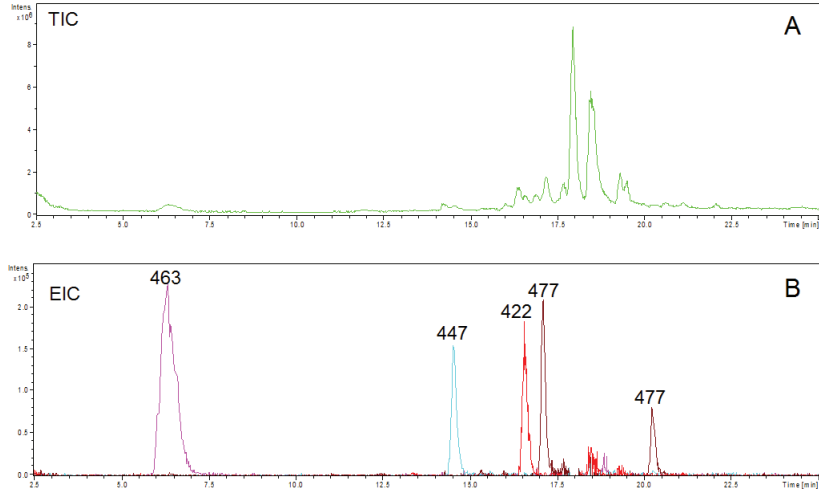


FIG.5

6/14

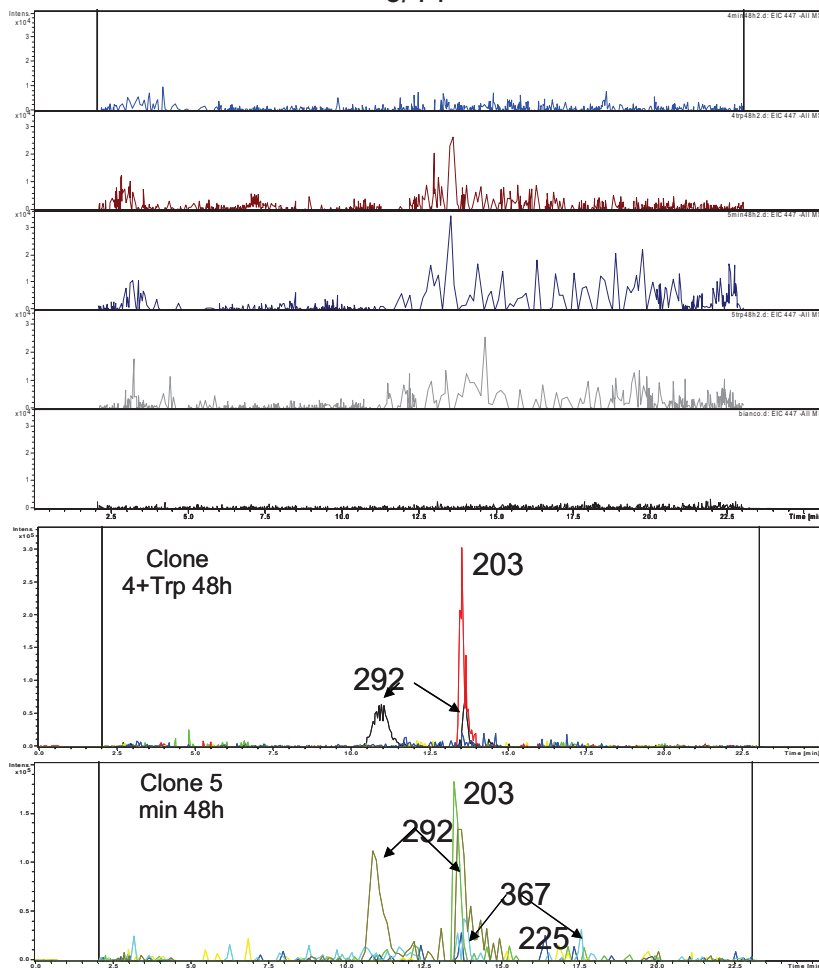


FIG.6



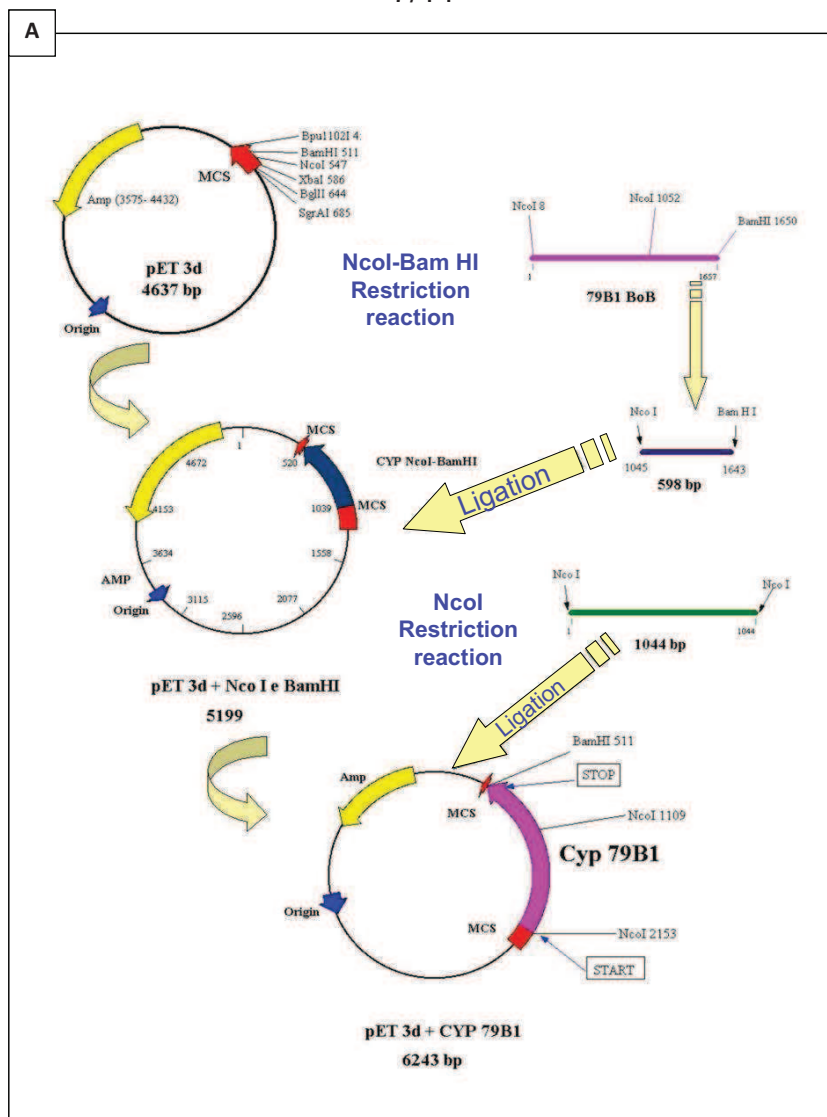


FIG. 7A

