

FONDO SOCIALE EUROPEO IN SINERGIA CON IL FONDO EUROPEO DI SVILUPPO
REGIONALE
POR 2014-2020 – OBIETTIVO "INVESTIMENTI A FAVORE DELLA CRESCITA E
DELL'OCCUPAZIONE"
STRATEGIE REGIONALI PER IL SISTEMA UNIVERSITARIO
"INNOVAZIONE E RICERCA PER UN VENETO PIÙ COMPETITIVO
ASSEGNI DI RICERCA- ANNO 2019"
DGR NR. 1463 DEL 08/10/2019



UNIONE EUROPEA
Fondo sociale europeo



REGIONE DEL VENETO



POR FSE 2014-2020
REGIONE DEL VENETO



Organismo
di Formazione
accreditato
dalla Regione
del Veneto



UNIVERSITÀ
di **VERONA**

Produzione di vaniglia naturale da coltura cellulare di *Vanilla planifolia* –

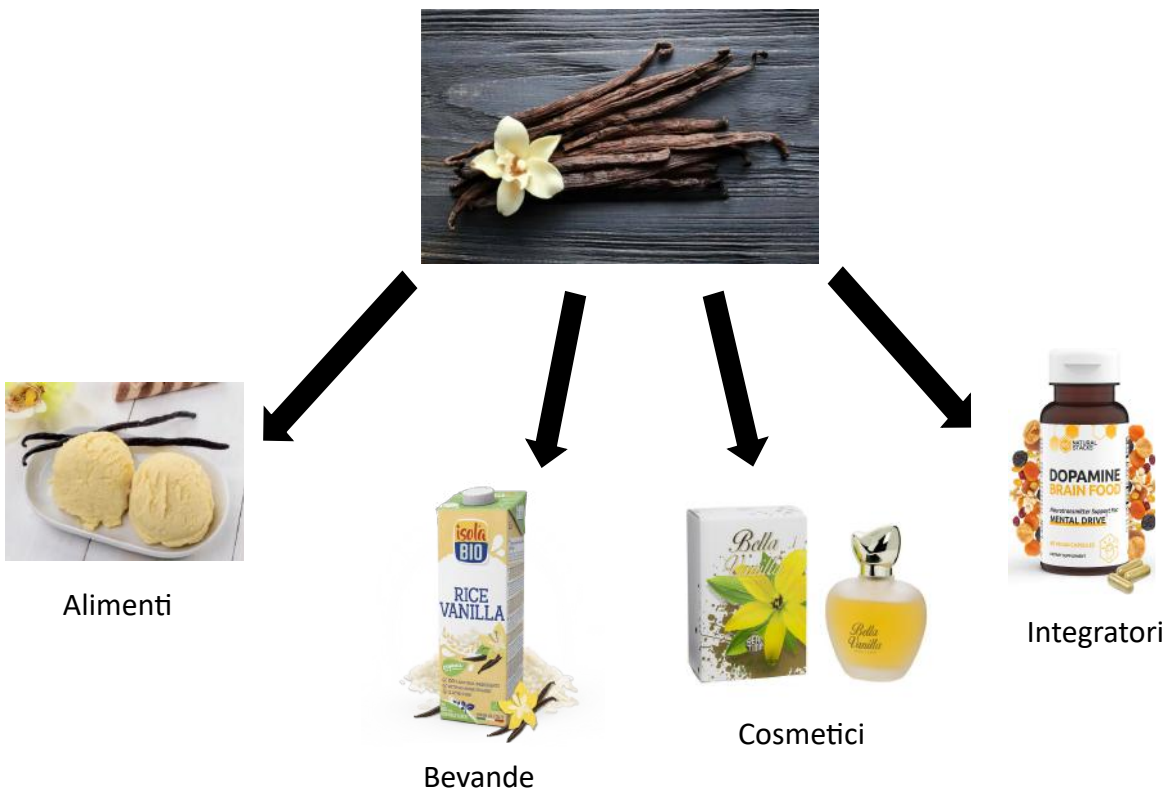
RICERCA DELLA VIA BIOSINTETICA PER LA PRODUZIONE DI VANIGLIA NATURALE IN VANILLA PLANIFOLIA

COD. ENTE 1695 UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

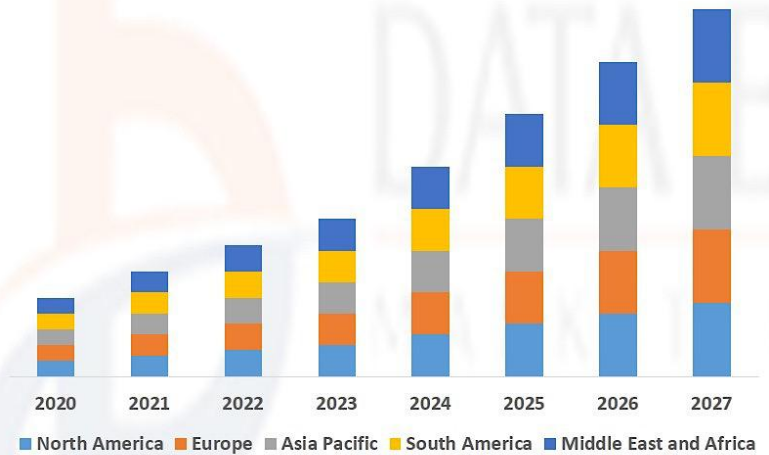
ASSE OCCUPABILITA' - DGR NR. 1463 DEL 08/10/2019

Codice Progetto	1695-0001-1463-2019
Referente progetto	Mauro Commisso
Assegnista	Gianluca Zorzi
Dipartimento	Biotechnologie

La vaniglia naturale è una delle spezie più apprezzate e pregiate ampiamente impiegate come additivo negli alimenti, nelle bevande, nel settore della cosmetica e negli integratori



