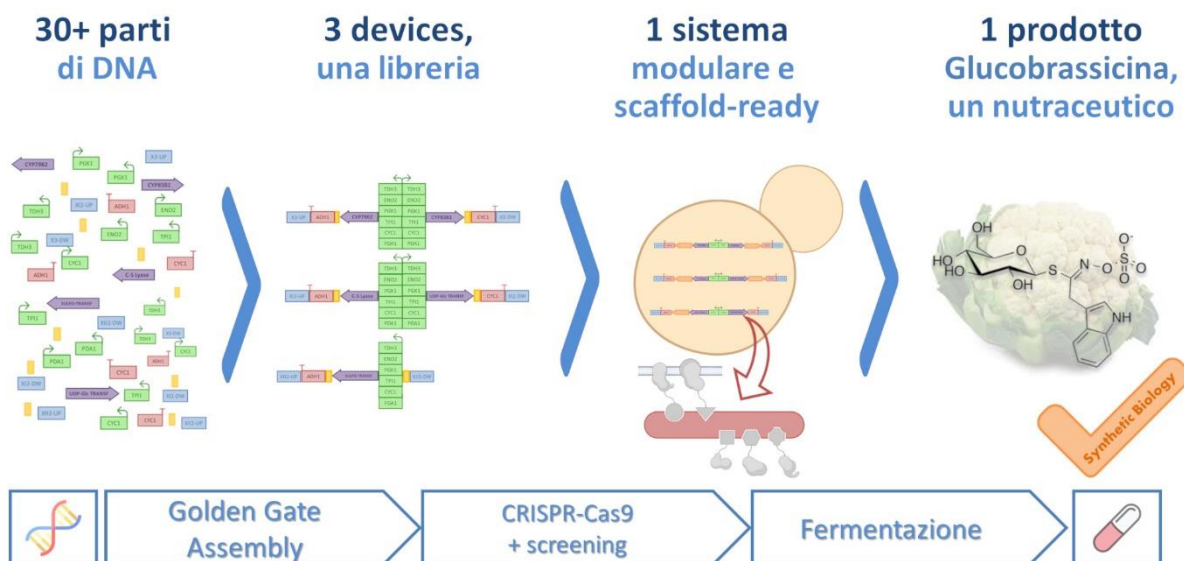


GRAPHICAL ABSTRACT



Produzione di glucobrassicina in lievito attraverso un approccio di Synthetic Biology

Pietro Butti, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, UNIMIB

Letizia Maestroni, Paola Branduardi, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, UNIMIB

Il progetto di tesi riguarda lo sviluppo di un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* ingegnerizzato per la produzione di glucobrassicina, utilizzando un approccio di Synthetic Biology. La glucobrassicina appartiene alla classe dei glucosinolati, molecole naturalmente presenti nelle brassicacee con proprietà nutraceutiche. Per la produzione di glucobrassicina in lievito è necessaria l'introduzione di un pathway eterologo composto da 5 enzimi provenienti da una banca a cDNA di cavolfiore: due citocromi P450, una C-S liasi, una UDP-glucosio transferasi e una sulfotransferasi. La strategia pianificata prevede la creazione di una collezione di più di trenta parti di DNA, comprendente promotori, terminatori e i 5 geni del pathway eterologo, più parti accessorie che faciliteranno l'ingegnerizzazione ed il monitoraggio della via metabolica di interesse. Queste parti verranno assemblate mediante la tecnica del Golden Gate Assembly in tre devices, a costituire una libreria di cassette di espressione con diversi promotori, che potrà essere facilmente integrata nel genoma di lievito utilizzando il sistema CRISPR-Cas9. I ceppi così ottenuti verranno sottoposti a screening al fine di identificare la combinazione ottimale che garantisce la migliore produzione. Il sistema, essendo per sua natura modulare, verrà poi ulteriormente ampliato e migliorato indirizzando gli enzimi del pathway ad uno scaffold proteico sintetico che li mantenga in prossimità e ne aumenti l'efficienza. Contemporaneamente, verranno sviluppate le tecniche analitiche che ci permetteranno di monitorare il prodotto finale e, dove possibile, gli intermedi, per permettere di operare cicli iterativi di ottimizzazione sui ceppi ingegnerizzati.