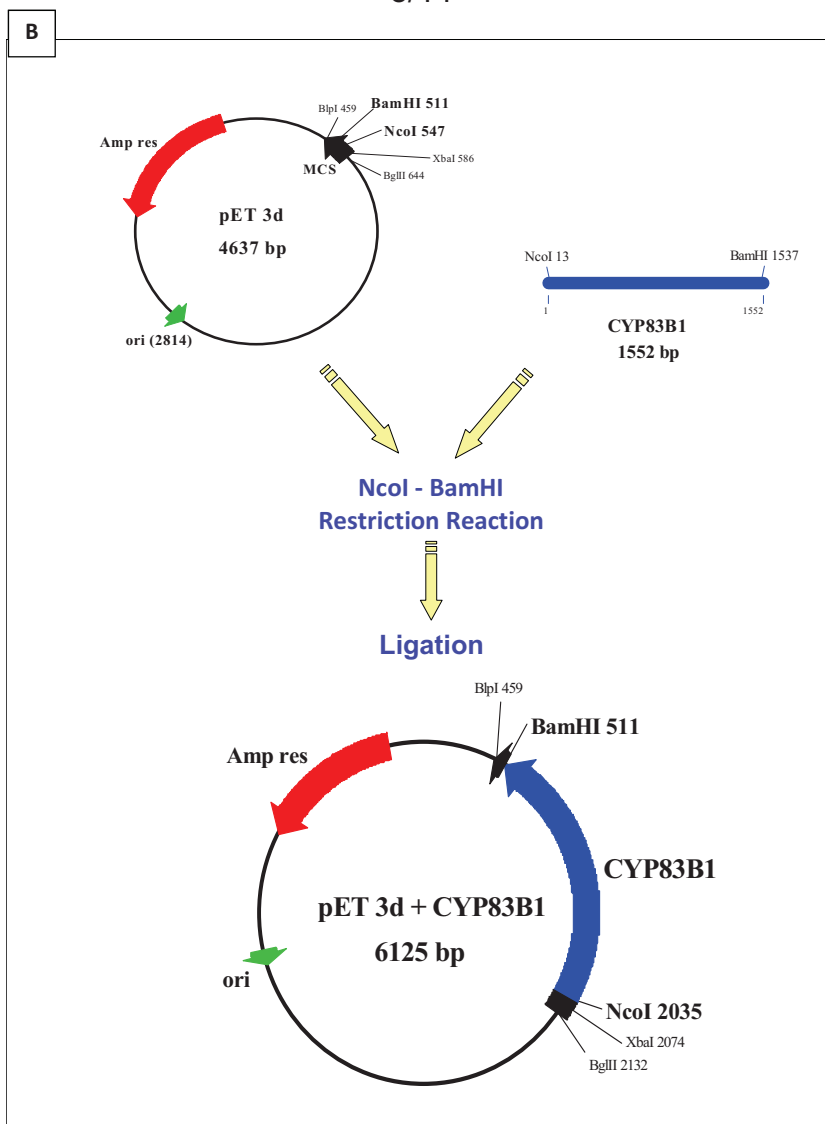


FIG. 7B

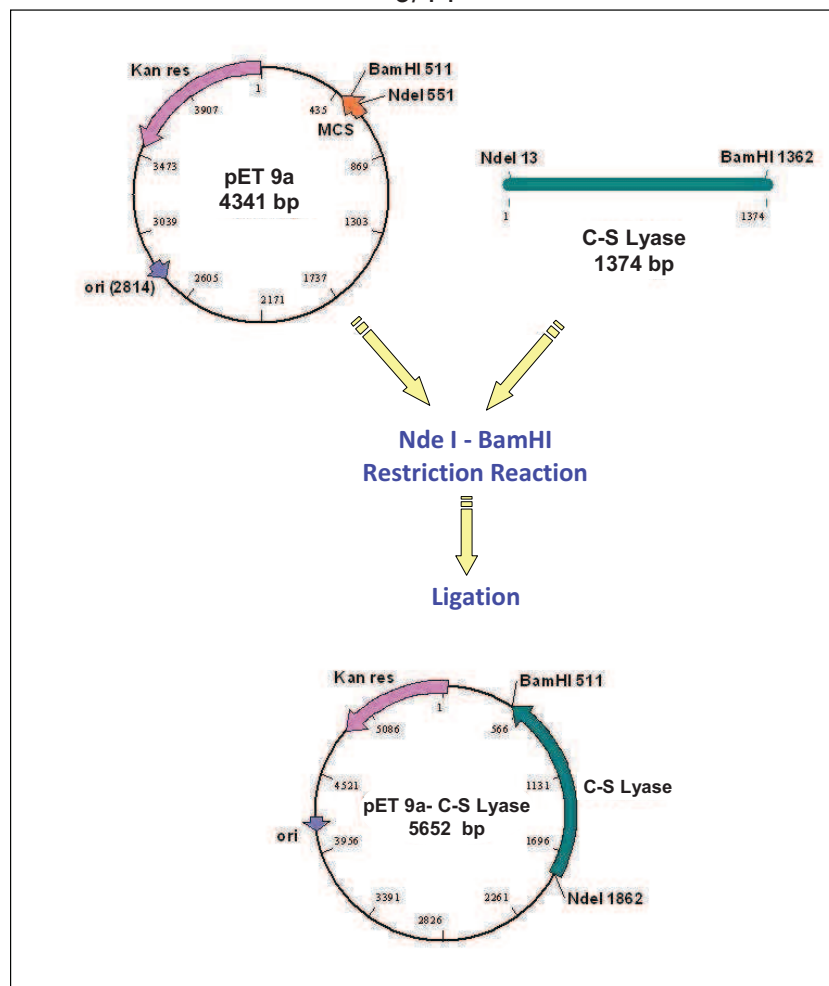


FIG.7C

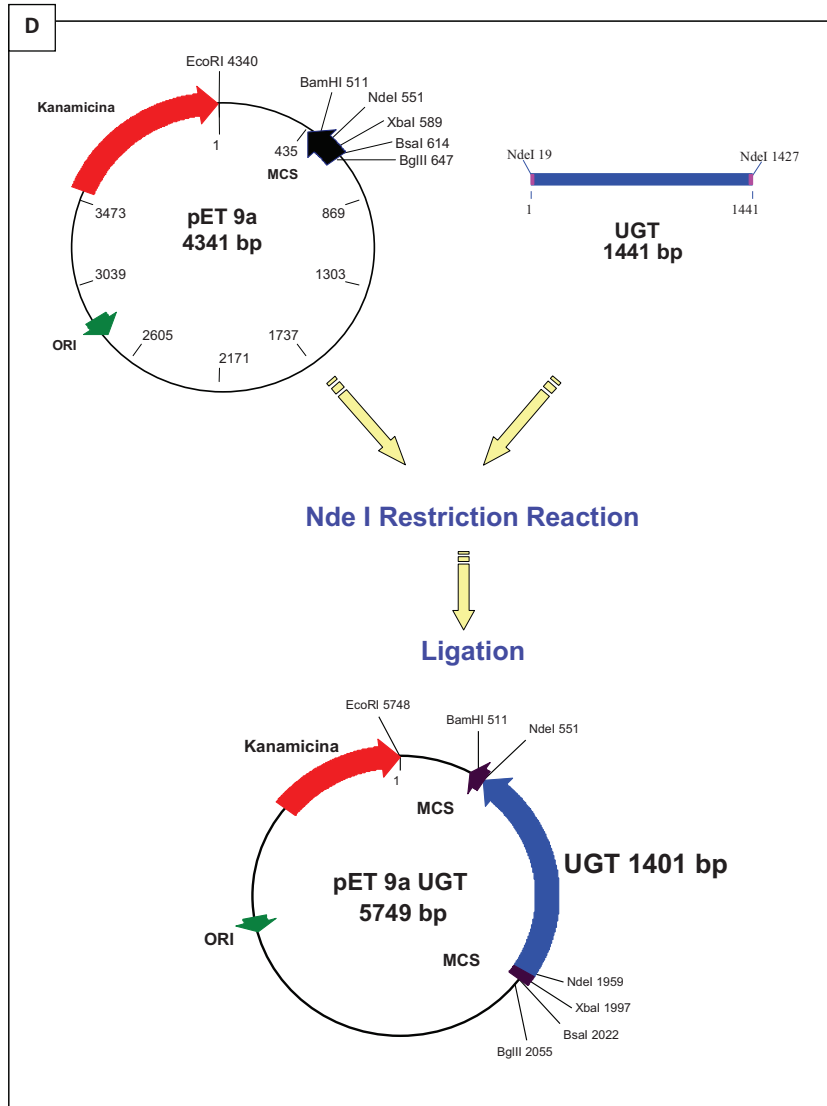


FIG. 7D

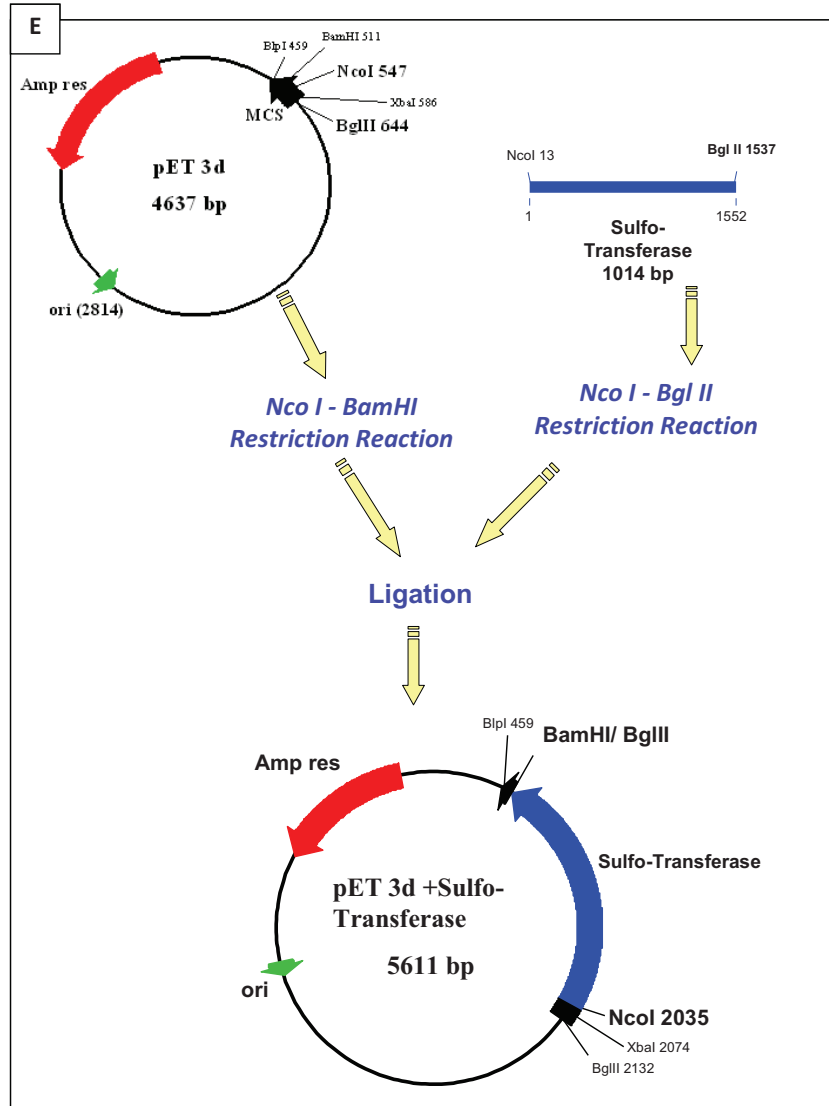