Global Vanilla Market is Expected to Account for USD 263.70 Million by 2027



Global Vanilla Market, By Regions, 2020 to 2027

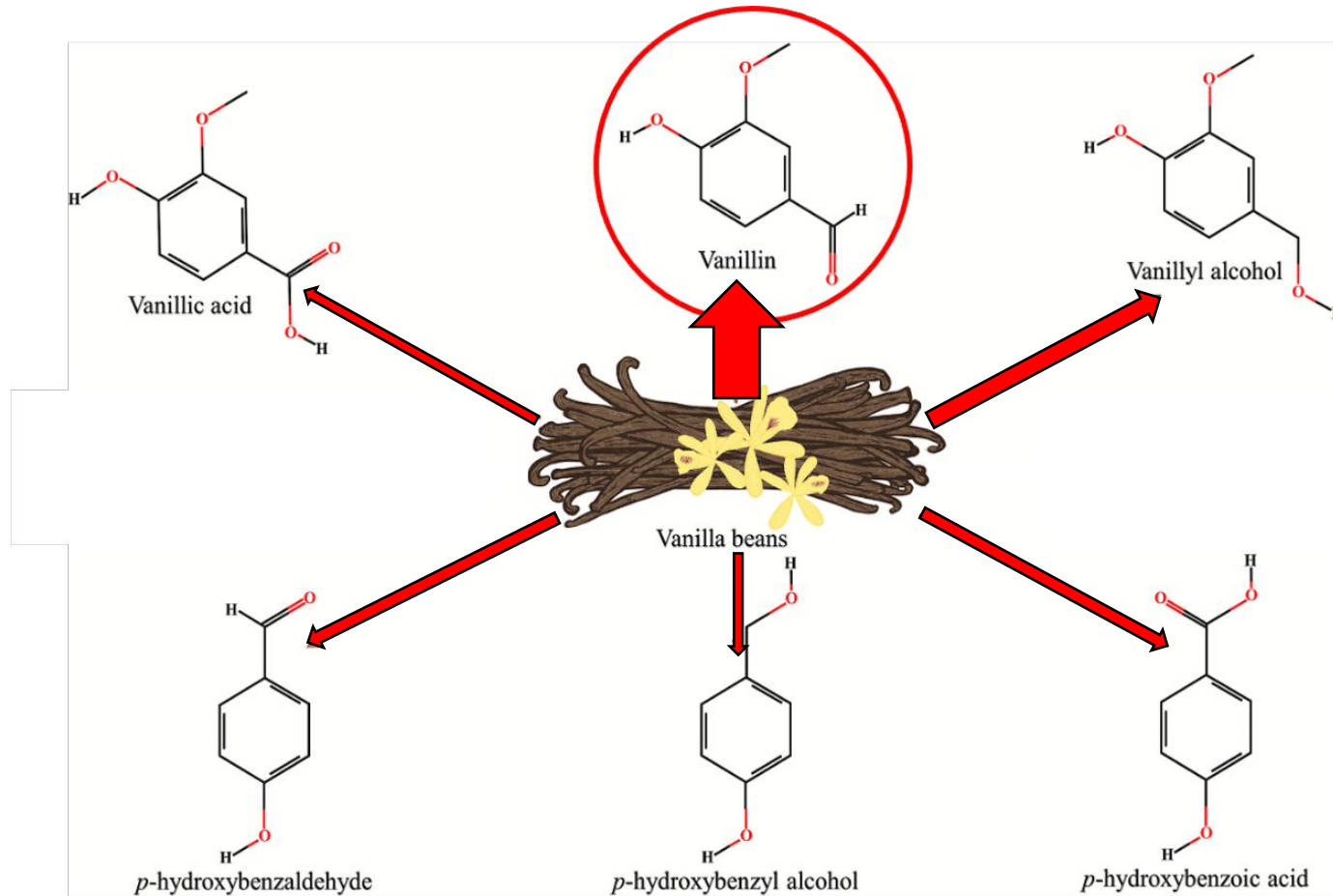
2020

2027

DATA BRIDGE MARKET RESEARCH

Grazie alla grande versatilità di impiego, il mercato globale dell'aroma di vaniglia è in continua crescita

Dal punto di vista chimico, la spezia è composta da un gran numero di molecole (più di 200) dove vanillina, acido vanillico, alcool vanillico, *p*-idrossibenzaldeide e acido *p*-idrossibenzoico sono le più rappresentate

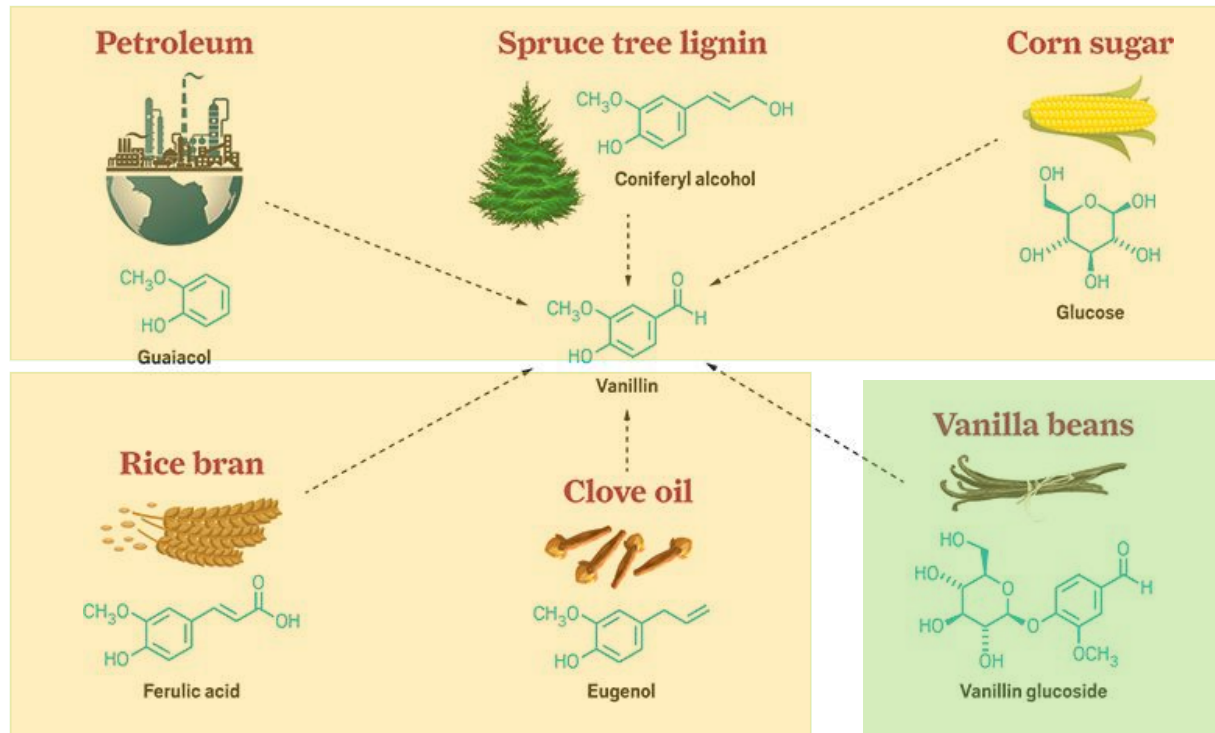


Tra tutte le sostanze, la vanillina è quella che conferisce il tipico aroma di vaniglia che siamo abituati a conoscere

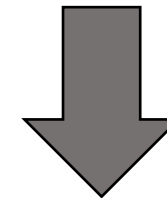
Il bouquet aromatico complesso della vaniglia naturale è ottenuto dalla fermentazione e dalla lavorazione dei baccelli di *V. planifolia*, attraverso un processo chiamato «curing», che richiede tempo e presenta poca riproducibilità, risultando in forti perdite di prodotto.

