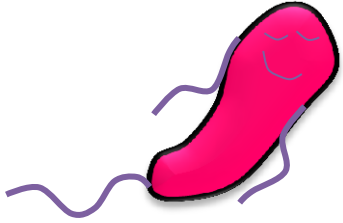


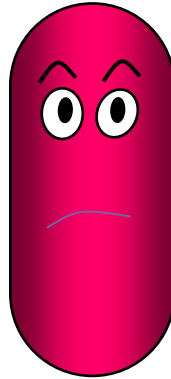
La facilità con cui *E. coli* cresce su un vasta gamma di terreni

Porta a sottostimare l'importanza della scelta di un terreno idoneo per le diverse applicazioni



NORMALI PROCEDURE DI LABORATORIO

L.B. (Lisogeny Broth)



E. coli si coltiva con successo in terreni complessi come

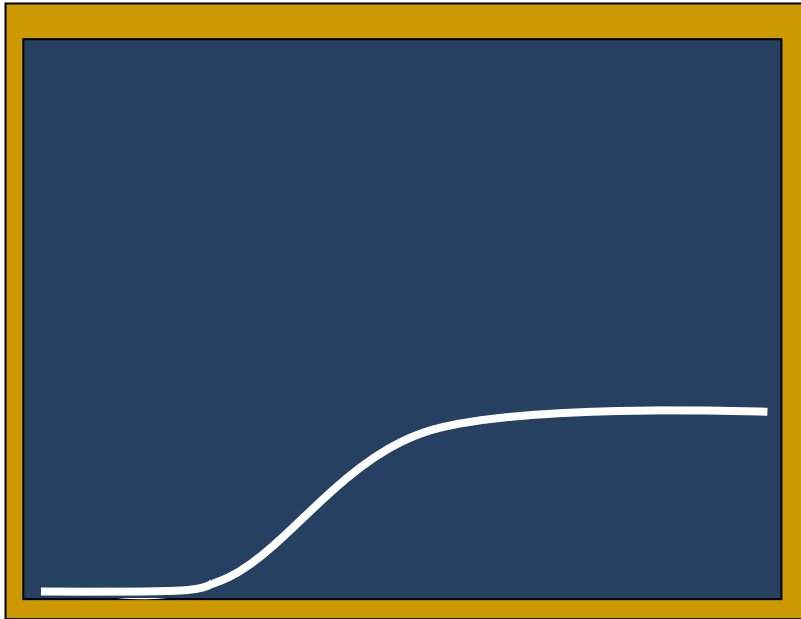
messo a punto da Giuseppe Bertani nel 1951
per studi sull'azione litica di batteriofagi

Meglio noto come terreno di Luria Bertani
(denominazione imprecisa, messa in uso più tardi)



LB deve la sua notorietà al largo uso che ne è stato fatto in Genetica
dei microrganismi ma non è un terreno ottimale per la produzione

In LB, infatti, E. coli entra precocemente in fase stazionaria a causa della limitata disponibilità di fonti di carbonio (solo aminoacidi nel peptone)

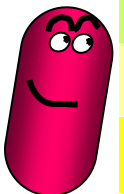


E' idoneo, con l'aggiunta di antibiotici, per la selezione dei trasformanti

la formulazione originale (NaCl 10 g/L) può essere modificata secondo Lennox (5g/L) o Luria (0,5g/L) se il sale interferisce con l'antibiotico impiegato

Per l'espressione in BL21SI il sale va omissso del tutto

Le colture raggiungono A600 ~ 1-3



14

13

12

11

10

9

8

7

6

5

4

3

2

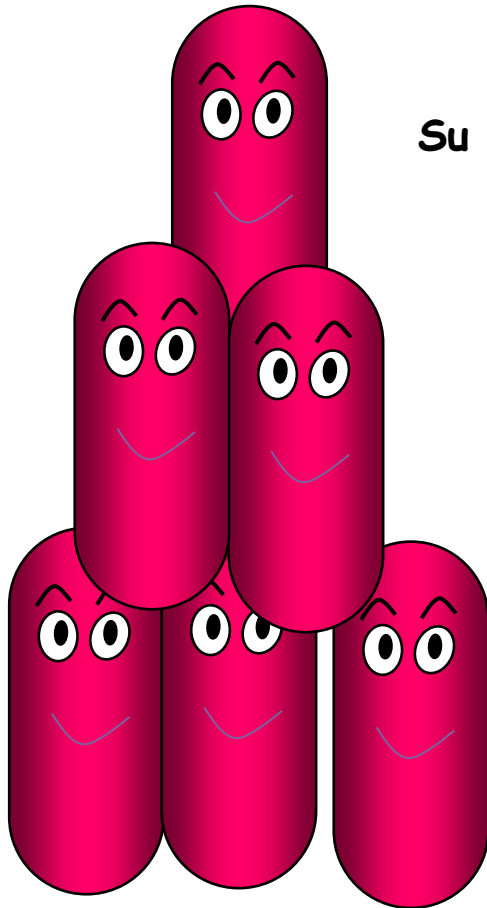
1

T.S.A.

TSA (Tryptic Soy Agar) è un terreno a base di digesto triptico di caseina, peptone di soia e glucosio



Su cui si ottengono crescite rigogliose

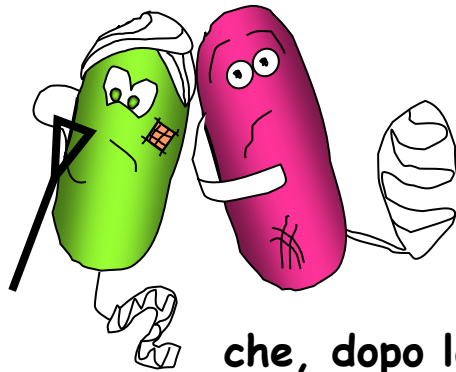


SOB

20g peptone; 5g YE; 0,5g NaCl; 0,186g KCl

Super Optimal Broth: originariamente definito (Hanahan) per rendere competenti le cellule

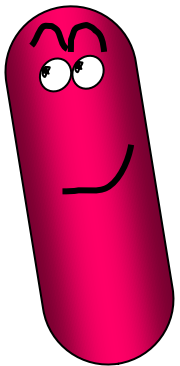
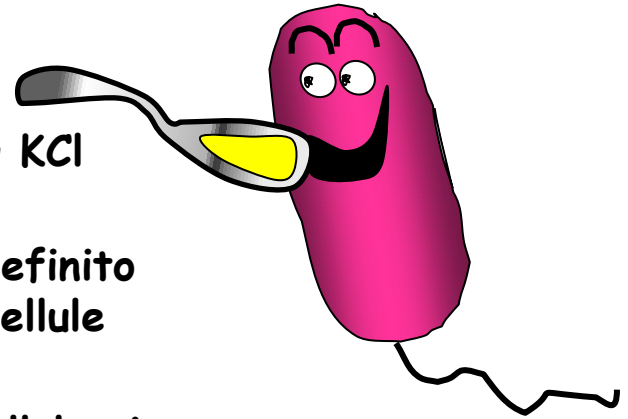
terreno ricco e isotonico in cui le cellule si sviluppano senza andare incontro a stress



Lo stato di competenza danneggia i batteri

che, dopo la trasformazione, possono riprendersi in questo terreno

Le colture raggiungono A600 3-5 con aerazione normale (250rpm) ma possono arrivare anche a 10-15 forzando l'aerazione



14

13

12

11

10

9

8

7

6

5

4

3

2

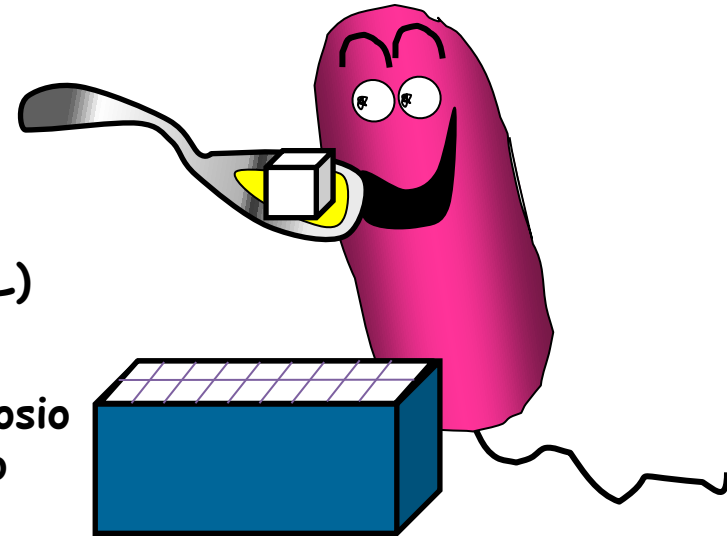
1

SOC

Super Optimal Broth (Catabolite repression)

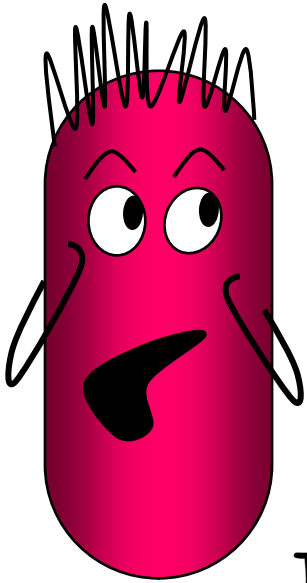
SOB +10mM $MgCl_2$ (0.952g/L) 20mM glucose (3.603g/L)

Il SOC può essere preparato aggiungendo $MgCl_2$ e glucosio da soluzioni concentrate sterili al SOB già preparato



Il glucosio è una buona fonte di carbonio e reprime i promotori sensibili (es. Plac) ritardando l'inizio dell'espressione dopo la trasformazione

Il magnesio è necessario per le attività enzimatiche connesse alla replicazione del DNA e stabilizza la membrana



T.B.

12g peptone, 24g YE, 4g glicerolo
72 mM K_2HPO_4 , 17 mM KH_2PO_4 ,

TERRIFIC BROTH: adatto per produzioni
su piccola scala, in laboratorio

Terreno ricco , tamponato con fosfati
Oltre a YE e peptone (380% e 20%>LB) contiene una fonte
aggiuntiva di carbonio, facilmente utilizzabile

I componenti base si sciolgono in 900 mL; dopo la
sterilizzazione si aggiungono 100 mL di soluzione di tampone
fosfato 1M (170mM KH_2PO_4 e 720 mM K_2HPO_4)

Le colture raggiungono $A_{600} \sim 5-8$



S.B.

32g peptone, 20g YE, 5g NaCl + 950 H₂O

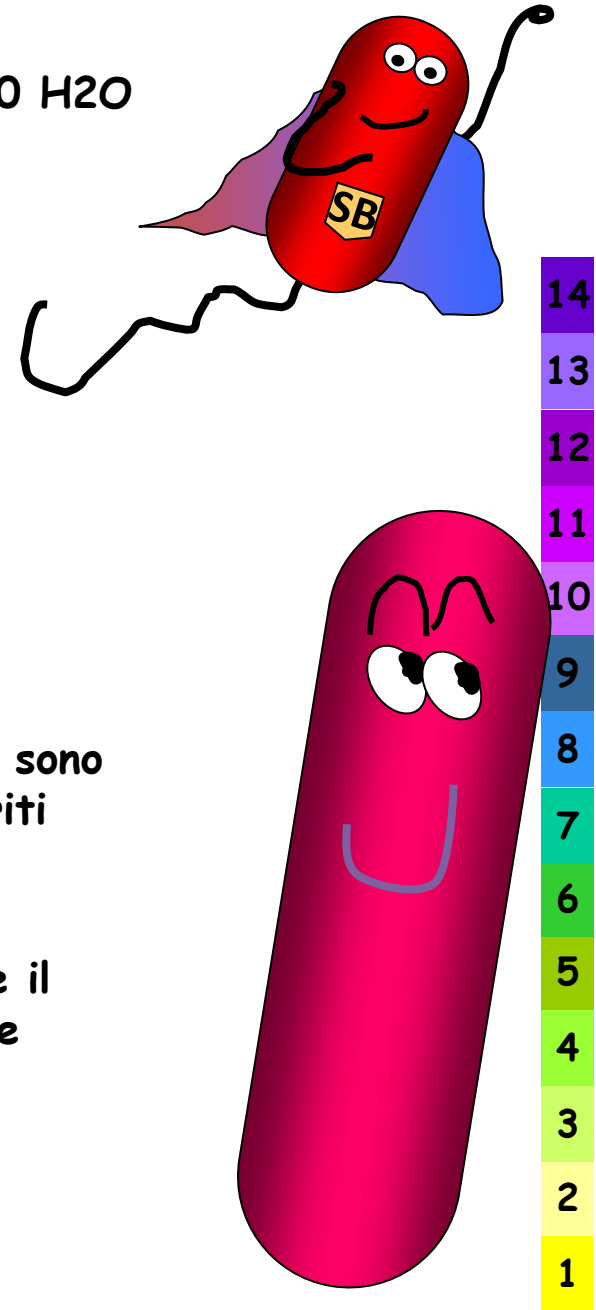
SUPER BROTH: adatto per produzioni su piccola scala, in laboratorio

Molto ricco in di peptone e in estratto di lievito (220% e 300% rispetto a LB)

Al terreno si aggiungono 50 ml di TB₂ o della soluzione di Sali "M9 5x" (tampone fosfato, sale, NH₄Cl)

Quando la coltura arriva a saturazione peptone e YE sono ancora in eccesso ma i nutrienti in tracce sono esauriti

Le crescite in SB sono molto alte, specialmente se il terreno è tamponato; possono essere ulteriormente migliorate aggiungendo glicerolo



Grandi produzioni

terreni chimicamente definiti, che presentano il vantaggio di non contenere ingredienti di composizione non nota o di provenienza animale, che potrebbero contravvenire alle regole *GMP* (Good manufacturing practices)

Un terreno sintetico particolarmente adatto a ottenere una buona crescita è quello messo a punto da Neidhart nel 1974 per le *Enterobacteriaceae*.

