

## **MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE DI $\gamma$ -PGA IN *Bacillus subtilis***

La spinta verso l'utilizzo di materie prime sicure, ottenute da fonti rinnovabili, è alla base dell'interesse sempre maggiore per i biopolimeri naturali. Il  $\gamma$ -PGA è un polimero prodotto da batteri principalmente del genere *Bacillus*, anionico, formato da migliaia di residui di acido glutammico, che grazie alla sua assoluta non tossicità, l'idrosolubilità e la biodegradabilità, trova applicazione in numerosi campi biotecnologici: come flocculante nella rimozione di metalli pesanti nel trattamento di liquidi reflui, come crioprotettivo, umettante e addensante nell'industria cosmetica ed alimentare, come colla biologica, carrier di farmaci e vaccini e come materiale di supporto per la rigenerazione tissutale nell'industria biomedica. Per il suo pieno sfruttamento industriale occorre innanzitutto ridurre drasticamente i costi di produzione, aumentando la produttività batterica e migliorando le condizioni di fermentazione. Nel nostro laboratorio è stato ottenuto un ceppo produttore derivato dal ceppo di laboratorio ampiamente caratterizzato di *B. subtilis* 168 (Osera et al., 2009). La disponibilità di un ceppo ben noto, sul quale è possibile applicare tecniche di ingegneria genetica, offre la possibilità di applicare strategie di miglioramento genetico e di razionalizzazione delle condizioni di coltura basate sulla genetica e fisiologia dell'organismo. Introducendo alcune mutazioni nei pathway metabolici della biosintesi del polimero, abbiamo ottenuto ceppi che accumulano questo prodotto in maniera elevata e costante (Scoffone et al. 2013). L'ultima sfida è stata l'ingegnerizzazione del ceppo produttore affinché possa produrre polimero a partire da scarti organici di settori agroindustriali, ed in particolare da paglia di riso ([RIVARIO](#)) (Longanesi et al., manoscritto in preparazione) e da glicerolo (Massaiu et al, manoscritto in preparazione). Questi risultati potranno avere ricadute positive sulla della filiera del riso e concorreranno all'espansione della bio-economia. Questa linea di ricerca ed è attualmente sostenuto da due finanziamenti della FONDAZIONE CARIPOLO ed è svolta in collaborazione con i Proff. P. Mustarelli (Dip. di Chimica, Università di Pavia) e P. Magni (Dip. di Ingegneria Industriale e dell'Informazione, Università di Pavia) e G. Mazzini (IGM-CNR, Pavia).

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

Abbiamo identificato e caratterizzato quattro nuovi geni in *B. subtilis* che codificano per  $\gamma$ -PGA idrolasi. È stato scoperto che questi geni, di origine fagica, si sono diffusi in numerose specie batteriche attraverso trasferimento genico orizzontale (Mamberti et al., 2015). Abbiamo inoltre identificato i geni per la biosintesi del  $\gamma$ -PGA in numerose altre specie di microorganismi, tra cui alcuni patogeni.

Attualmente stiamo caratterizzando, enzimaticamente e strutturalmente, le nuove  $\gamma$ -PGA idrolasi in vista di un loro possibile utilizzo delle come agenti antibatterici (Ramaswamy et al., manoscritto in preparazione). Il nostro obiettivo futuro è di analizzare il ruolo del polimero come fattore di virulenza in alcune di queste specie patogene. Questa attività è svolta in collaborazione con i Proff. A. Pastore e G. Pietrocola (Dip. di Medicina Molecolare, Università di Pavia), C. Morelli (Dip. di Chimica, Università di Milano) ed il dott. M. Fabbi (Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, sede di Pavia).

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

In *Bacillus 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 osservato

che il livello di fosforilazione di DegU regola in maniera complessa la motilità di *B. subtilis*. Anche SwrA, che non appartiene ad alcuna classe proteica nota, è coinvolta nella regolazione della mobilità. Abbiamo dimostrato, utilizzando sia dati genetici *in vivo*, sia dati biochimici *in vitro*, che l'interazione funzionale tra DegU e SwrA è conseguenza di un'interazione molecolare tra le due proteine (Mordini et al., 2013). Stiamo ora analizzando l'effetto di SwrA su altri pathways genetici controllati da DegU quali la sintesi di proteasi, ed altre peculiarità molecolari che sembrano caratterizzare il locus *swrA*. L'obiettivo è di individuare il segnale intracellulare che media l'attivazione del sistema a due componenti DegSU e caratterizzare l'interazione tra DegU e SwrA a livello molecolare.

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

Abbiamo recentemente caratterizzato l'attività delle GGT di *B. subtilis* e *E. coli*, e prodotto alcuni mutanti con attività enzimatica modificata (Morelli et al., 2015; Calvio et al., 2018). Con il sostegno della Fondazione Cariplo, vorremmo ora utilizzare questi enzimi per la sintesi di derivati  $\gamma$ -glutamilati di aminoacidi naturali o modificati. L'obiettivo del laboratorio è l'ottenimento di mutanti della GGT con attività aumentata e specifica verso i composti accettori desiderati. Il progetto è svolto in collaborazione con i Proff. C. Morelli (Dip. di Chimica, Università di Milano), T. Bavaro (Dip. Scienze del Farmaco, Università di Pavia) e A. Albertini (Dip. di Biologia e Biotecnologie, Università di Pavia).