99% del mercato globale

Sintesi chimica



Per superare l'elevata richiesta di mercato dell'aroma di vaniglia, la maggior parte dei prodotti commerciali sono realizzati con **vanillina**, ottenuta dalla conversione chimica di diversi substrati



<1% del mercato globale

La vanillina chimicamente sintetizzata è considerata dai consumatori un **aroma non naturale**, coprendo solo parzialmente l'ampia fragranza tipica della spezia naturale che si ottiene dai baccelli

Vanilla planifolia, *V. tahitiensis* and *V. pompona*

Sintesi naturale

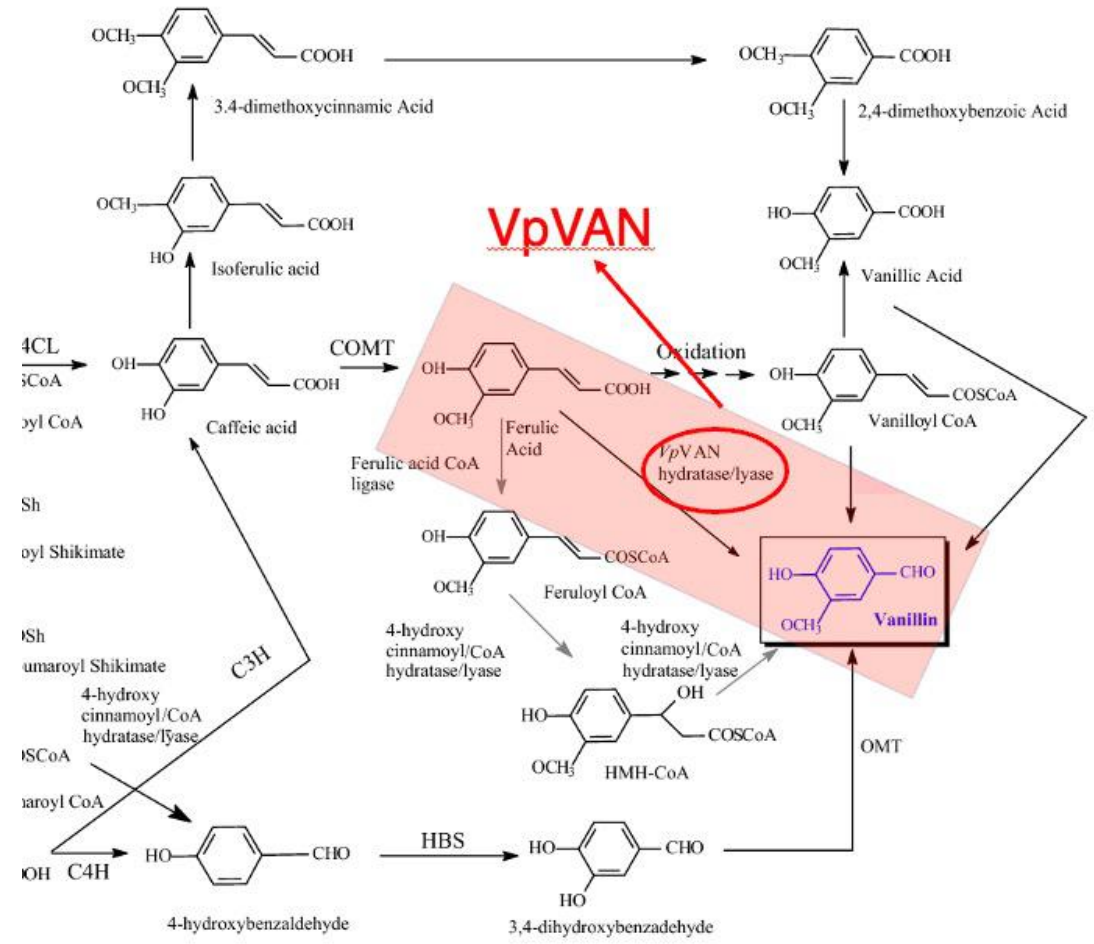
Nelle piante, è stato recentemente proposto che la via biosintetica della vanillina parta dall'acido ferulico, un precursore della lignina.



ARTICLE
 Received 19 Nov 2013 | Accepted 6 May 2014 | Published 19 Jun 2014
 DOI: 10.1038/ncom06031 OPEN
Vanillin formation from ferulic acid in *Vanilla planifolia* is catalysed by a single enzyme
 Nethaji J. Gallage^{1,2,3}, Esben H. Hansen⁴, Rubini Kannangara^{1,2,3}, Carl Erik Olsen^{1,2}, Mohammed Saddik Motawia^{1,2,3}, Kirsten Jørgensen^{1,2,3}, Inger Holme⁵, Kim Hebelstrup⁵, Michel Grison⁶ & Birger Lindberg Møller^{1,2,3,7}