COMPONENTI		ml PER LITRO
TERRENO DI NEIDHARDT	sali	100
	mix aminoacidi a altro	50
	triptofano	20
	tirosina (+ agar 20 g*)	400
	adenina	50
	guanina	50
	uracile	50
	2-3 diidrossibenzoato	50
	acido glutammico	50
	idrogenofosfato di potassio	1
	acqua distillata sterile	179

I "Sali" e le "Singole soluzioni" si sciolgono al calore e si sterilizzano in autoclave (121°C, 15 minuti). Il "mix di aminoacidi e altro" va sterilizzato per filtrazione

SALI	COMPONENTI	MOLARITA'
	MOPS pH7.4	1
	TRICINA pH7.4	1
	FeSO4	0,01
	NH4Cl	1,9
	K2SO4	0,276
	CaCl2	0,0005
	MgCl2	0,528
	NaCl	5
	NH4-Molib(x4H2O)	0,0000003
	H3BO3	0,0004
	CoCl2	0,00003
	CuSO4 (x5H2O)	0,00001
	MnCl2	0,00008
	ZnSO4	0,00001
SINGOLE SOLUZIONI	COMPONENTI	MOLARITA'
	Triptofano	0,0001
	Tirosina	0,0002
	Acido Glutammico	0,0006
	Adenina	0,0002
	Guanina	0,0002
	Uracile	0,0002
	2,3-didrossibenzoato	0,0001
	K2HPO4	0,132

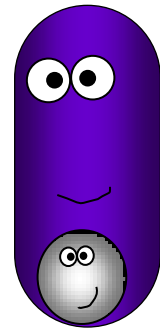
COMPONENTI	MOLARITA'
Alanina	0,0008
Arginina	0,0052
Asparagina	0,0004
Aspartato	0,0004
Cisteina	0,0001
Glutamina	0,0006
Glicina	0,0008
Isoleucina	0,0004
Leucina	0,0008
Iisina	0,0004
metionina	0,0002
Fenilalanina	0,0004
Prolina	0,0004
Serina	0,01
Treonina	0,0004
Valina	0,0006
Istidina	0,0002
Tiamina	0,0001
Pantotenato	0,0001
p-Am-benzoato	0,0001
p-idrossibenzoato	0,0001
Citosina	0,0002

Il terreno può essere reso solido aggiungendo agar alla soluzione di tirosina in 400 ml, sciogliendolo e mescolando velocemente con gli altri componenti

GENERE BACILLUS

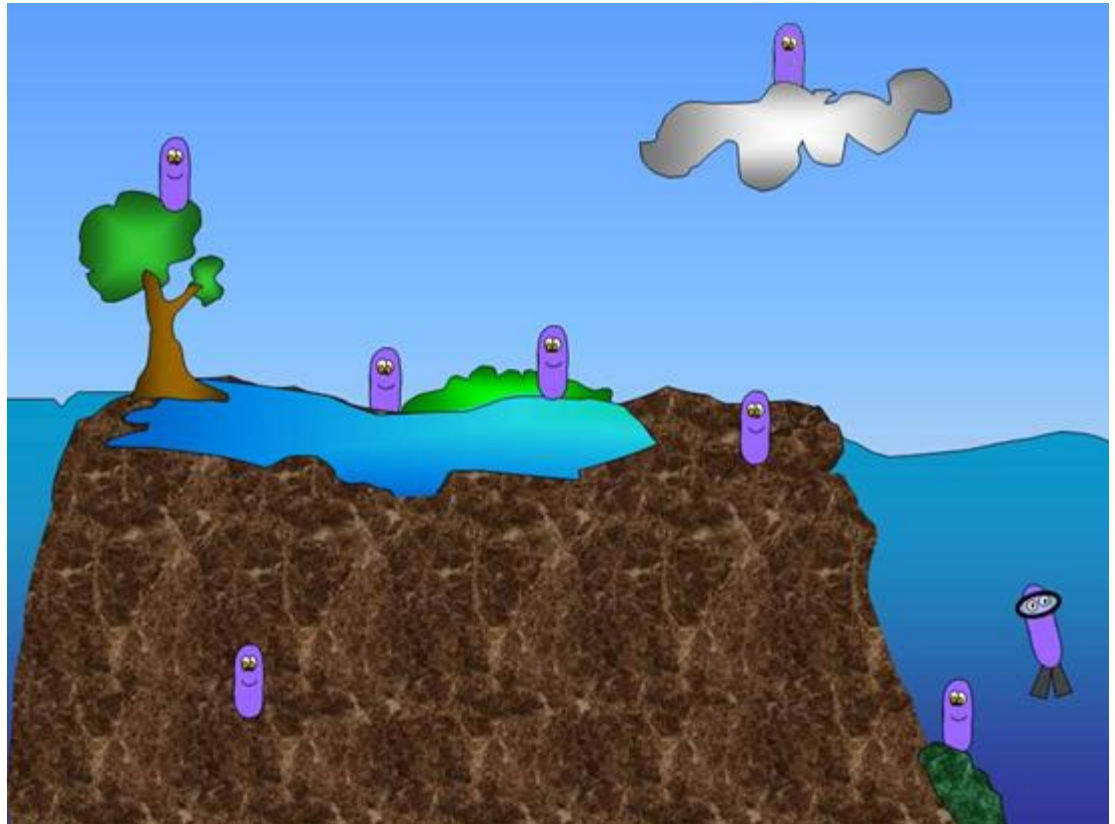
Microrganismi monodermi,
gruppo a basso contenuto G+C

aerobi, caratterizzati dalla presenza di acidi grassi
ramificati all'interno della membrana citoplasmatica



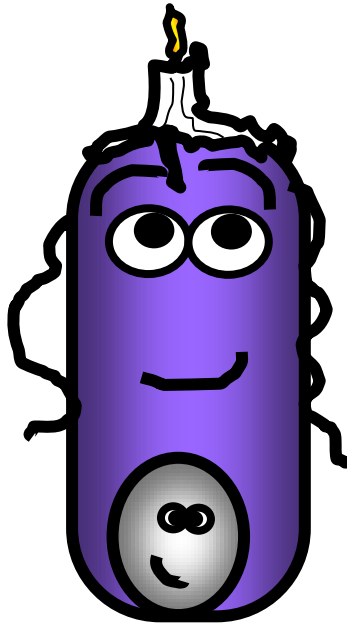
Uno dei generi più diffusi
negli ambienti naturali

Grazie alla capacità di
produrre endospore



La dispersione all'interno del genere è elevata e le numerosissime specie sono divise in gruppi

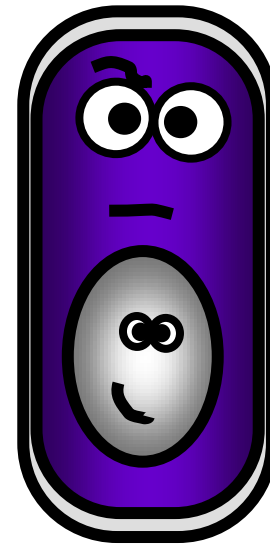
B. anthracis. importante patogeno per animali e uomo, appartiene allo stesso gruppo di



B. cereus che può essere causa di intossicazioni da cibo e di *B. thuringensis*, patogeno per gli insetti

I diversi gruppi, nell'insieme, sono in grado di affrontare condizioni di crescita che vanno da pH 4,5 → 9-11 e da 5 °C → oltre 70 °C

La maggior parte delle specie con interesse industriale è mesofila e cresce a pH neutro





Le specie di *Bacillus* hanno rilevanza industriale

Per la produzione di enzimi, antibiotici, e metaboliti diversi di interesse per l'uomo

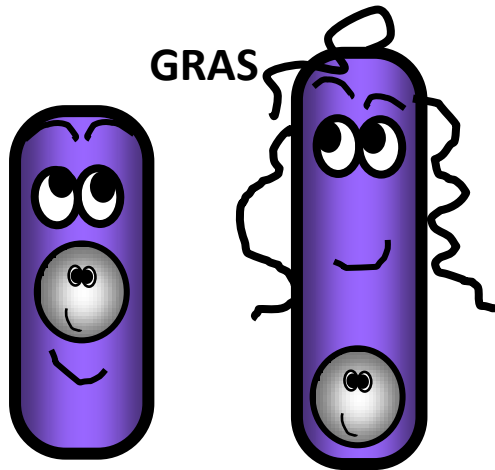
Per la capacità di produrre tossine che sono usate come insetticidi biologici (*B. thuringiensis*)



Le capacità di fermentazione ne hanno favorito l'uso
in campo alimentare già in tempi antichi

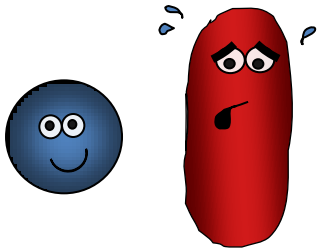
Giappone, alimento fermentato a base
di soia (NATTO) da migliaia di anni

B. licheniformis e *B. subtilis* classificati come GRAS
(Generally Regarded as Safe) già dagli anni '70

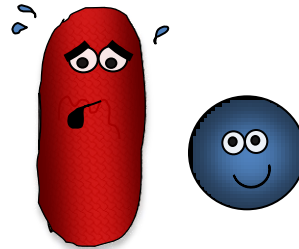


La grande diffusione è legata alla capacità di formare endospore quando i nutrienti scarseggiano

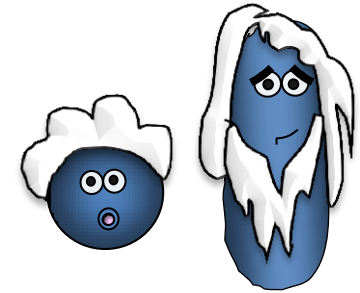
Le spore, forme di resistenza, permettono di sopravvivere anche molto a lungo in situazioni critiche



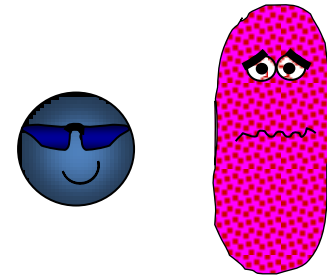
CALORE



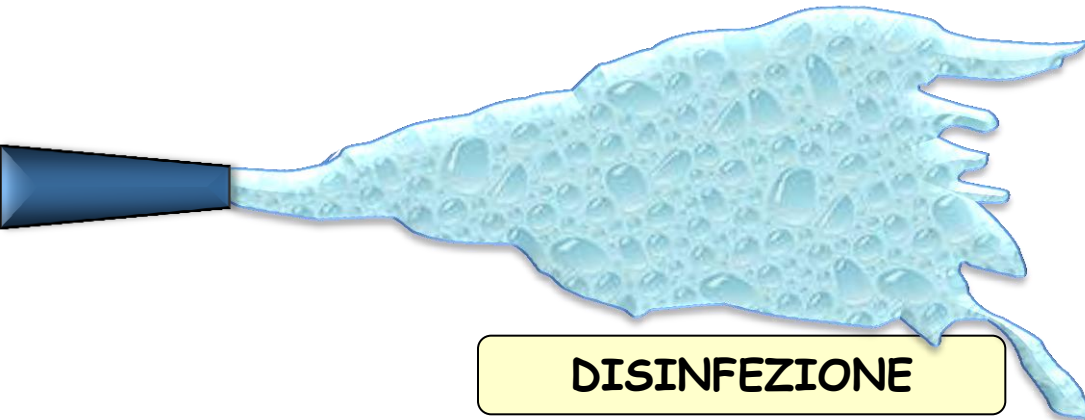
ESSICCAMENTO



INVECCHIAMENTO



RAGGI UV



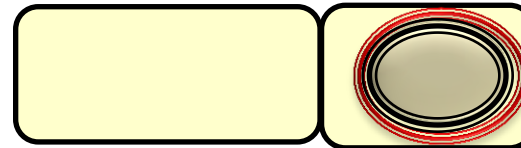
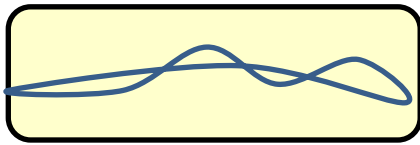
DISINFEZIONE

Processo di sporificazione

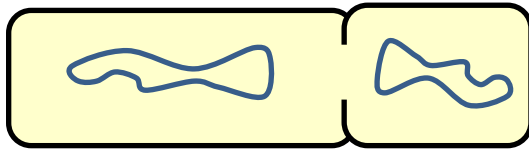
Come tutti i batteri, i *Bacillus* si dividono solitamente per schizogonia