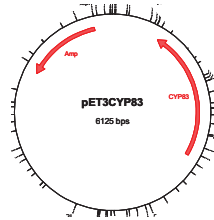


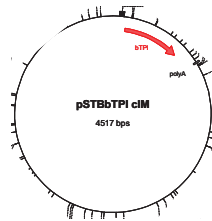
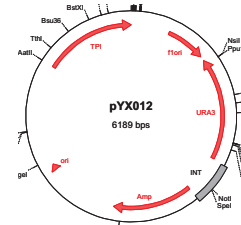
FIG. 7E

12/14

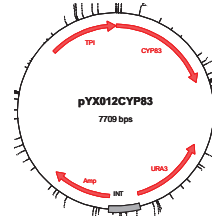
pYX012[CYP83 bTPI-CYP79]



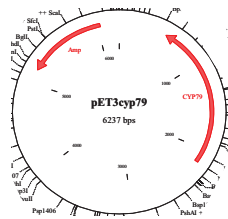
NcoI- BamHI  
digestion and  
ligation



KpnI digestion  
and ligation



CYP79 excised BamHI-BglII



blunting and  
ligation

Vector linearized in XbaI

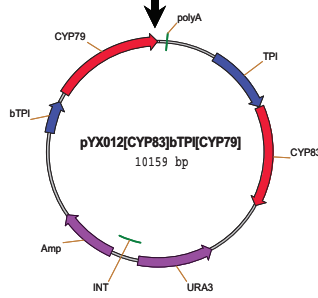
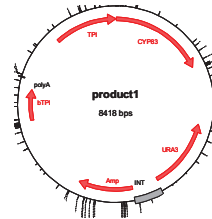


FIG. 8A

pYX022[UGT bTPI-C-S lyase]