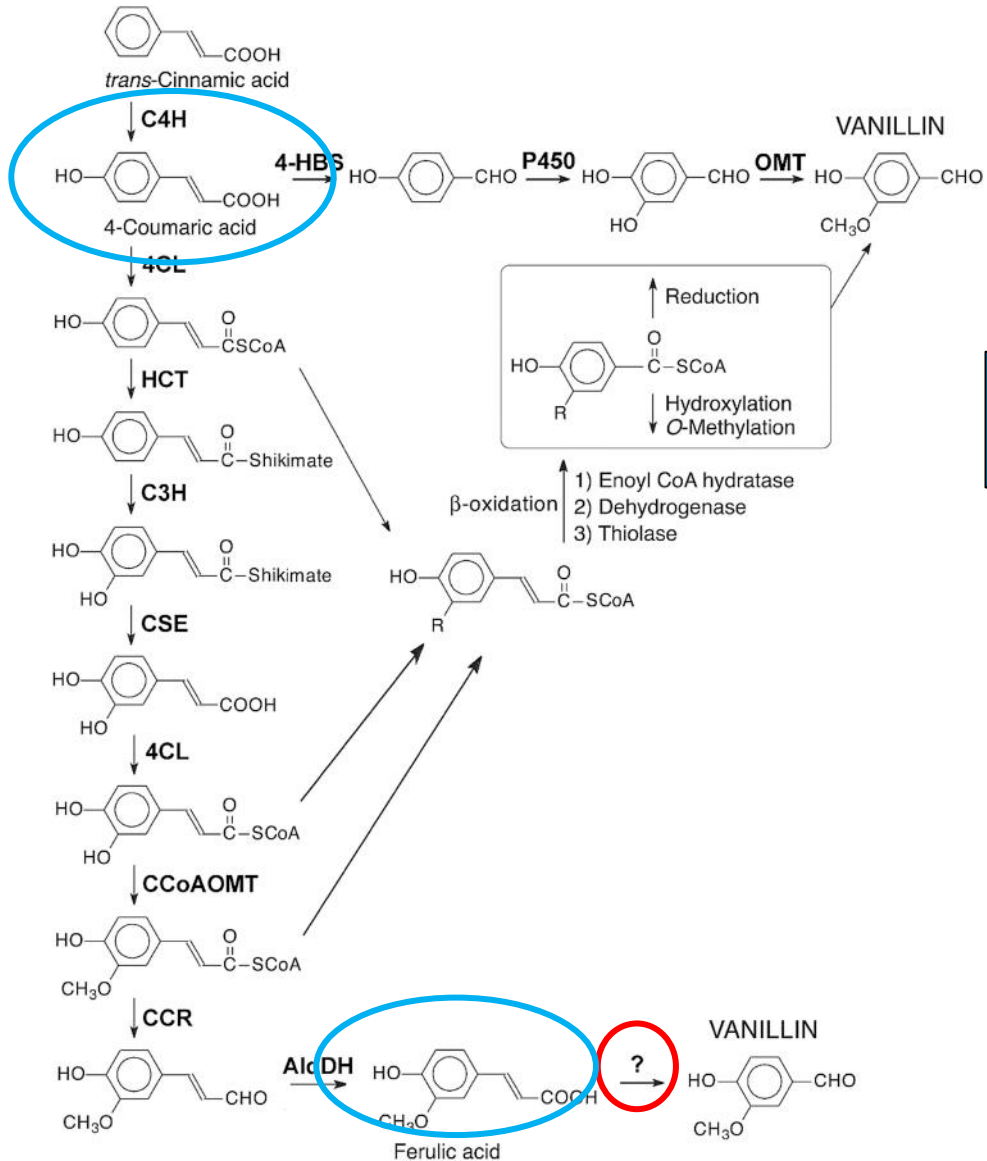
La proteina codificata dal gene **VpVAN** potrebbe essere la responsabile della produzione della vanillina nelle piante.

Tuttavia, gli autori di una recente pubblicazione (Yang *et al.*, 2017) non sono riusciti a produrre vanillina utilizzando questo gene, mettendo così in dubbio l'effettiva identità di VpVAN.

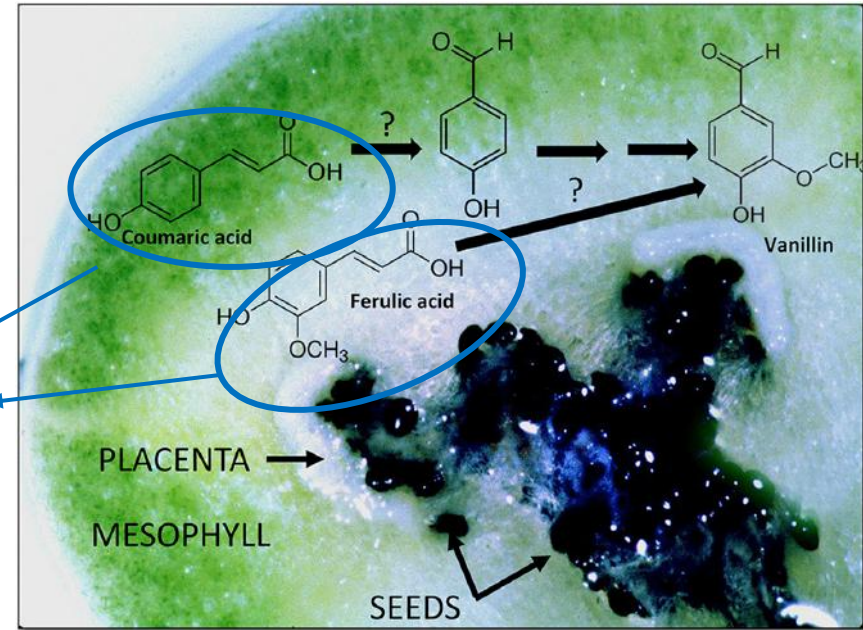


Gallage *et al.*, 2014
 Gallage *et al.*, 2018
 Yang *et al.*, 2017

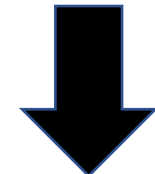
Inoltre, l'acido cumarico è stato riportato come precursore della vanillina in altri lavori.



Possibili precursori?



E' possibile, perciò, che esistano uno o più percorsi per la produzione di vanillina nei baccelli di *V. planifolia*, che risultano ancora sconosciuti



Molti analisi sono richieste!

SCOPI DELLA RICERCA

PRODUZIONE DELL'AROMA NATURALE DI VANIGLIA NELLE PIANTE DI *V. planifolia* E IN SISTEMI ETEROLOGHI

- 1) Studiare la via biosintetica della vanillina e dei composti aromatici correlati all'aroma in *V. planifolia*, mediante:
 - Caratterizzazione *in-vivo* e conferma e/o rifiuto del ruolo del gene *VpVAN*.
 - Identificazione dei geni coinvolti nella biosintesi dell'aroma di vaniglia.
- 2) Ingegneria metabolica per la produzione dell'aroma di vaniglia naturale in piante e colture cellulari