Ma in condizioni di carenza di nutrienti
o di altri tipi di stress ambientali

O in colture molto affollate, si innesca
il processo di sporulazione

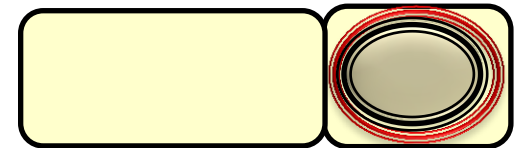


VII- rilascio

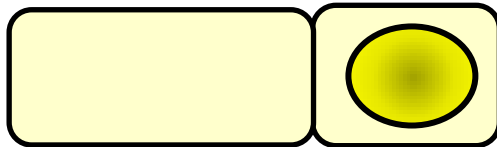


II-Divisione asimmetrica

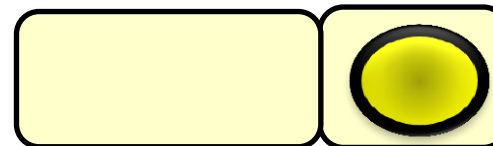
VI- maturazione



V- tuniche



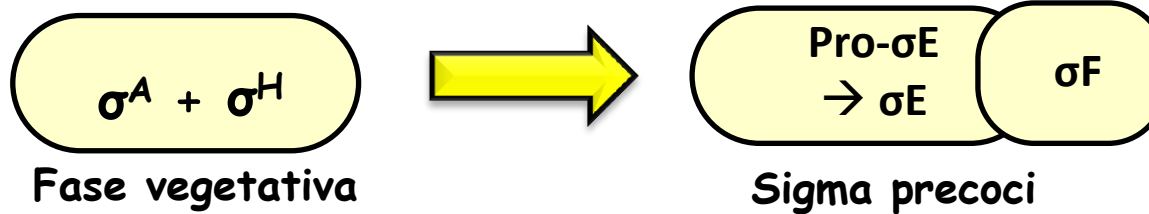
III- Protoplasto prespora



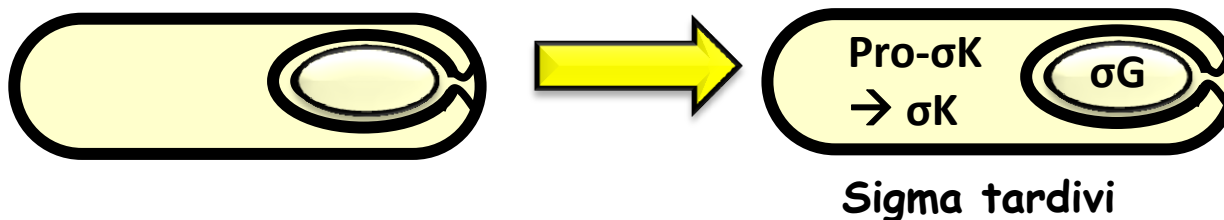
IV- Parete e cortex

SPORULAZIONE

La formazione dell'endospora (8-10h) è controllata da diversi meccanismi tra cui la sintesi di fattori sigma alternativi, particolarmente importanti



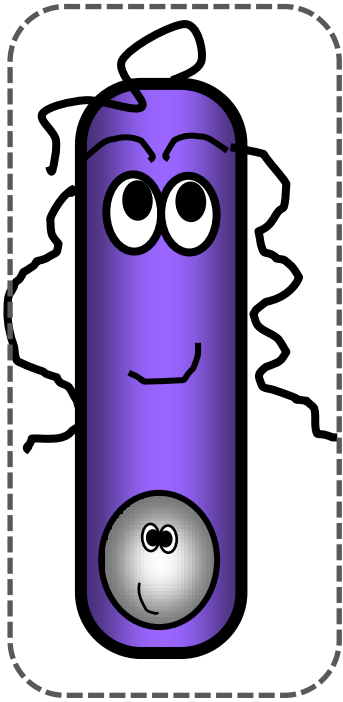
al segnale di scarsità di nutrienti nell'ambiente, si avviano i processi che portano alla sintesi di fattori sigma alternativi



L'inizio della sporulazione è controllato da Spo0A-(P) che riceve il segnale dai sensori KinA,B attraverso la fosforilazione di Spo0F,B e induce o reprime ~ 500 geni



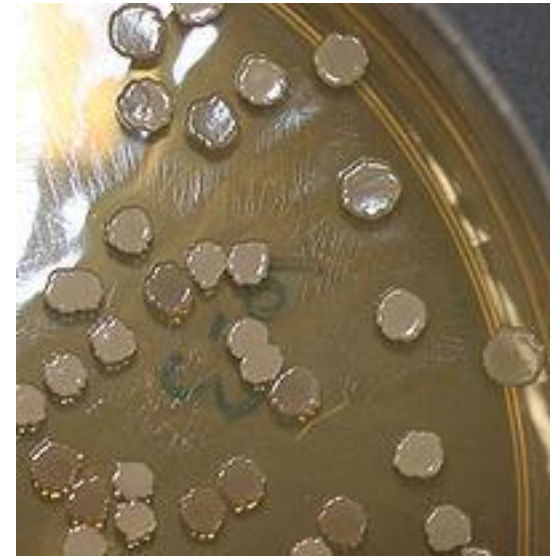
La specie che è stata maggiormente studiata per l'impiego nelle biotecnologie microbiche è



B. subtilis

I SUOI VANTAGGI:

Assenza di endotossine
(mancanza di O.M.)



produttore di additivi
alimentari



GRAS

Possibilità di secrezione
diretta nel terreno

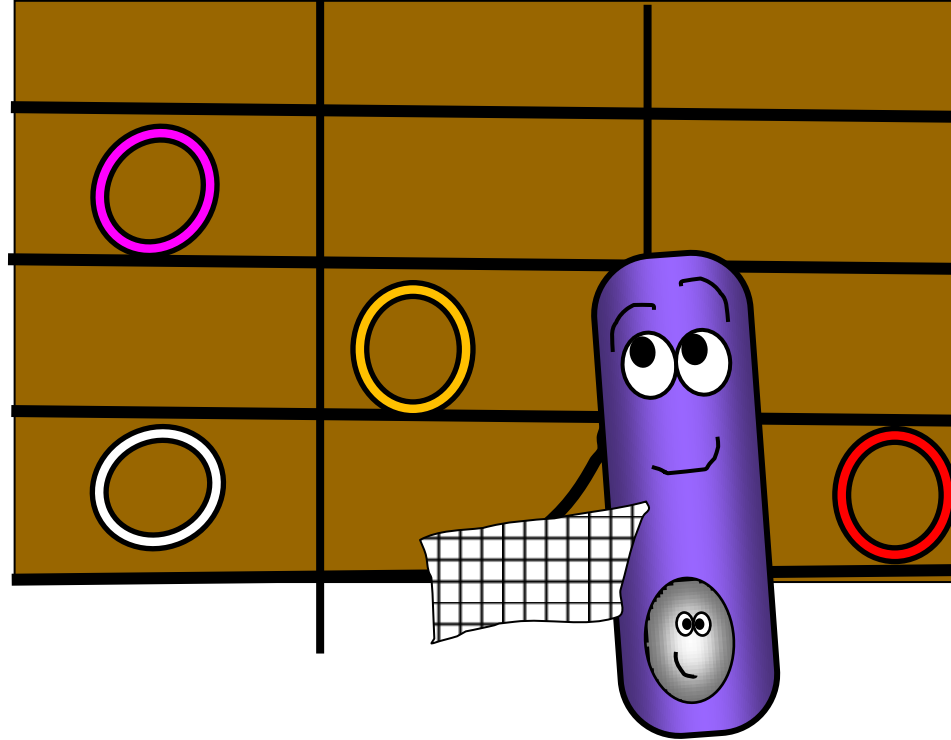
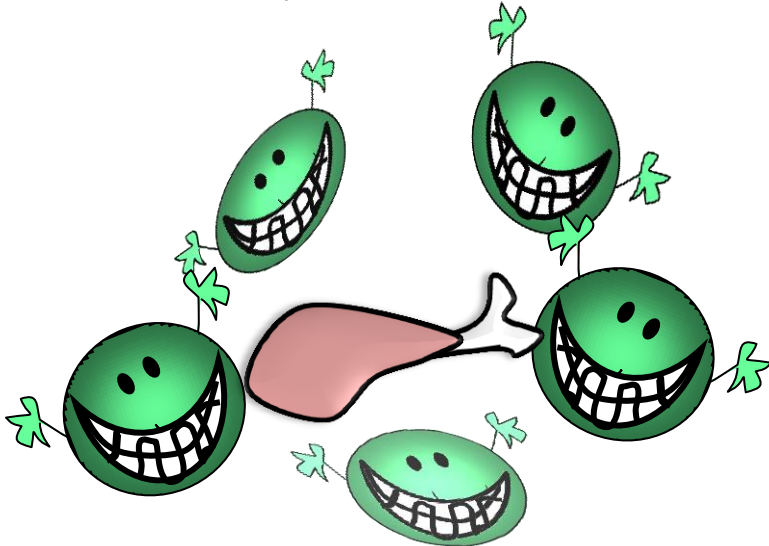


ambiente meno riducente
di quello del citoplasma

I SUOI SVANTAGGI

La produzione di proteine eterologhe di batteri didermi o di eucarioti è ostacolata da problemi di secrezione

Il numero di proteasi è elevato

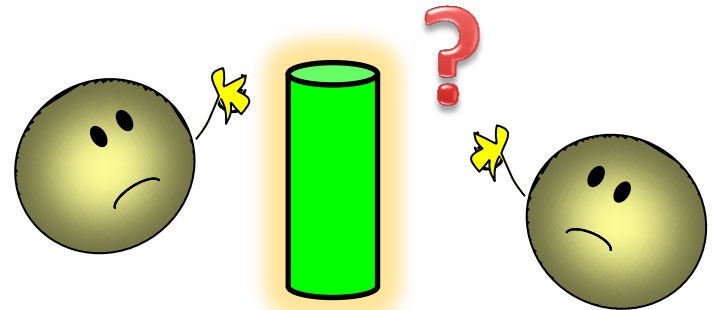


I plasmidi, specialmente multicopie, tendono a essere instabili

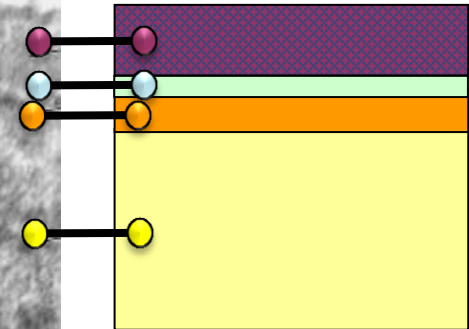
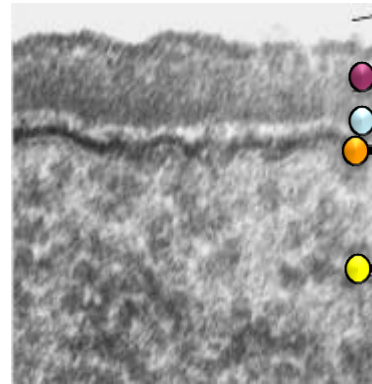
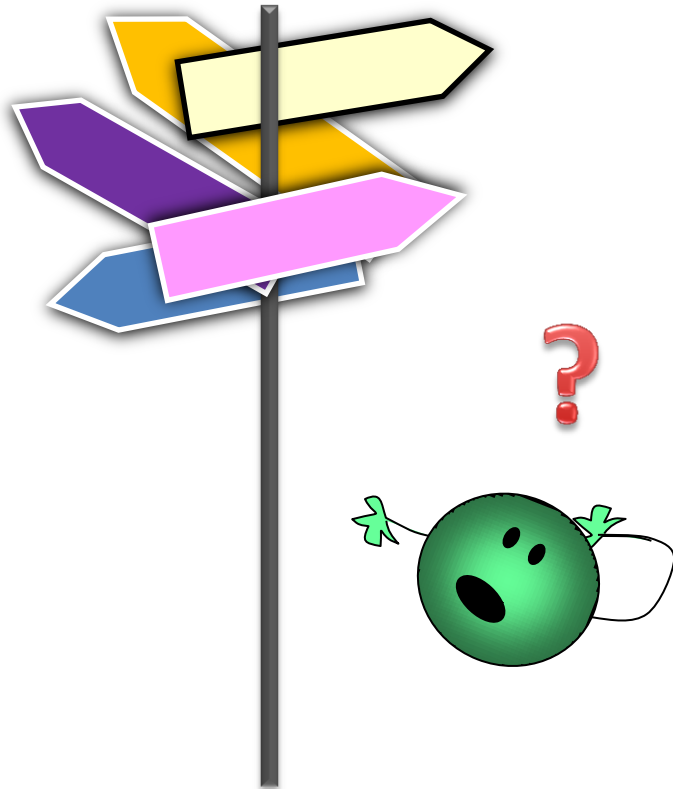
Scarsità di plasmidi di espressione

PROBLEMI DI SECREZIONE

Le proteine ricombinanti sono scarsamente riconosciute dalla traslocasi



Le proteine in *Bacillus* hanno 5 possibili localizzazioni



CITOPLASMA

MEMBRANA

INTERFACCIA
MEMBRANA-PARETE

PARETE

ESTERNO

LA LOCALIZZAZIONE DIPENDE DALLA PRESENZA DI SEGNALI DI SECREZIONE

In mancanza di segnali specifici le
proteine restano nel citoplasma

Le proteine destinate alla membrana hanno domini
transmembrana e modificazioni che ne permettono
l'ancoraggio alla membrana o alla parete

Le proteine secrete possiedono peptidi
segnale con caratteristiche ben definite
all'estremità N-terminale

Le proteine con funzioni legate alla
sintesi e al mantenimento della parete

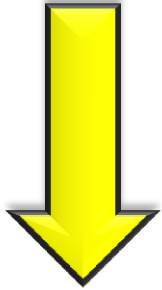
Alla traslocazione o al folding e
alla verifica di altre proteine



RESTANO NELL'INTERFACCIA
TRA PARETE E MEMBRANA

LA SECREZIONE AVVIENE IN PASSI SUCCESSIVI

RICONOSCIMENTO



INVIO ALLA MEMBRANA

INTERAZIONE CON LA
VIA DI SECREZIONE

TAGLIO PROTEOLITICO
DA PARTE DELLA SPASI

RILASCIO DEL
PEPTIDE MATURO

In base alla Spasi che li taglia, i peptidi segnale sono divisi in 4 gruppi

Spasi di tipo I (Sip S,T,U,V,W)

SEC

→ secreti nell'ambiente extracellulare; qualcuno trattenuto nella parete o traslocato alla IMS delle endospore

TAT

→ Indirizzate al sistema TAT (twin-arginine traslocase) in genere secrete all'esterno

**Gruppo I
Secretorie**

Spasi di tipo II (LspA)

**Gruppo II
Lipoproteine**

**SEC-
dipendenti**

Pseudopiline peptidasi (ComC)

**Gruppo III
Prepiline**

**SEC-
indipendenti**

Sistemi ABC (SunT AlbE,F)

