

## INGEGNERIZZAZIONE DI $\gamma$ -GLUTAMIL TRANSPEPTIDASI BATTERICHE PER APPLICAZIONI INDUSTRIALI

Recentemente abbiamo caratterizzato le attività delle GGT di *B. subtilis* e *E. coli* e costruito enzimi ricombinanti con alterata attività enzimatica (Morelli et al., 2015; Calvio et al., 2018). Con il supporto della Fondazione Cariplo stiamo ora adattando questi enzimi per la sintesi di derivati  $\gamma$ -glutamilici di aminoacidi naturali e / o modificati a partire da sostanze chimiche sfuse di origine biotecnologica (Massone et al., 2019). Stiamo anche studiando l'immobilizzazione dei GGT in fase solida, al fine di ottenere un catalizzatore robusto e riciclabile (Serra et al., 2019). Il compito della nostra unità è quello di ottenere enzimi GGT mutanti con attività potenziata e specifica verso composti accettori selezionati. Questo lavoro è in collaborazione con i proff. C. Morelli (Dipartimento di Chimica, Università di Milano) e T. Bavaro (Dip. Drug Science, UNIPV).

## MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE DI $\gamma$ -PGA DA SOTTOPRODOTTI AGRO-INDUSTRIALI IN *Bacillus subtilis*

La necessità di materie prime più sicure derivate da fonti rinnovabili sta accrescendo l'interesse verso i biopolimeri naturali. Il  $\gamma$ -PGA è un polimero anionico prodotto da *Bacilli*, composto da migliaia di unità di acido glutammico. Grazie alla sua non tossicità, solubilità in acqua e biodegradabilità trova applicazione in diversi campi biotecnologici come: flocculante per la rimozione di metalli pesanti, crioprotettore, umettante, additivo addensante in cosmetici e in industrie alimentari, bioplastica, colla biologica, vettore di farmaci o vaccini e come materiale di supporto per la rigenerazione tissutale nell'industria biomedica. Il nostro laboratorio ha ottenuto un ceppo di iper-produttore derivato da un ceppo di laboratorio di *B. subtilis*. La disponibilità di un ceppo ben definito, modificabile geneticamente, offre l'opportunità di applicare l'ingegneria genetica per migliorare la produttività e razionalizzare i percorsi metabolici per ridurre i costi di fermentazione. Introducendo mutazioni specifiche, abbiamo già ottenuto ceppi che mostrano una maggiore resa del prodotto.

Attualmente il nostro obiettivo è ottenere un produttore in grado di fermentare componenti organici contenuti in alcuni sottoprodotti agroindustriali. Abbiamo indagato sia la paglia di riso, un'abbondante biomassa attualmente sotto sfruttata, sia il glicerolo grezzo, un coprodotto nell'industria del biodiesel. Il raggiungimento degli obiettivi di cui sopra non solo porterà a un  $\gamma$ -PGA più economico, ma contribuirà anche alla valorizzazione di sottoprodotti abbondanti nelle catene di produzione e rafforzerà lo sviluppo di nuovi settori della bioeconomia (Massaiu et al., 2019; Pasotti et al. 2020). Questa linea di ricerca è stata finanziata da due grant della CARIPO FOUNDATION, in collaborazione con i prof. P. Mustarelli (ex Dipartimento di Chimica, UNIPV) e P. Magni (Dipartimento di Ingegneria Elettrica, Informatica e Biomedica, UNIPV) e G. Mazzini (IGM-CNR, Pavia), ed è ora finanziato da un grant di FONDAZIONE CARIPO, in collaborazione con la Dott.<sup>ssa</sup> D. Buonocore (DBB, UNIPV), e dal Programma esecutivo per la cooperazione scientifica e tecnologica tra la Repubblica Italiana e la Repubblica Polacca, finanziato dal Ministero degli Affari Esteri, in collaborazione con il Prof. M Lukaszewicz (Università di Breslavia, PL).

## RUOLO BIOLOGICO DI SwrA, PROTEINA REGOLATRICE DI *Bacillus subtilis* A FUNZIONE IGNOTA

In *B. subtilis* il sistema a due componenti DegS-DegU è un regolatore centrale che controlla l'espressione di più di cento geni coinvolti nella transizione dalla fase di crescita esponenziale a quella stazionaria, coordina il differenziamento delle singole cellule nelle comunità multicellulari e, in batteri patogeni come *Listeria monocytogenes* o *Bacillus anthracis*, è coinvolto nella virulenza. È stato dimostrato che DegU regola la motilità di *B. subtilis* in modo complesso. Anche SwrA, che non appartiene ad alcuna classe proteica nota, è coinvolta nella regolazione della mobilità. Abbiamo dimostrato che esiste un'interazione funzionale e molecolare tra le due proteine, DegU e SwrA, nella motilità (Mordini et al., 2013) e ora stiamo estendendo le nostre analisi ad altri pathway genetici regolati da DegU, come la produzione di proteasi. L'obiettivo è quello di identificare il segnale molecolare che media le attivazioni del sistema DegSU e di caratterizzare l'interazione molecolare tra DegU e SwrA. Per analizzare le relazioni tra queste proteine a livello di singola cellula, viene applicata la tecnologia all'avanguardia rappresentata dal citofluorimetro Amnis ImageStream. Questa linea di ricerca viene svolta in collaborazione con i dott. L. Pasotti (Dipartimento di Ingegneria Elettrica, Informatica e Biomedica, UNIPV) e G. Mazzini (IGM-CNR, Pavia).

## $\gamma$ -PGA-IDROLASI COME AGENTI ANTIBATTERICI

Abbiamo identificato e caratterizzato quattro nuovi geni di *B. subtilis* che codificano per  $\gamma$ -PGA idrolasi. Abbiamo scoperto che questi geni, di origine fagica, si sono diffusi in numerose specie batteriche attraverso trasferimento genico orizzontale e identificato i geni per la biosintesi del  $\gamma$ -PGA in numerose altre specie di microorganismi, tra cui alcuni patogeni (Mamberti et al., 2015). Abbiamo caratterizzato finemente, enzimaticamente e strutturalmente, le nuove  $\gamma$ -PGA idrolasi con l'obiettivo di esplorare un loro possibile utilizzo delle come agenti antibatterici (Ramaswamy et al., 2018). Queste attività sono state svolte in collaborazione con Proff. A. Pastore e G. Pietrocola, (Dip. Di Medicina Molecolare, UNIPV), C. Morelli (Dip. Di Chimica, Università di Milano) e Dott. M. Fabbi (Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, sede di Pavia).