UNIONE EUROPEA
Fondo sociale europeo



REGIONE DEL VENETO



POR FSE 2014-2020
REGIONE DEL VENETO



Organismo
di Formazione
accreditato
dalla Regione
del Veneto

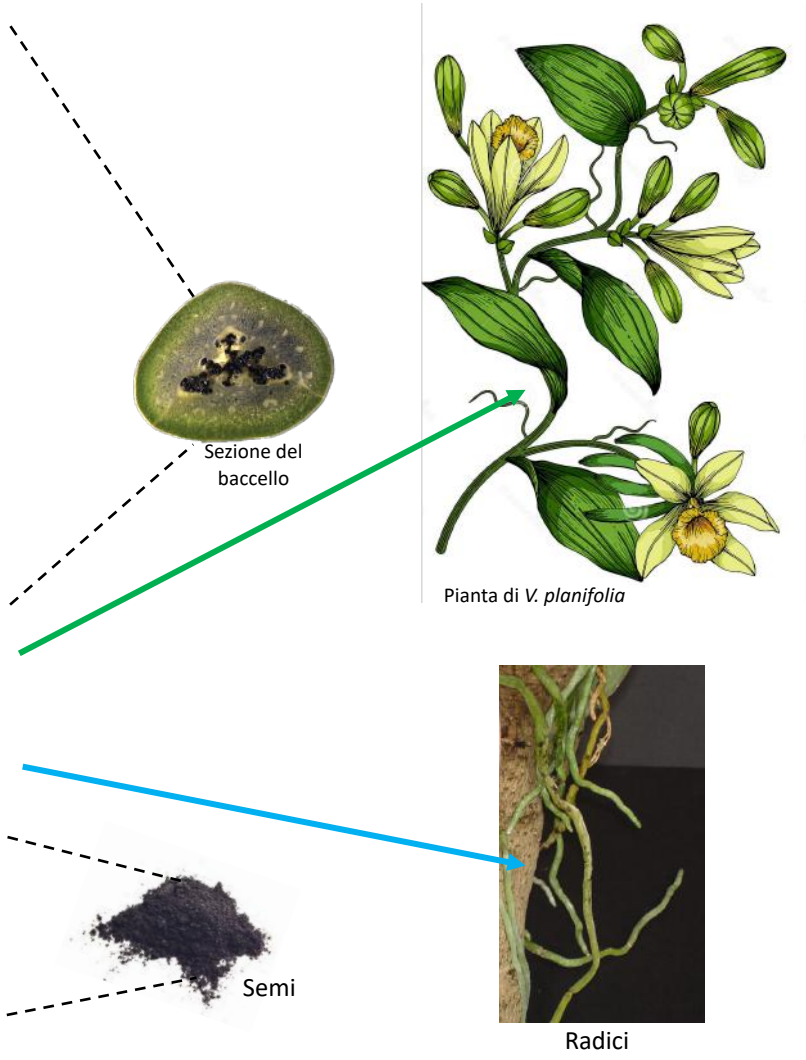
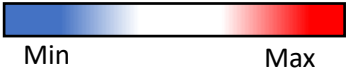


UNIVERSITÀ
di **VERONA**

Analisi di espressione del gene *VpVAN* in *V. planifolia*

RNA-seq data

Library description	TPM
Mesocarp in 3 months pod	1.468.110
Mesocarp in 5 months pod	1.417.920
Mesocarp in 6 months pod	2.069.270
placental in 3 months pod	1.343.980
placental in 5 months pod	1.180.060
placental in 6 months pod	1.646.640
Hairs in 3 months pod	1.714.660
Hairs in 5 months pod	1.658.800
Hairs in 6 months pod	2.122.900
Light mesocarp in 6 weeks pod	621.990
Light mesocarp in 8 weeks pod	821.630
Light mesocarp in 10 weeks pod	803.010
Dark mesocarp in 6 weeks pod	685.650
Dark mesocarp in 8 weeks pod	1.152.370
Dark mesocarp in 10 weeks pod	1.062.450
Leaf	1.297.760
1 year leaf	406.990
Stem	1.013.180
Root	1.415.950
1 year stem	366.150
Seeds in 6 weeks pod	1.851.780
Seeds in 8 weeks pod	1.091.830
Seeds in 10 weeks pod	800.620
Seeds in 3 months pod	1.131.040
Seeds in 5 months pod	1.953.350
Seeds in 6 months pod	2.738.240

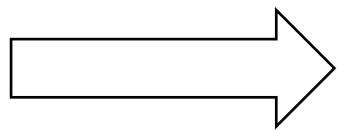


L'analisi in silico dell'espressione genica di *VpVAN* in diversi organi di *V. planifolia* ha evidenziato che **tale gene risulta essere altamente espresso nei baccelli** e **in organi vegetali che non accumulano vanillina**

Perché *Vanilla planifolia* non accumula vanillina nei tessuti che esprimono *VpVAN*?



Baccelli di vaniglia



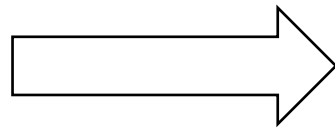
Espressione del gene *VpVAN*



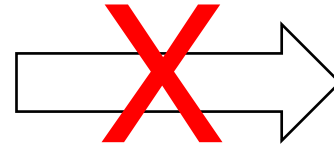
ACCUMULO DI VANILLINA



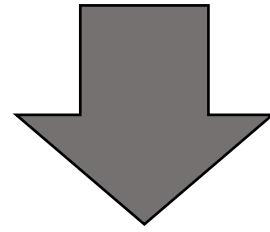
Foglie di vaniglia



Espressione del gene *VpVAN*



NESSUN ACCUMULO DI VANILLINA



È il gene *VpVAN* una vera Vanillina sintasi?

Per rispondere a questa domanda, il gene *VpVAN* è stato clonato ed espresso in *in-vivo* in due specie vegetali differenti, al fine di confermare la sua identità attraverso esperimenti di agroinfiltrazione.



Nicotiana benthamiana



Beta vulgaris

Il protocollo di trasformazione impiegato prevedeva una agroinfiltrazione sottovuoto, mediante l'utilizzo di una strumentazione specifica

Camera da vuoto e pompa



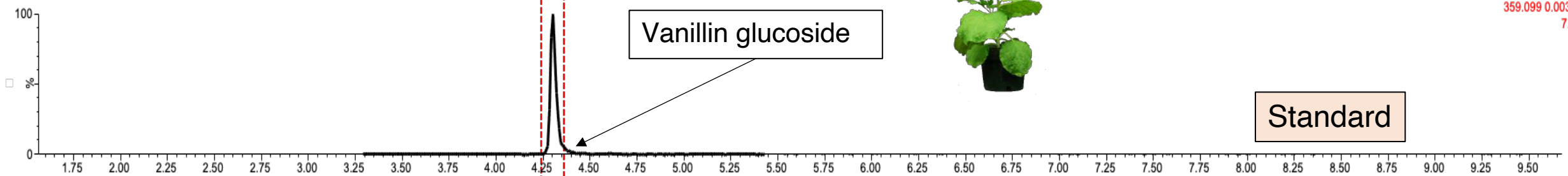
Sospensione di *Agrobacterium tumefaciens* trasformato con il gene di interesse.

Questo batterio viene normalmente utilizzato come veicolo per inserire il materiale genetico nella pianta.