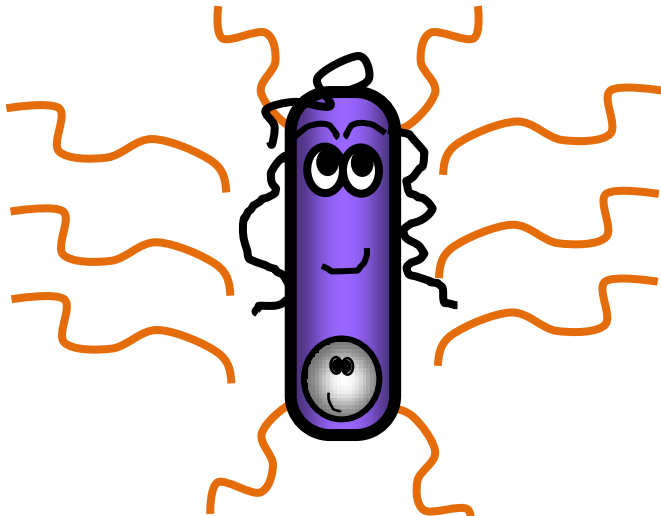
**Gruppo IV
Feromoni/Batteriocine**

SEC-indipendenti

Le proteine eterologhe sono in genere inserite

in fusione con una sequenza
segnale del gruppo I

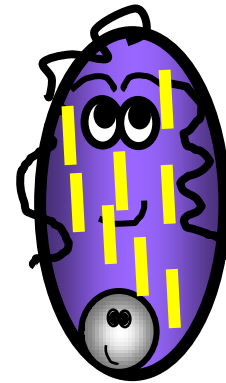
Per la secrezione nel terreno



La struttura della SP è di solito
quella riconosciuta da SEC

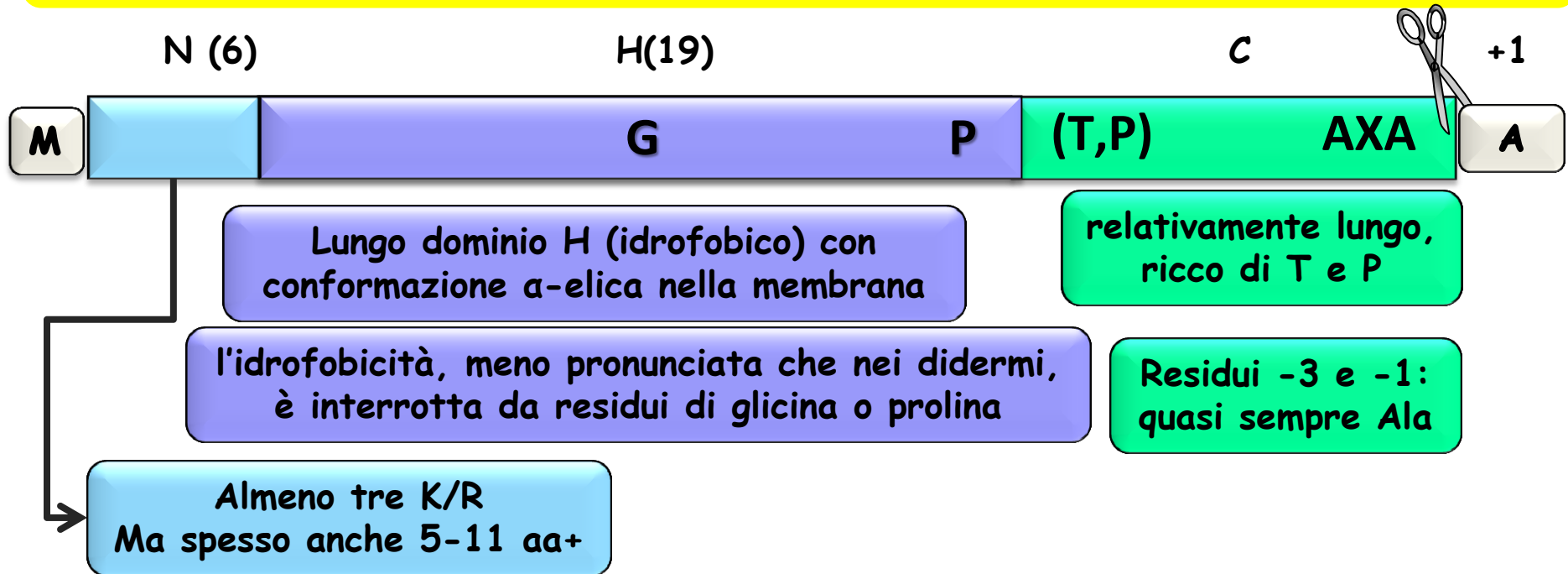
Senza sequenza segnale, a valle di un
RBS e in fusione con +1 se necessario

Per l'accumulo nel citoplasma



Gruppo I traslocate dal sistema SEC

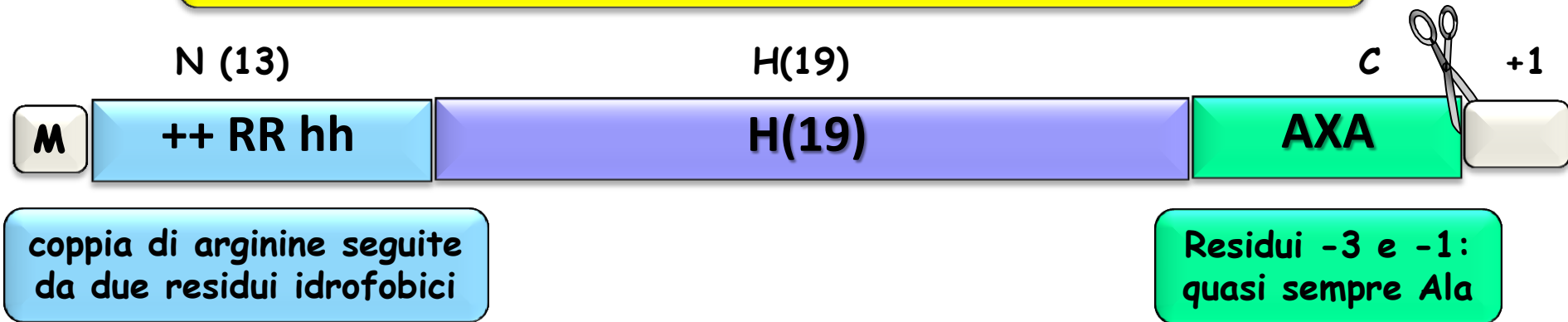
Il peptide segnale spesso più lungo di quello dei didermi (H ~ 19-44 aa; in media 28)



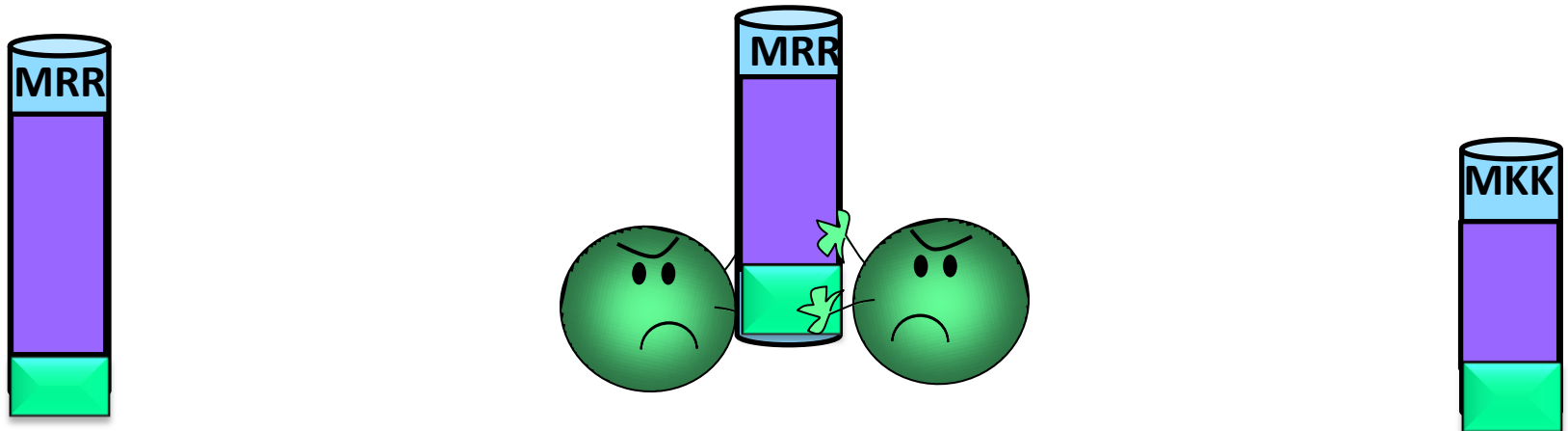
Il sito attivo delle Spasi "Sip" comprende una coppia di residui di serina localizzati in stretta vicinanza al lato esterno della membrana

Per far secernere nel terreno le proteine, si usano quelle di tipo I

**Gruppo I traslocate dal sistema TAT (Twin Arginine Traslocase):
la sequenza segnale è più lunga (~36 aa)**



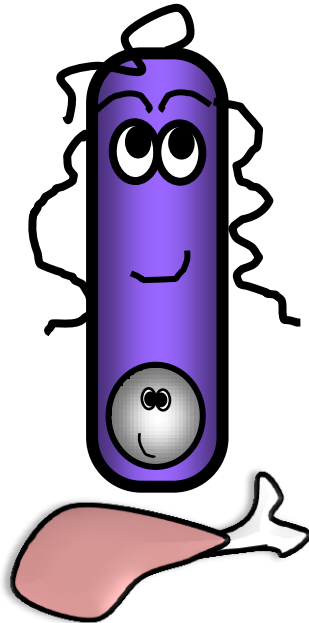
In *E. coli* è stato osservato che TAT e SEC possono competere per alcune preproteine e che i fattori discriminanti sono la lunghezza e l'idrofobicità del dominio H



PROBLEMI LEGATI ALLA PRESENZA DI PROTEASI

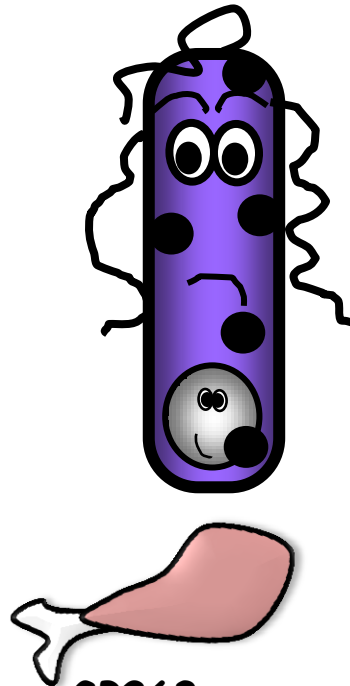
Sono stati minimizzati creando ceppi deleti
nei geni che codificano proteasi

Attività proteasica
100%



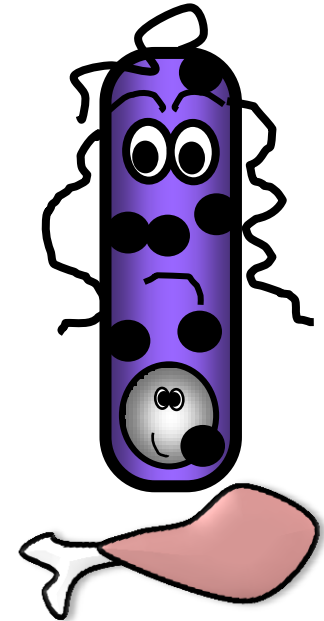
BSUB 168 (WT)

Attività proteasica
1%



GP263: manca
di 5 proteasi

Attività proteasica
0,15%



WB800: manca
di 8 proteasi

PROBLEMI LEGATI ALLA INSTABILITA' DEI PLASMIDI

la maggior parte dei plasmidi di batteri monodermi che portano DNA eterologo ha una intrinseca instabilità

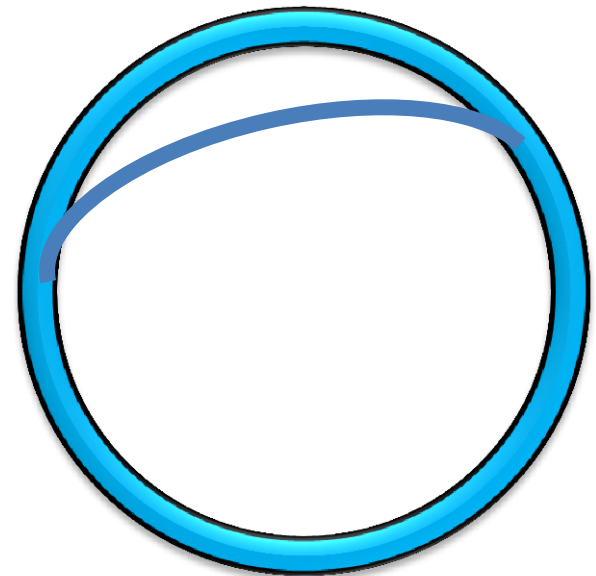
Molti plasmidi naturali usati come scheletro per i vettori hanno una replicazione a cerchio rotante con passaggio per ssDNA e contengono zone di repeat

Es. pUB110 e pE194, plasmidi naturali di stafilococchi, si replicano bene in *Bacillus* ma perdono di stabilità specialmente quando contengono DNA eterologo