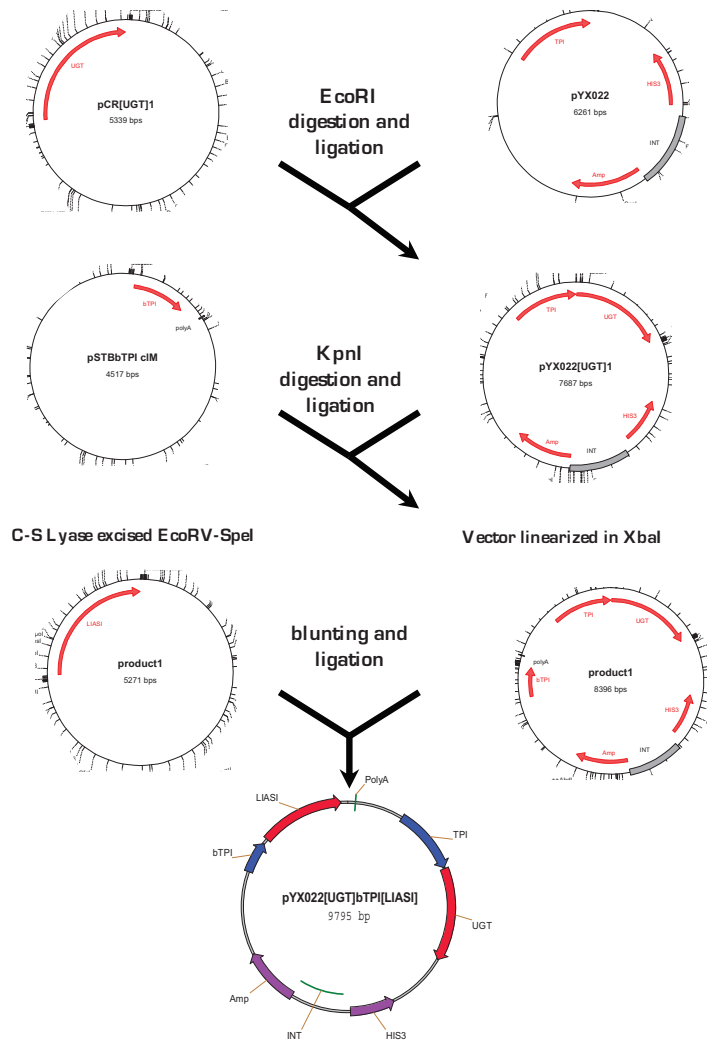


FIG. 8B

pYX042gap[Sulfo-T transferase]

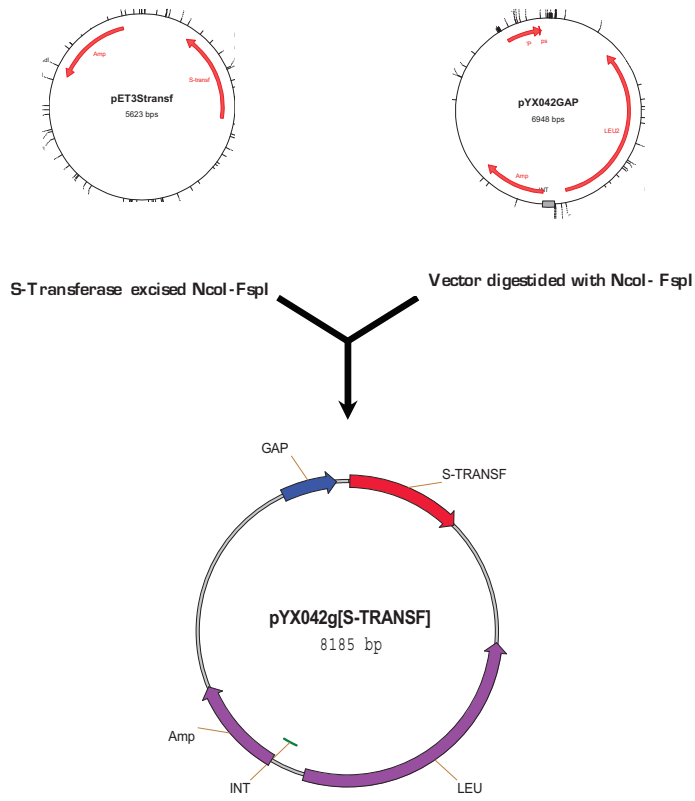


FIG. 8C