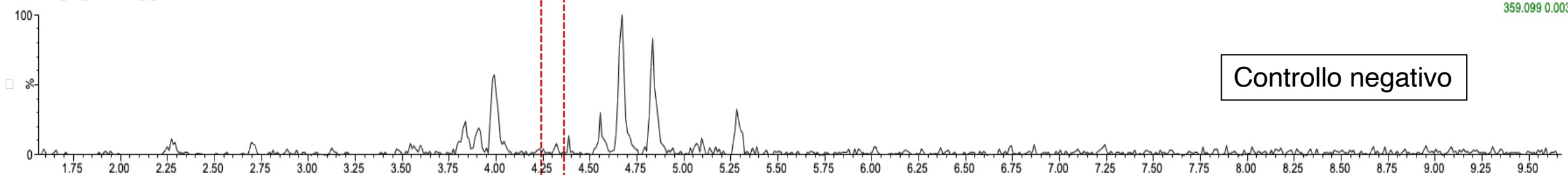
L'espressione di *VpVAN* in *N. benthamiana* non ha portato ad un accumulo di vanillina sia nella sua forma libera, che nella forma coniugata con uno zucchero. Quest'ultima, chiamata vanillina glucoside, è la molecola che si trova naturalmente nei baccelli di vaniglia

50mg di *N. Bentha* estratta con 10 vol metanolo e dil 1:10 h2O

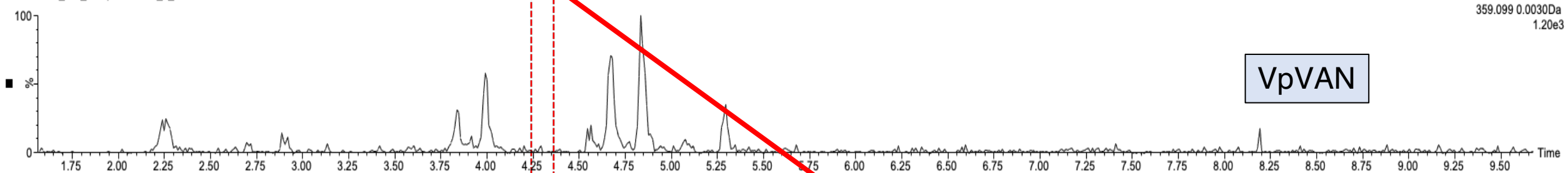
07-06-2021_MC_VanillinGlucoside1ng_NEG



24-05-2021_MC_NbEV9DPI_1_NEG



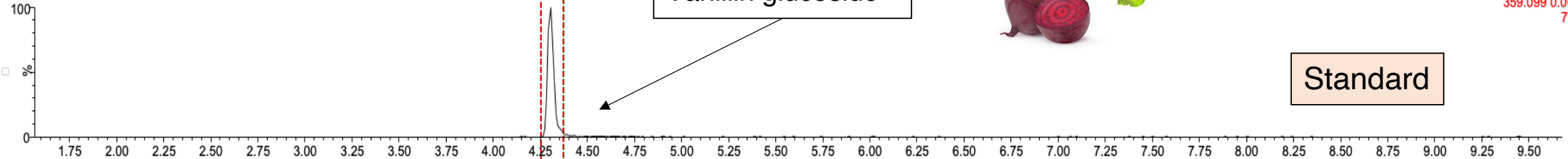
24-05-2021_MC_NbVpVAN9DPI_1_NEG



Nessun accumulo di vanillina glucoside

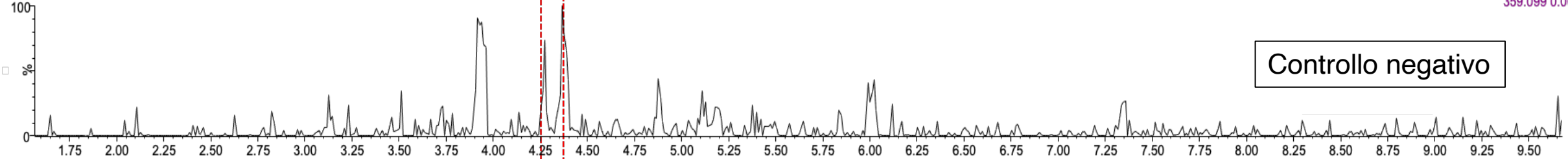
Lo stesso risultato è stato osservato in piante di *B. vulgaris*.

50mg di Rapa estratta con 10 vol metanolo e dil 1:10 h2O
07-06-2021_MC_VanillinGlucoside1ng_NEG