Questo problema è stato risolto costruendo vettori (Es. serie pHMC)

derivati da plasmidi naturali come pAM β 1 e pBS72

Che si replicano invece con un meccanismo a theta

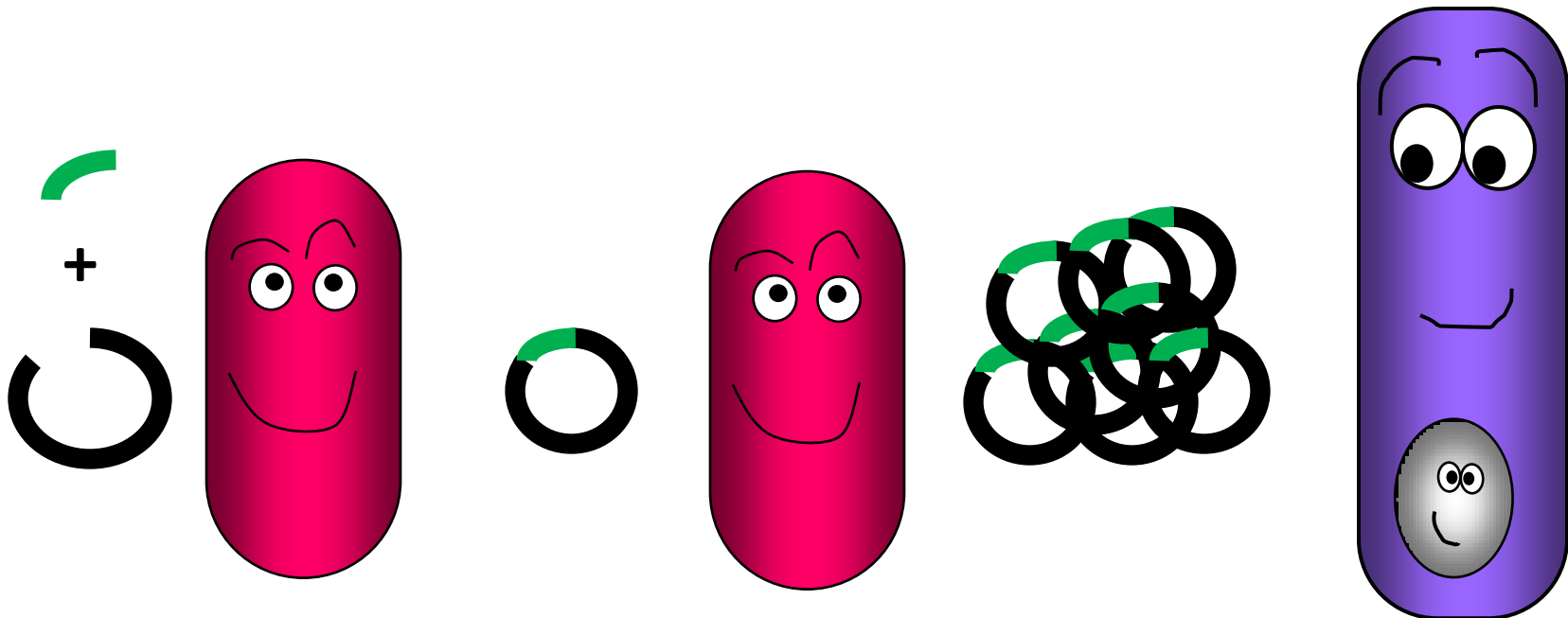


PROBLEMI - SCARSITA' DI VETTORI DISPONIBILI

Negli ultimi anni sono stati proposti diversi vettori di espressione destinati all'uso in *Bacillus*

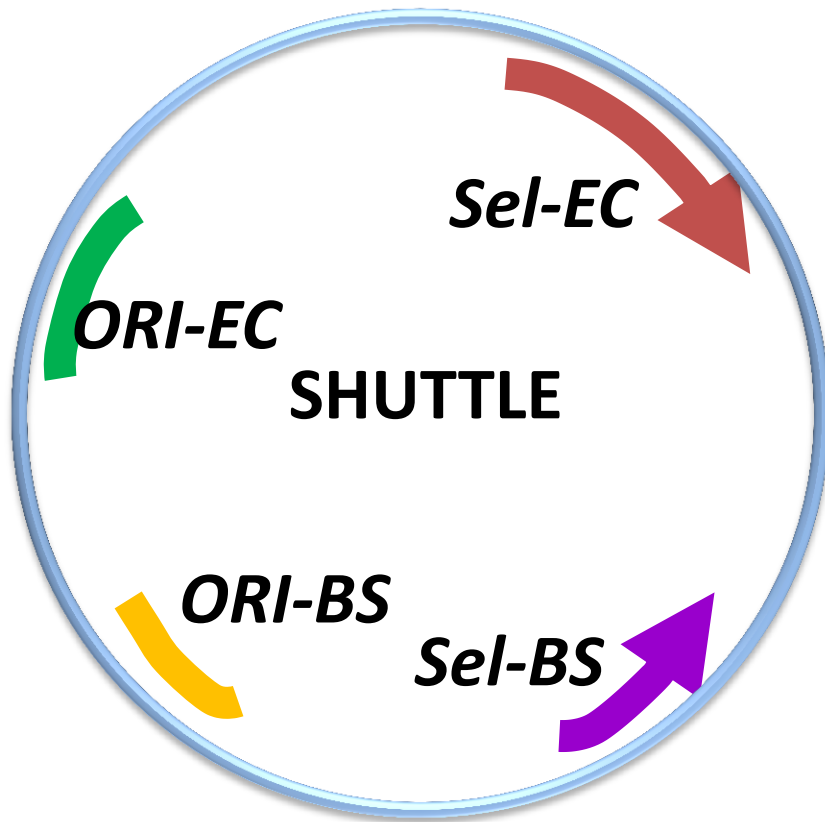
Considerando la maggiore flessibilità del sistema "*E. coli*" questi plasmidi sono sempre "shuttle"

Per propagare il DNA in *E. coli* e disporre di una buona quantità di DNA plasmidico già controllato per trasformare *Bacillus*



Un plasmide shuttle ha due
diversi repliconi

E, spesso, due diversi marcatori di prima
selezione (uno per ospite)

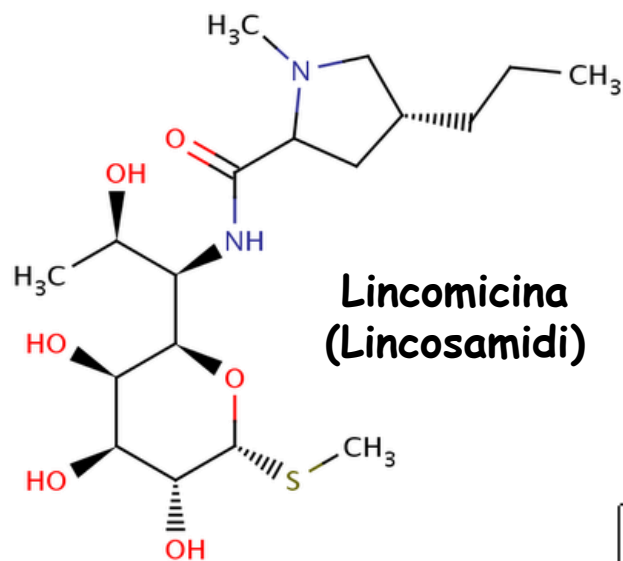


La selezione in *E. coli* si effettua in
genere con la resistenza all'Ampicillina

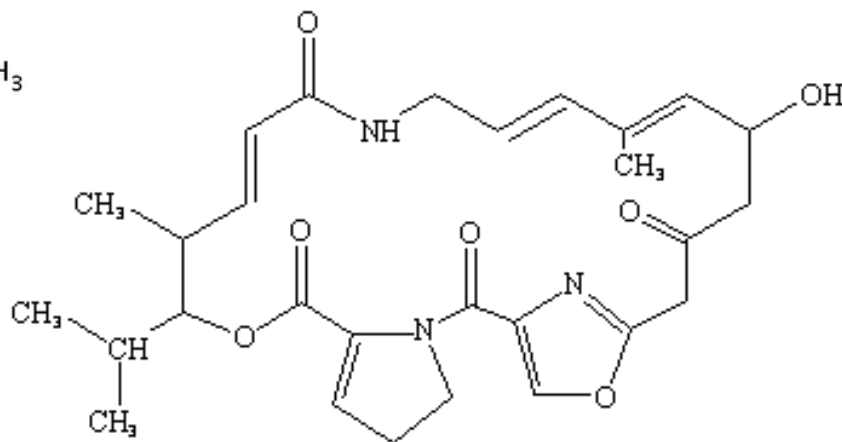
Le specie di *Bacillus*, con l'eccezione di
B. anthracis sono naturalmente
resistenti a questo antibiotico

Le selezioni più usate sono: cloramfenicolo,
kanamicina, spectinomomicina

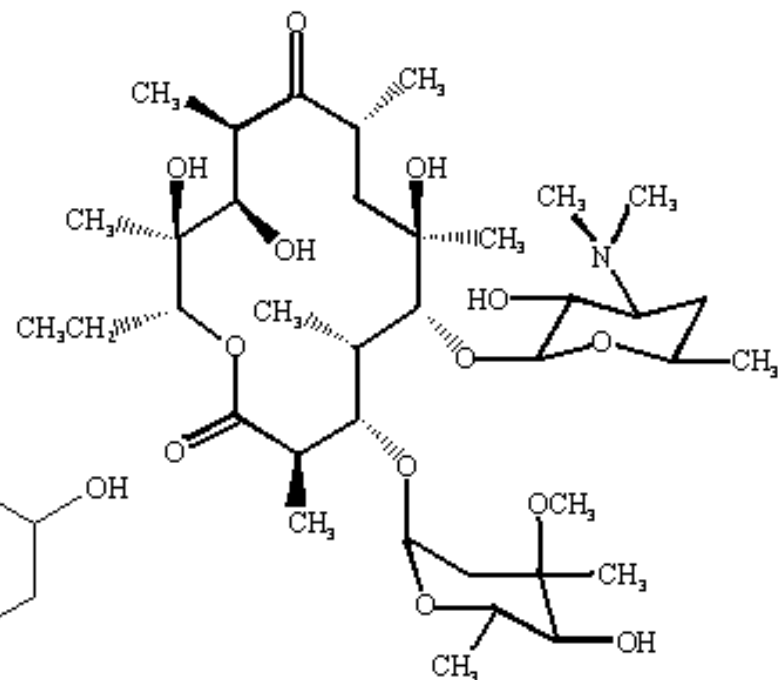
In *Bacillus* possono essere usati come marcatori anche antibiotici inefficaci in *E. coli*



Lincomicina (Lincosamidi)



Streptogramin A (Streptogramine)



Eritromicina (Macrolidi)

Tutti questi antibiotici bloccano la sintesi proteica legandosi alla subunità 50S

I determinanti di resistenza (geni *erm*)
Sono stati scoperti in *Enterococcus*

Il gene usato sui vettori per *Bacillus* è *ermC*, che conferisce il fenotipo *MLS^R*

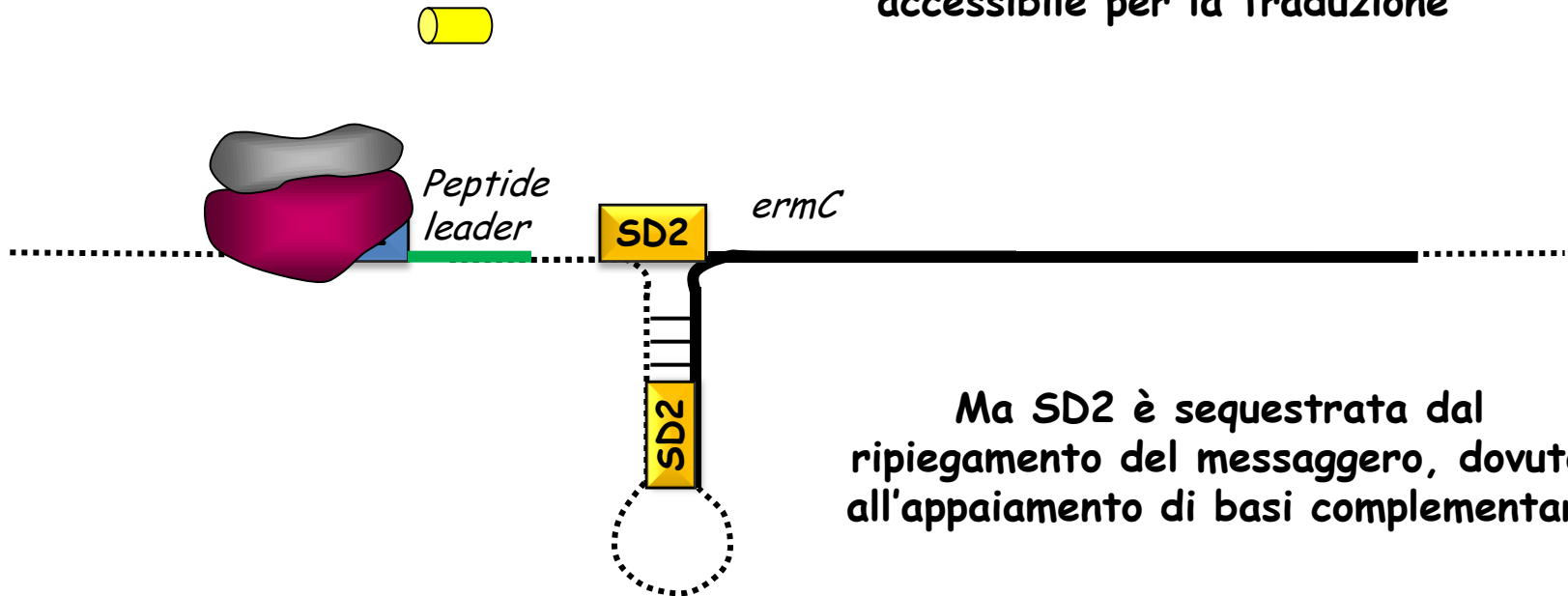
Il meccanismo con cui i geni *erm* conferiscono la resistenza a questo gruppo di antibiotici è detto

ATTENUAZIONE TRADUZIONALE

e permette di ottenere un mRNA molto stabile
(emivita ~ 40') a seguito dello stallo del ribosoma