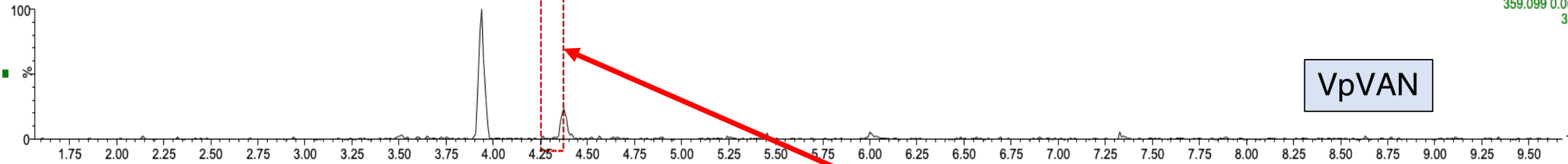
Standard

2021-03-09_MC_Rapa_EV_7dpi_1_NEG



Controllo negativo

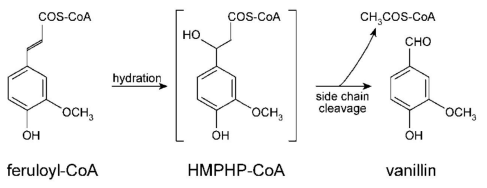
2021-03-09_MC_Rapa_VAN_7dpi_1_NEG



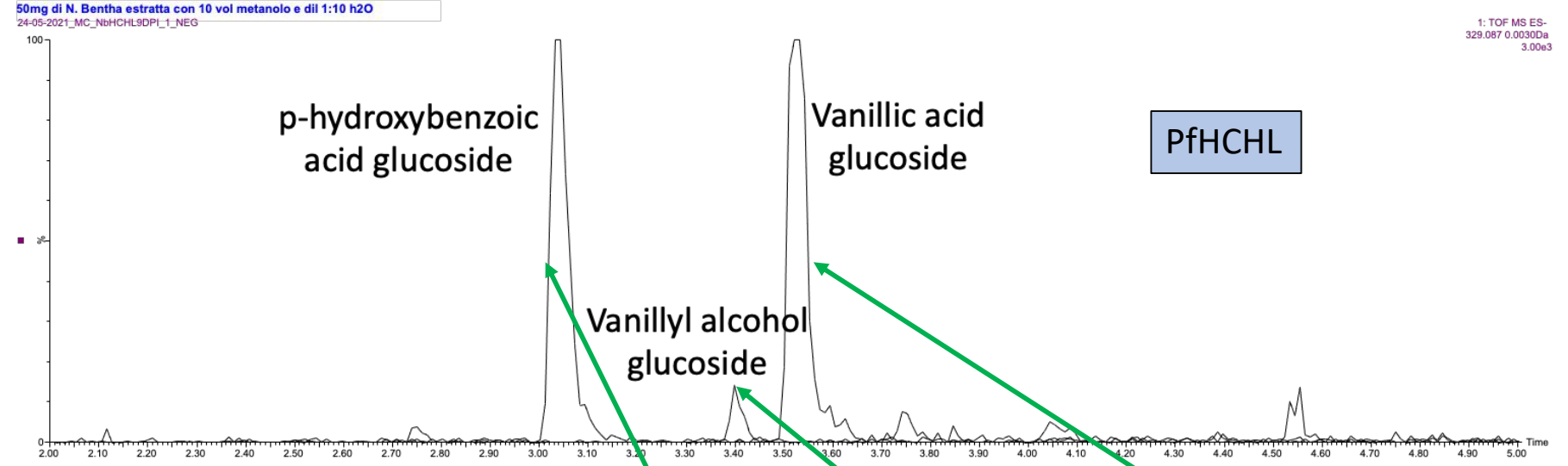
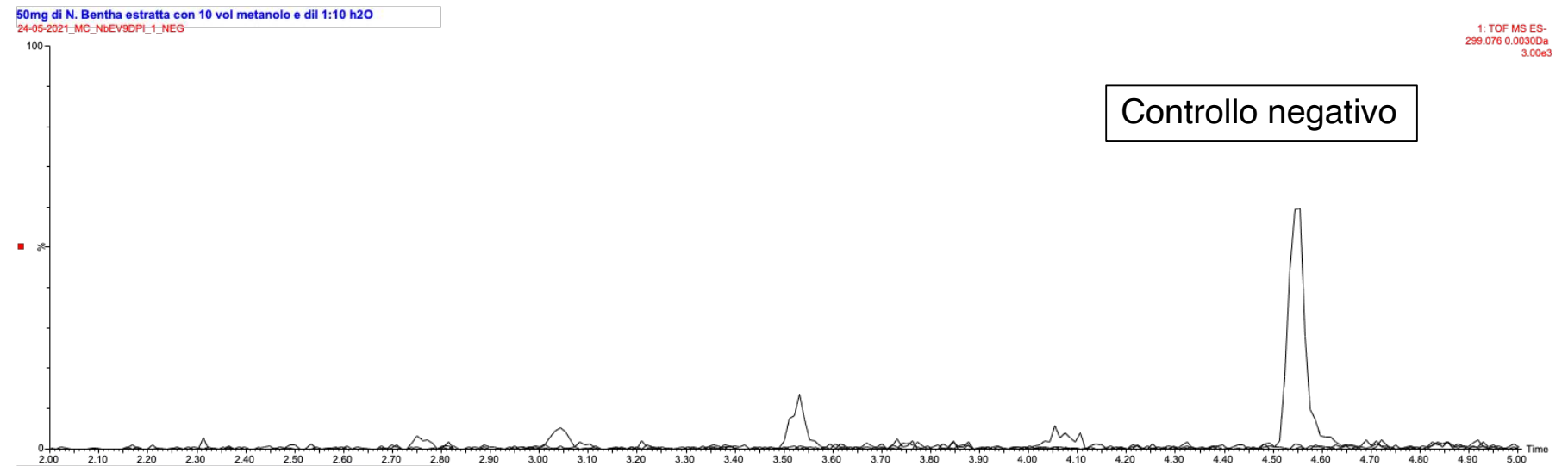
VpVAN

Nessun accumulo di vanillina glucoside

L'espressione del gene *PfHCHL* in *N. benthamiana* ha portato ad un accumulo di derivati della vanillina, quali alcool e acido vanillico e acido p-idrossibenzoico, ma **NON VANILLINA**

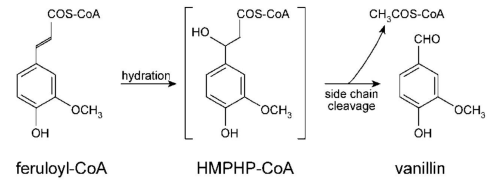


Conversione del Feruloyl-CoA in vanillina mediante l'attività del gene HCHL di *Pseudomonas fluorescens*

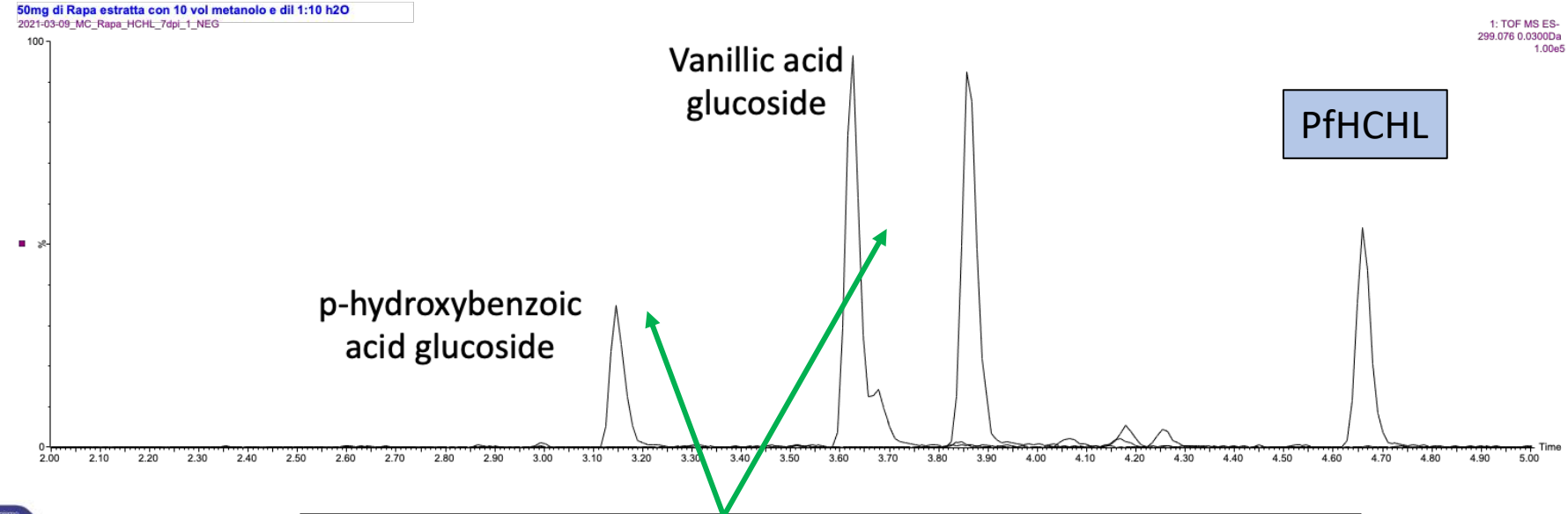
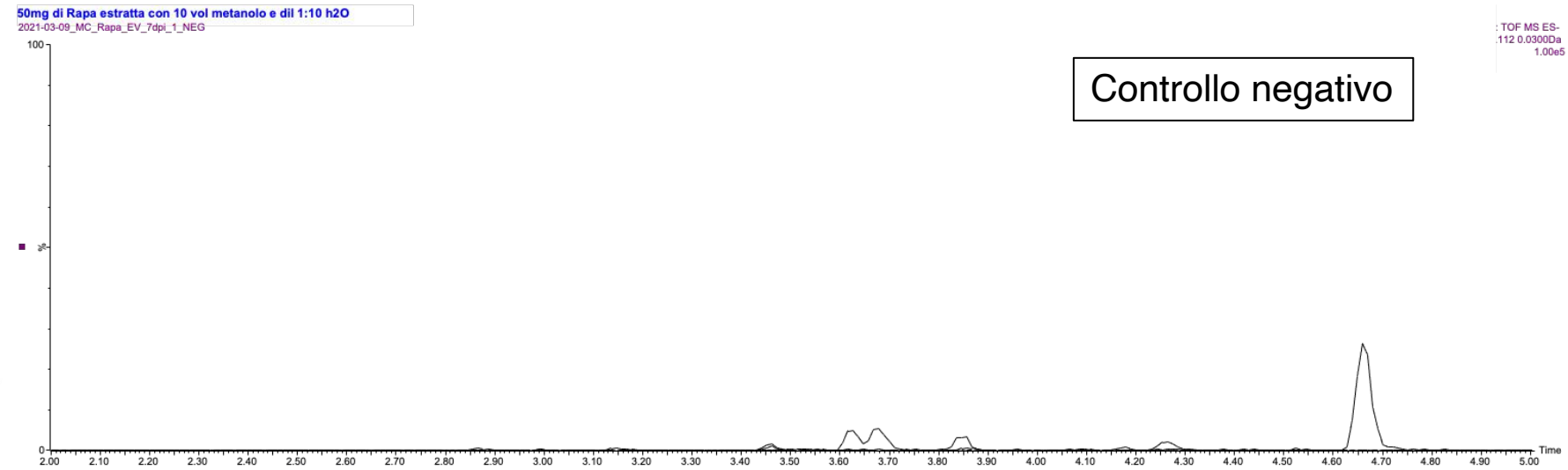