Nel messaggero sono presenti
due sequenze SD

SD1 è normalmente
accessibile per la traduzione



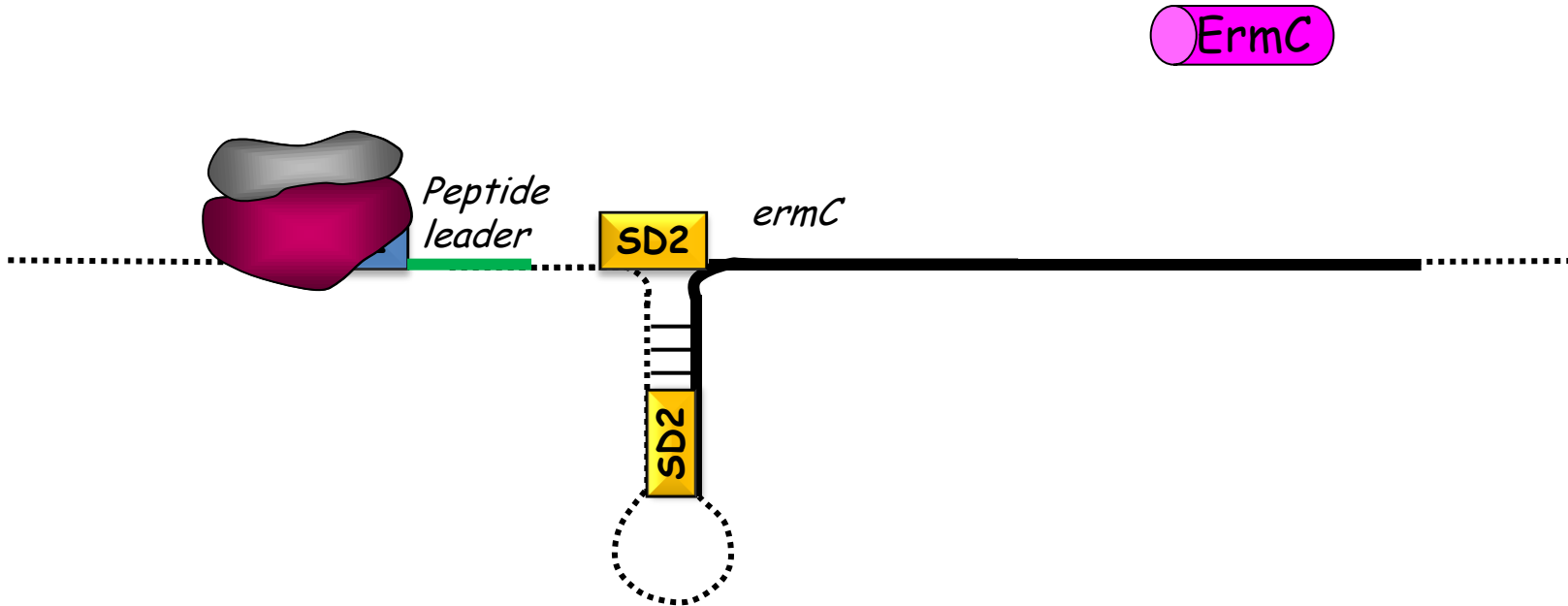
Ma SD2 è sequestrata dal
ripiegamento del messaggero, dovuto
all'appaiamento di basi complementari

In assenza di induzione quindi il solo
prodotto è il piccolo peptide

Quando l'eritromicina si lega al
ribosoma (il suo bersaglio)

Ne provoca lo stallo prima che la
traduzione del peptide sia terminata

Lo stallo del ribosoma provoca un cambiamento della
conformazione del messaggero, che espone SD2



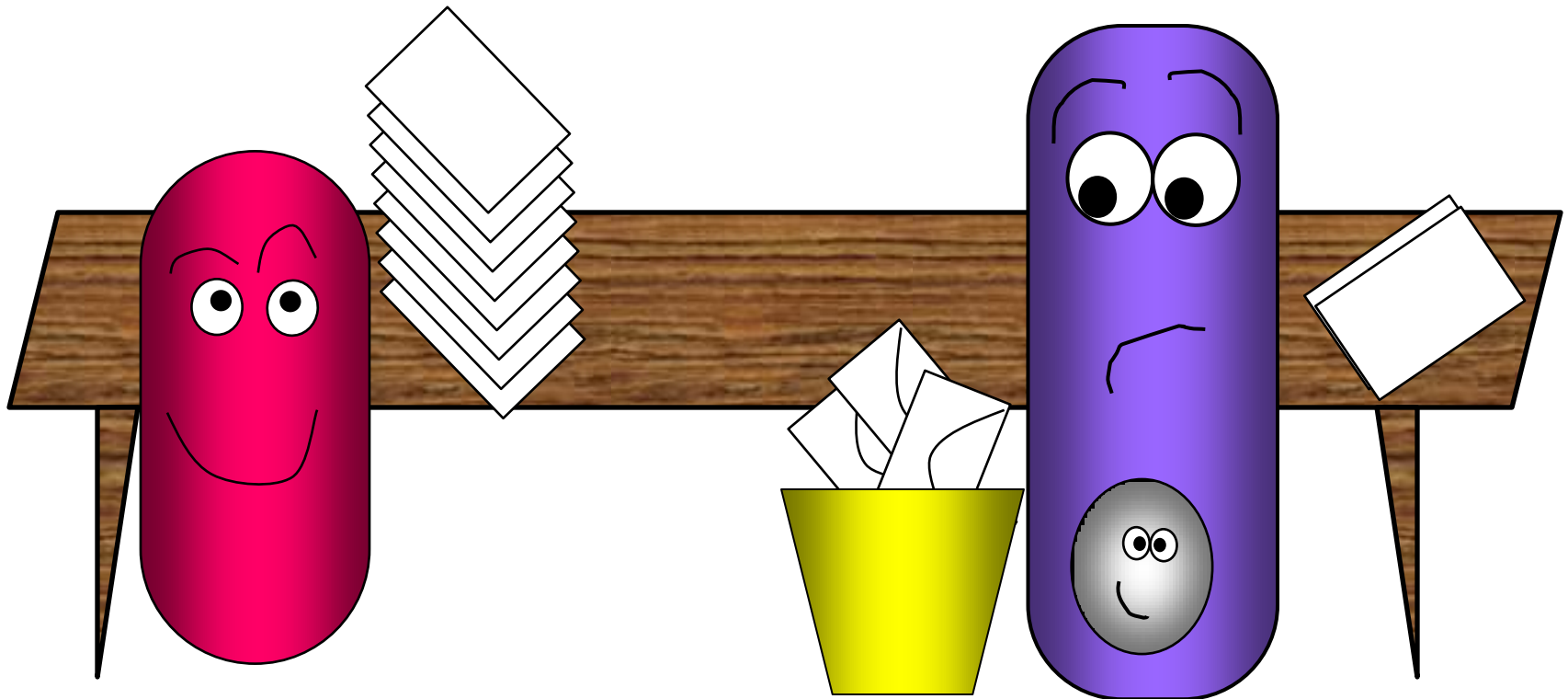
La traduzione di *ermC* può essere portata a compimento da un
altro ribosoma non legato dall'eritromicina o già metilato

L'allestimento di vettori di espressione è partito dallo studio approfondito della struttura dei promotori in *Bacillus*

I promotori di *Bacillus subtilis* (σ^A) e di *E. coli* (σ^{70}) condividono le regioni conservate -35 e -10 e la spaziatura che le separa

I promotori di *Bacillus* vengono trascritti da *E. coli*

Ma non tutti i promotori di *E. coli* sono trascritti in *Bacillus*



I promotori di *Bacillus* contengono diverse sequenze moderatamente conservate che da cui probabilmente dipende la possibilità che un promotore si esprima

Regioni ricche di A e T a monte della -35 e un'adenosina immediatamente a valle della -10

in diversi promotori di *Bacillus* è stata osservata la

sequenza "-16"
5'-RTRTG-3

E' conservata almeno in parte in promotori di *E. coli* definiti "estesi"

La sua presenza è spesso concomitante a quella delle sequenze "UP"

le due strutture non sono necessariamente correlate ma è probabile che contribuiscano entrambe alla forza del promotore

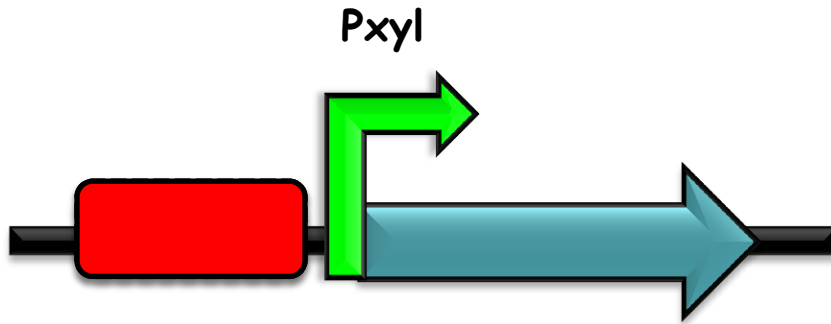
Tra i promotori più frequenti sui plasmidi per *Bacillus* si possono ricordare:

P_{xyl}, regolabile, indotto dallo xilosio

Represso da XylR
(in genere sullo stesso vettore)

Le sequenze a monte, responsabili
della repressione da catabolita

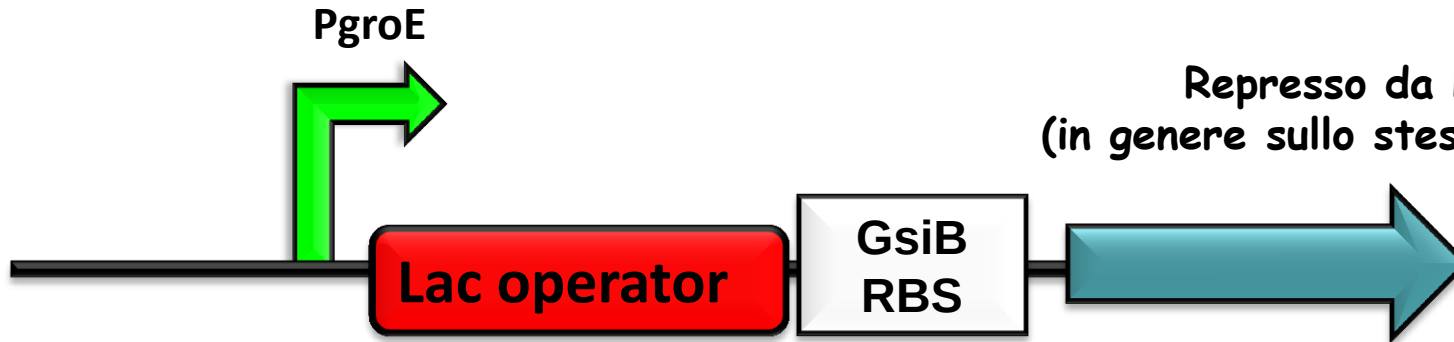
Non sono incluse nel
promotore utilizzato



P_{grac}: forte, artificiale, regolabile, indotto dall'IPTG

P_{gro} σ A dipendente + operatore lac

Represso da LacI
(in genere sullo stesso vettore)



Pspac: ibrido, regolabile,
indotto da IPTG

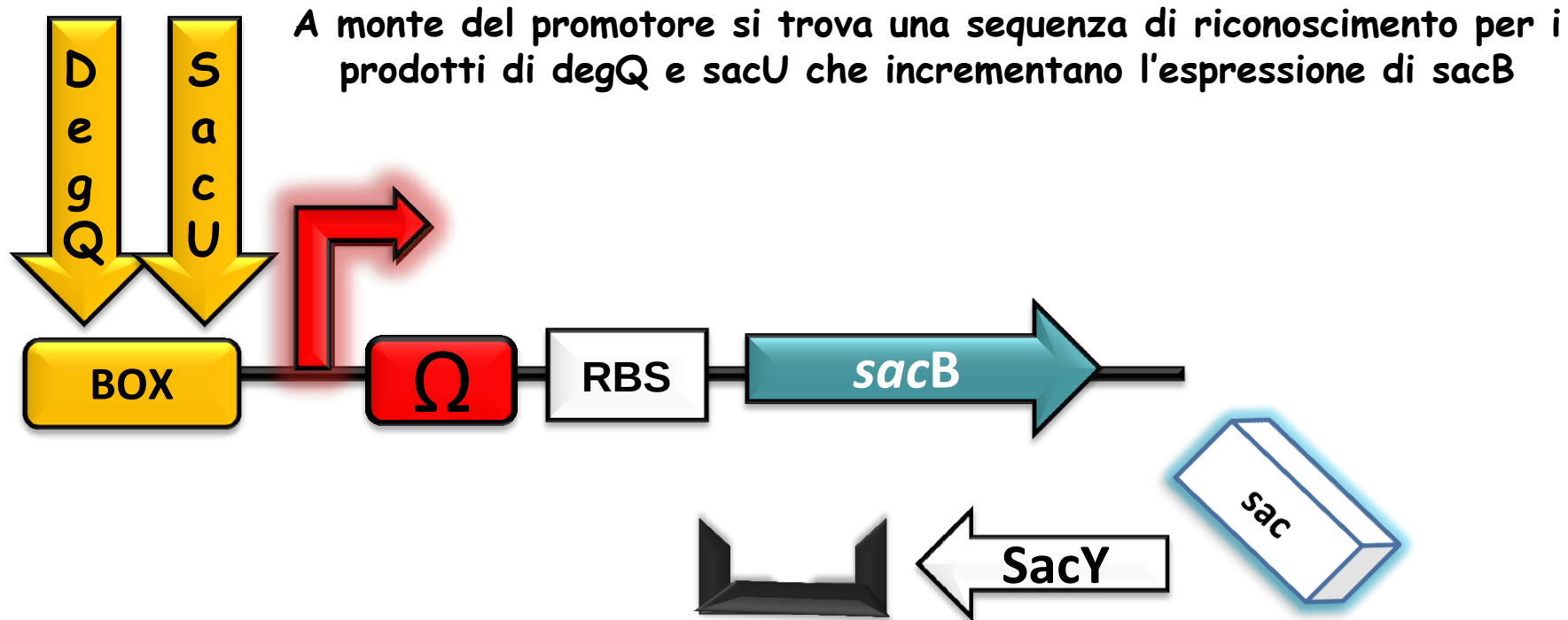
Represso da LacI
sullo stesso plasmide

sequenze 5' del fago SPO1 di *B subtilis*



seq 3' di Plac con operatore..

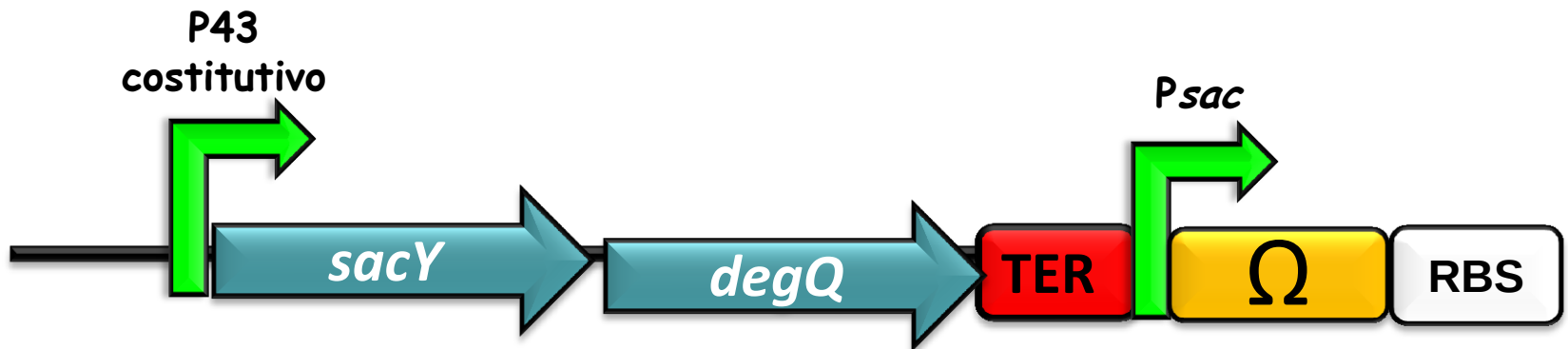
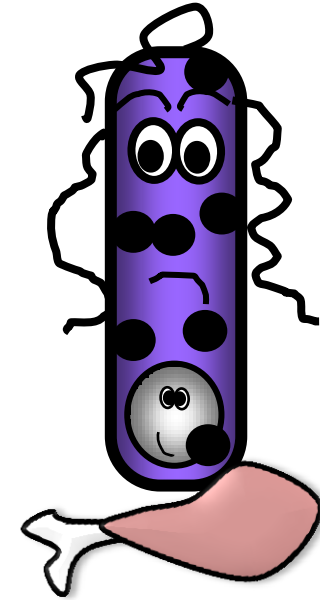
Psac promotore della levansucrase di *B. subtilis*: regolabile,
debole induzione con saccarosio



Tra il promotore di *sacB* e il suo RBS c'è una struttura simile a un terminatore ; *sacY*, che codifica un antiterminatore, media l'espressione indotta dal saccarosio

DegQ e SacU inducono anche alcune proteasi: la loro iperespressione non migliora la resa nei ceppi normali

Ma sono stati messi in un operon artificiale per aumentare la resa in WB800



Pdes: inducibile del freddo



Nei microrganismi, la tolleranza alle basse temperature è migliore e più diffusa della resistenza a temperature elevate

in risposta a una caduta della temperatura sono prodotte proteine di stress

Alcune controllano la fluidità della membrana che, a sua volta, influenza il trasferimento di elettroni, la pompa ionica e il trasporto dei nutrienti

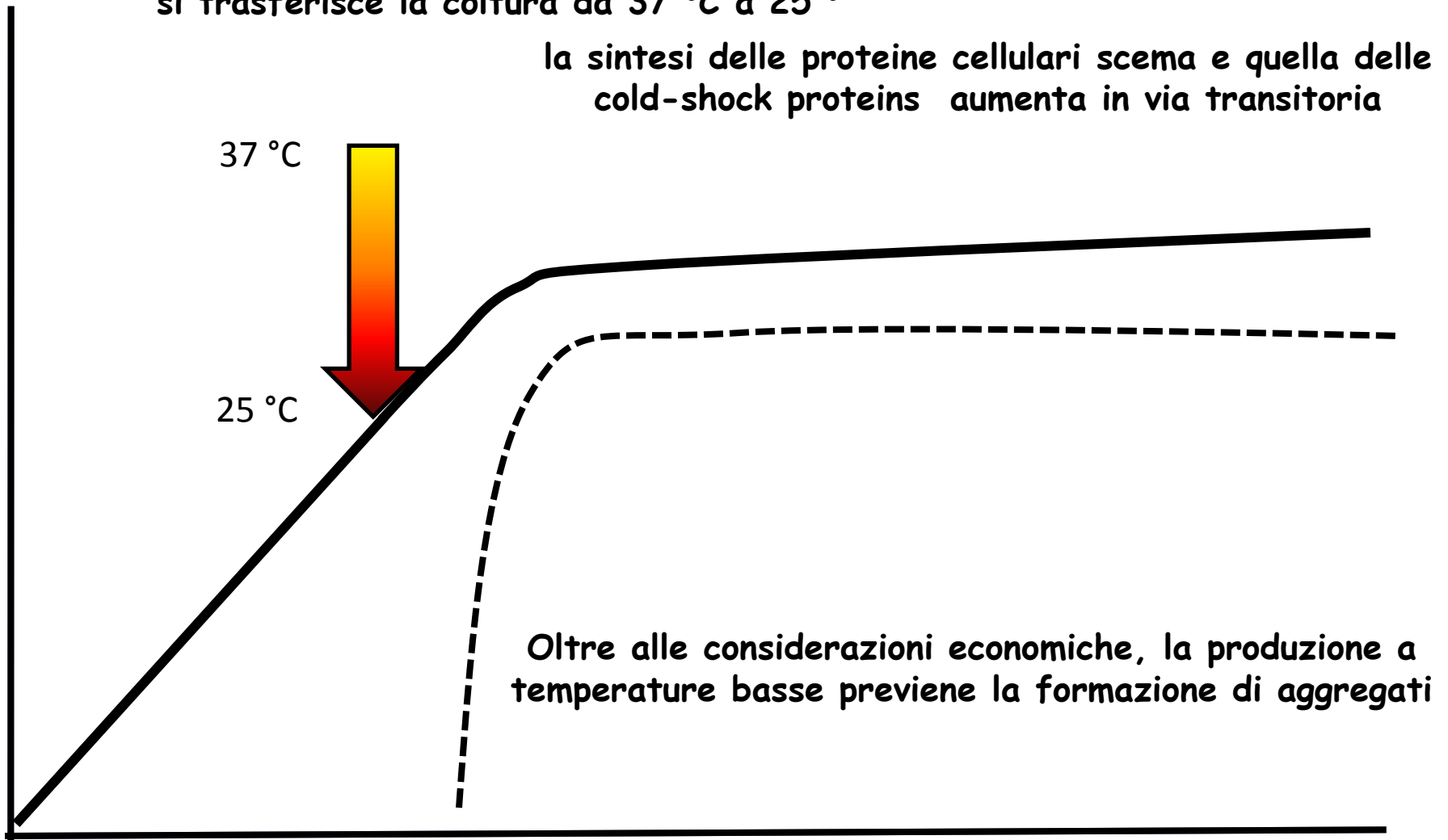
Tra le "cold-shock proteins" di *B. subtilis* una desaturasi di membrana, codificata da *des* catalizza la modificazione degli acidi grassi di membrana

Il suo promotore è strettamente regolato dalla caduta della temperatura

Questo promotore è alla base dell'espressione nella serie di vettori pAL

Verso la metà della fase esponenziale,
si trasferisce la coltura da 37 °C a 25 °

la sintesi delle proteine cellulari scema e quella delle
cold-shock proteins aumenta in via transitoria



Oltre alle considerazioni economiche, la produzione a
temperature basse previene la formazione di aggregati

La produzione della proteina ricombinante inizia entro 30 min
dopo il calo di temperatura e può continuare per circa 5 ore

Sono stati costruiti diversi vettori di secrezione per *B. subtilis*, ma la scelta di plasmidi che combinino più caratteristiche resta limitata

pBSMuL1, pBSMuL2

replicone da **pUB110***
(plasmide naturale di stafilococco)

Dopo il promotore una sequenza artificiale
con RBS di *Bacillus*, SP lipA, MCS

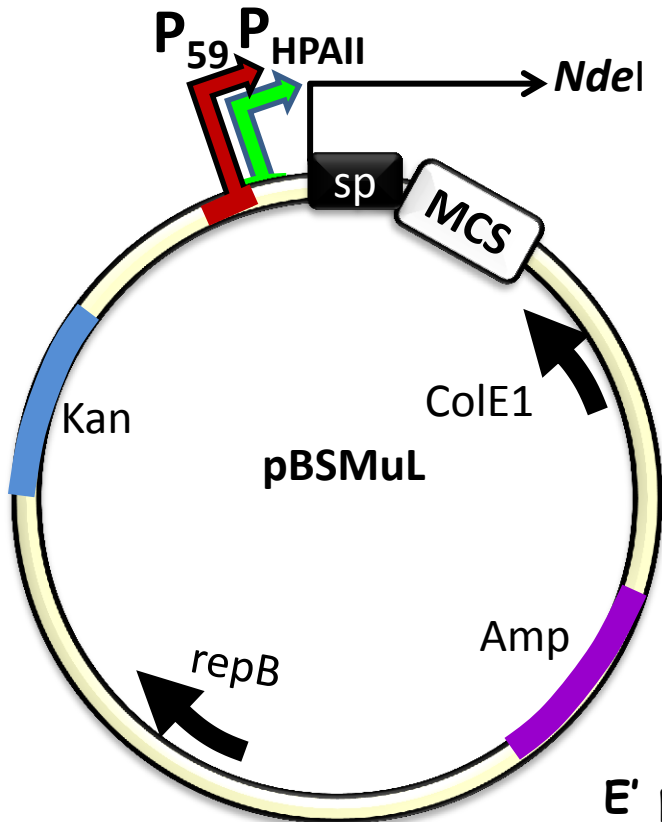
P59: costitutivo, da
Streptococcus cremoris

In pBSMuL2 ci sono due promotori in serie;
P59 e PHPA-II: costitutivo, derivato da
plasmide pUB110 di *S. aureus*

Questi plasmidi sono predisposti per
la fusione con un TAG di esa-istidine

E' possibile dirigere la proteina ricombinante al
citoplasma clonando nel sito *NdeI* a monte di SP-lipA

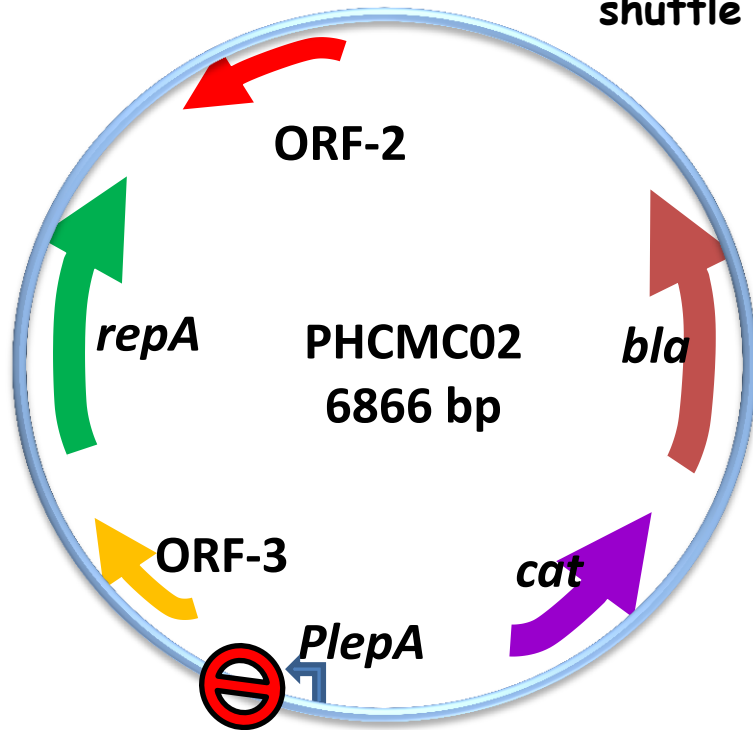
***uno dei plasmidi che si replica a cerchio rotante**



Serie PHCMC

I vettori basati su plasmidi che si replicano a cerchio rotante tendono a essere instabili

I vettori di espressione PHMC derivano da un vettore shuttle che si replica con forme theta e sono molto stabili