Accumulo di acido p-idrossibenzoico, alcool vanillico e acido vanillico

Risultati simili sono stati ottenuti a seguito dell'espressione del gene *PfHCHL* in *B. vulgaris*, risultando in un accumulo di solo acido vanillico e acido p-idrossibenzoico.



Conversione del Feruloyl-CoA in vanillina mediante l'attività del gene HCHL di *Pseudomonas fluorescens*



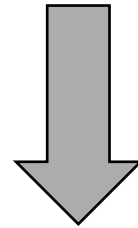
Accumulo di acido p-idrossibenzoico e acido vanillico



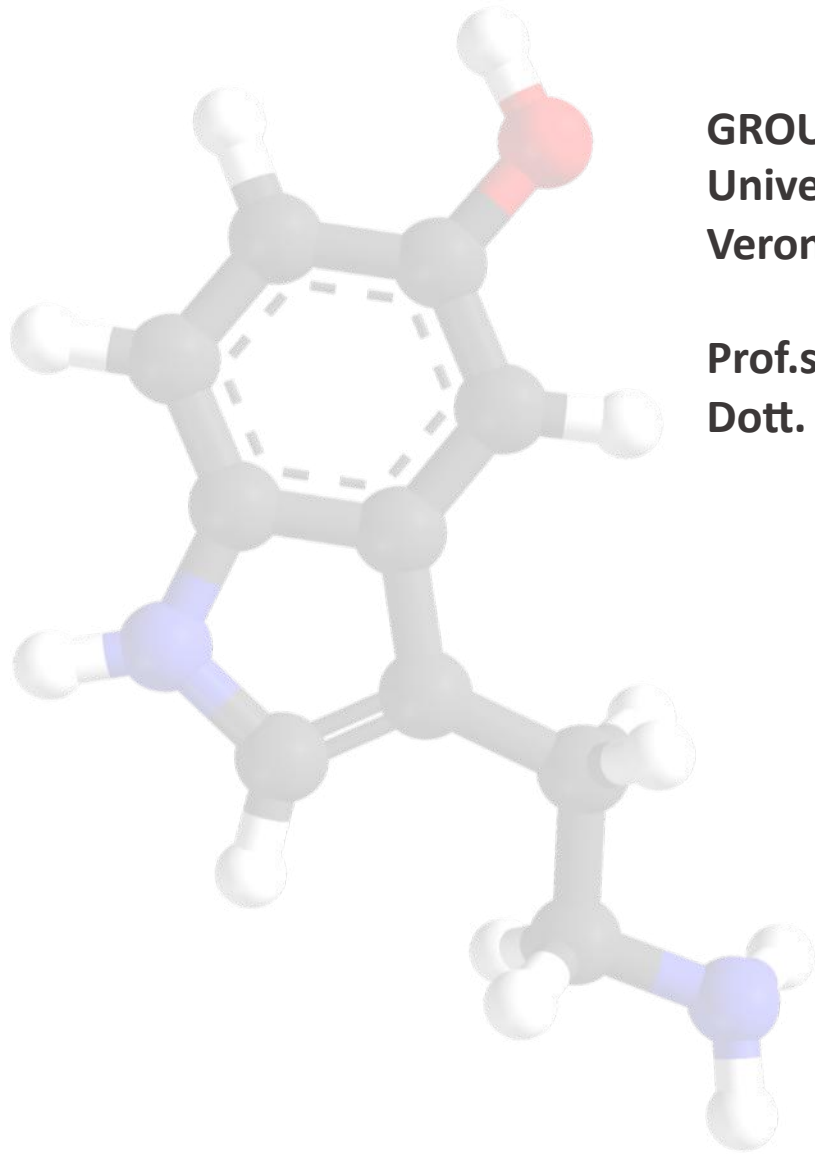
Da questi risultati abbiamo potuto constatare che:

1) L'ESPRESSIONE DEL GENE *PfHCHL* INCREMENTAVA IL CONTENUTO DI SPECIFICI DERIVATI DELLA VANILLINA IN PIANTA

2) L'ESPRESSIONE DEL GENE *VpVAN* NON PORTAVA ALL'ACCUMULO DI VANILLINA E DERIVATI NELLE PIANTE



VpVAN NON CODIFICA PROBABILMENTE PER UNA VANILLINA SINTASI



GROUP OF PLANT GENETICS
Università degli Studi di
Verona

Prof.ssa Linda Avesani
Dott. Gianluca Zorzi

GROUP OF PLANT BIOLOGY
& METABOLOMICS
Università degli Studi di
Verona

Prof.ssa Flavia Guzzo
Dott. Mauro Commisso