In tutti è presente un terminatore forte (*trpA*) a valle del sito di clonazione

Nei diversi tipi cambia il promotore

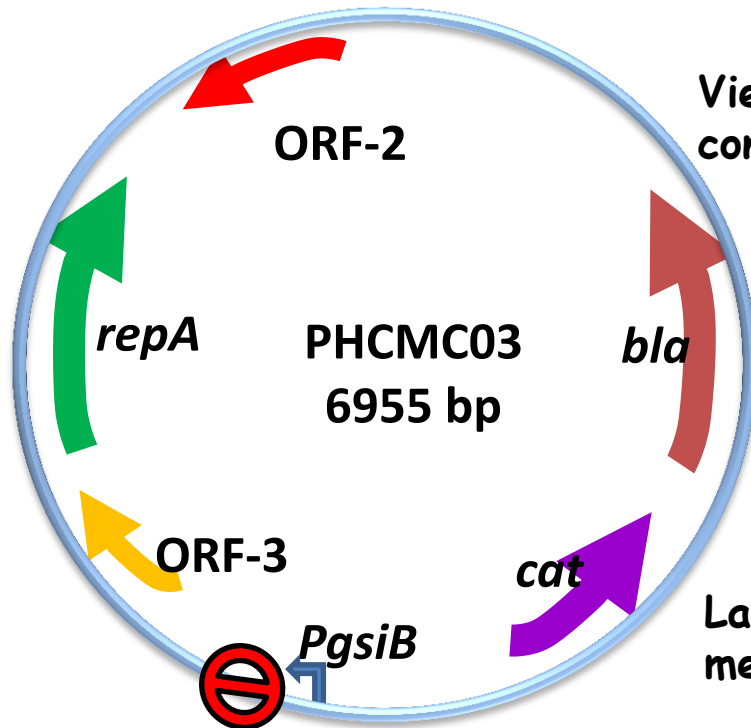
la produzione e le condizioni ottimali sono state stabilite clonando la β -galattosidasi nei vari vettori

PlepA (PHCMC02) è un promotore costitutivo debole

Adatto per produzioni a basso livello che non causino danni alla cellula batterica

**PgsiB (PHCMC03) è riconosciuto dalla
frazione σ_B della RNA polimerasi di *Bacillus***

**In condizioni fisiologiche σ_B viene prodotto in quantità
irrilevanti e l'espressione del gene eterologo è quasi nulla**



**Viene prodotto, trascrivendo quindi PgsiB, in
condizioni di stress da acido, da calore e da etanolo**

**L'RBS che segue il promotore di *gsiB* è
particolarmente forte, cruciale per la
stabilità del costrutto ed è stato impiegato
anche nella costruzione di altri vettori**

**La resa è ottima in condizioni di stress da acido;
meno a temperature elevate o in presenza di etanolo**

**Aumenta ancora in ceppi che iperesprimono σ_B ma in questo
caso diventa impossibile eliminare l'attività basale**

PHCMC03 è una buona scelta per produzioni in condizioni di pH subottimali

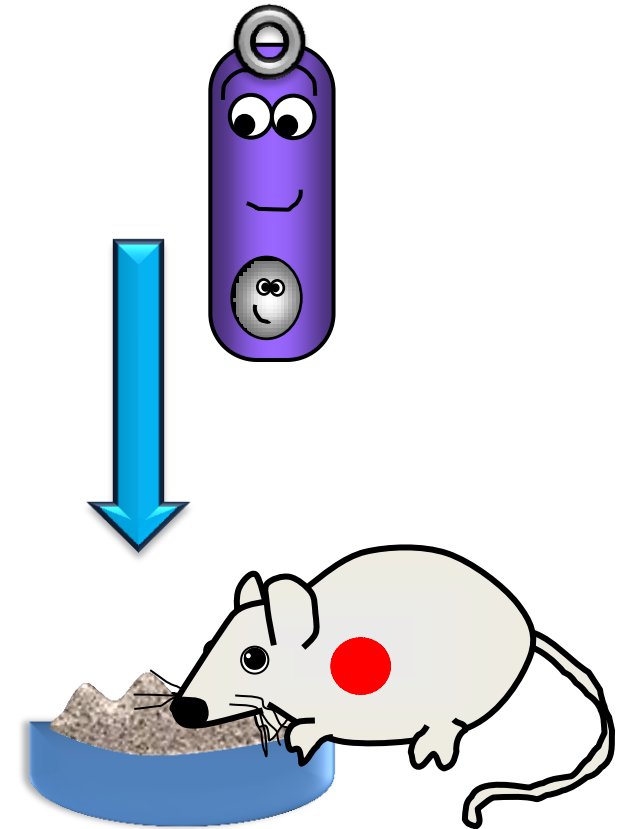
E offre prospettive di applicazione interessanti

Clonando antigeni in *B.subtilis*
sotto questo promotore

E aggiungendo i batteri
ricombinanti al mangime di topi

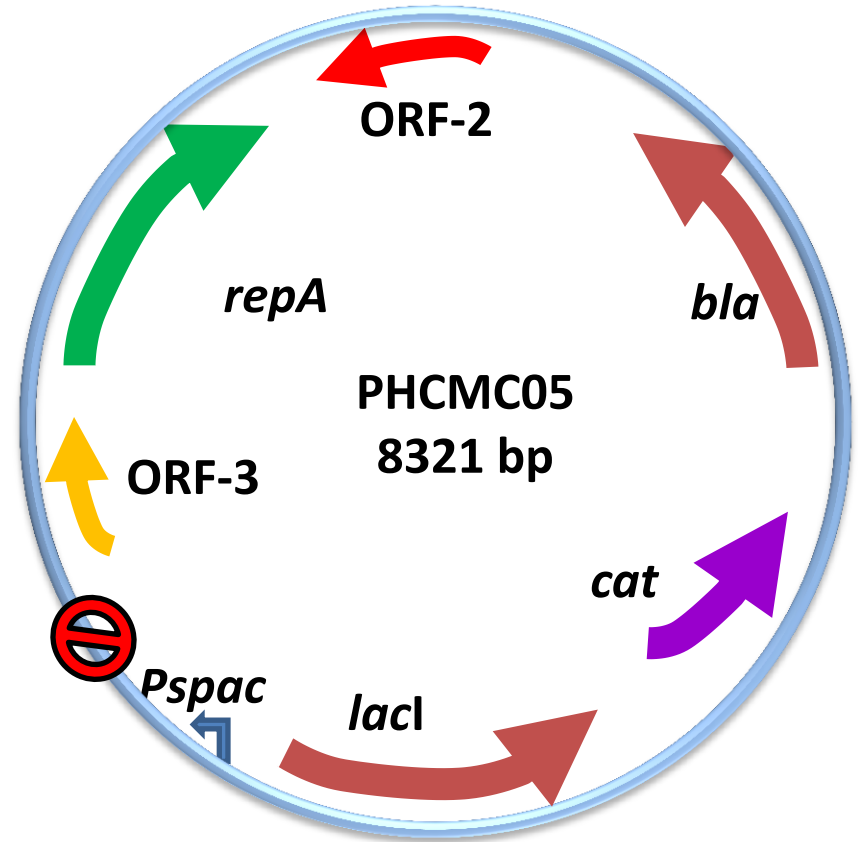
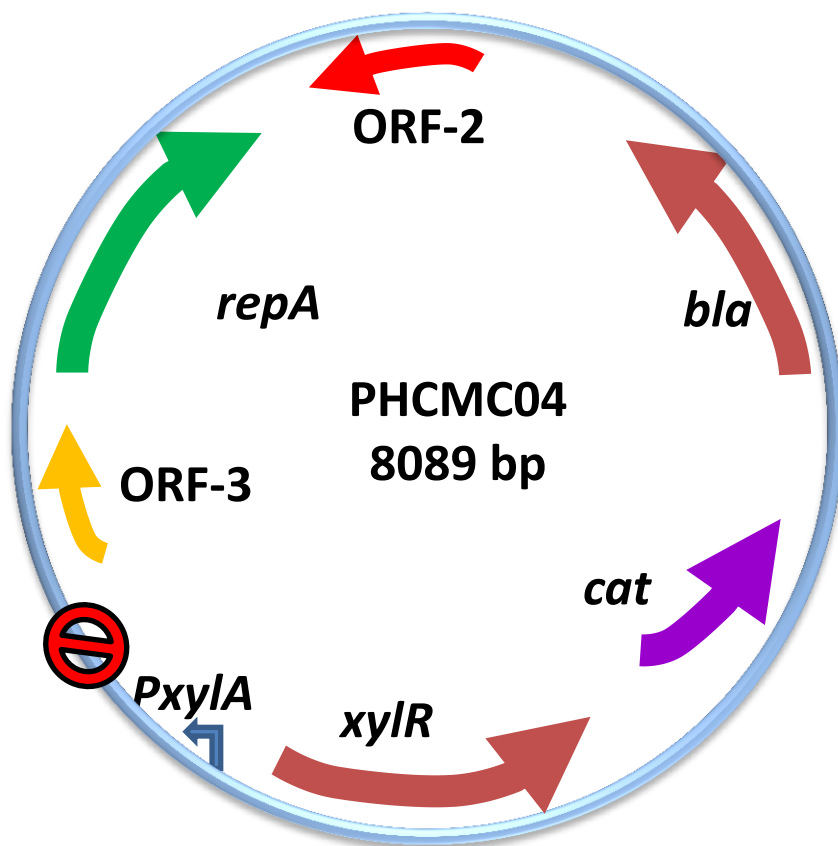
Gli animali hanno sviluppato un'immunità
attiva nei confronti degli antigeni stessi

Questo indica l'avvenuta induzione dopo l'esposizione
al pH acido dello stomaco e/o dell'intestino tenue



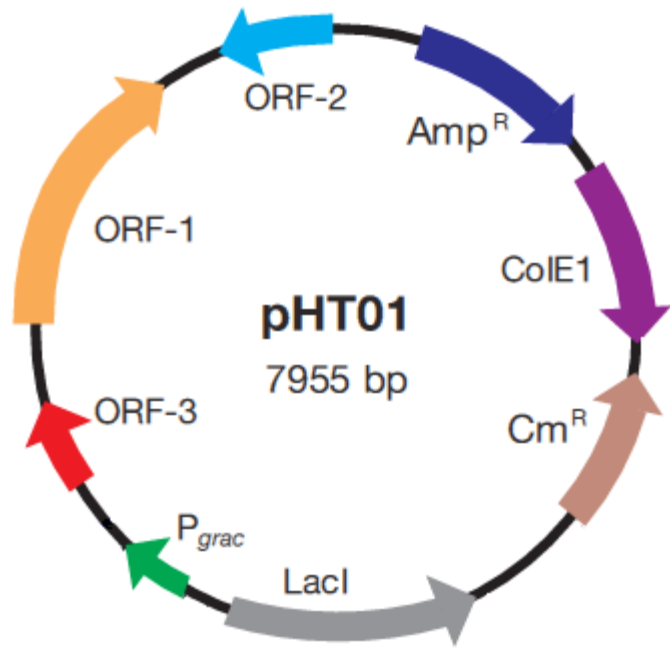
E apre la via a sperimentazioni nel
campo dei vaccini ricombinanti

P_{xyl} (PHCMC04) e P_{spac} (PHCMC05) sono inducibili
rispettivamente, da xilosio e IPTG



Su entrambi i vettori sono presenti anche i geni
dei rispettivi inibitori (*xylR* e *lacI*)

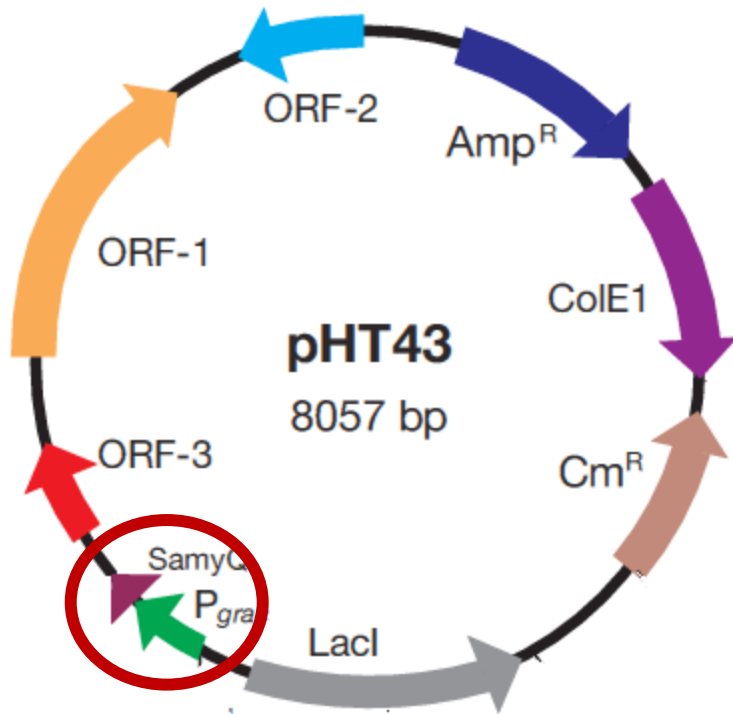
Questi plasmidi sono idonei a produzioni con attività basale bassa, svolte in
condizioni fisiologiche; l'IPTG non può essere usato in produzioni alimentari e
farmaceutiche: in questi casi va preferito il promotore *xyl*



La serie pHT porta il promotore P_{grac} ,
forte e inducibile

Vettori di espressione basati sul plasmide
shuttle pMTLBS72, particolarmente stabile

pHT01 permette la sintesi di
proteine eterologhe nel citoplasma



pHT43 include la sequenza segnale di AmyQ e
permette l'espressione verso il terreno

Altri plasmidi della stessa serie, derivati di pHT01,
sono predisposti per la fusione con diversi TAG

pHT08 (8X His TAG)

H H H H H H

Pgrac-lacO-SD-tgcgcggaagcCATCACCATCACCATCAC-BamHI-XbaI-SmaI

Purificazione con Nickel

pHT09 (Strep-TAG)

W S H P Q F E K

Pgrac-lacO-SD-atgaatTGGAGCCATCCGCAATTTGAAAA-BamHI-XbaI-SmaI

Purificazione con streptavidina ingegnerizzata (streptactina)

pHT10 (c-Myc-TAG)

Nter----E Q K L I S E E D L-----Cter

Pgrac-lacO-RBS-BamHI-XbaI-gtcgacgtcGAACAAAACTTATTAGCGAAGAAGATCTTaataacacgtc

Purificazione con anticorpi specifici

VETTORI INTEGRATIVI

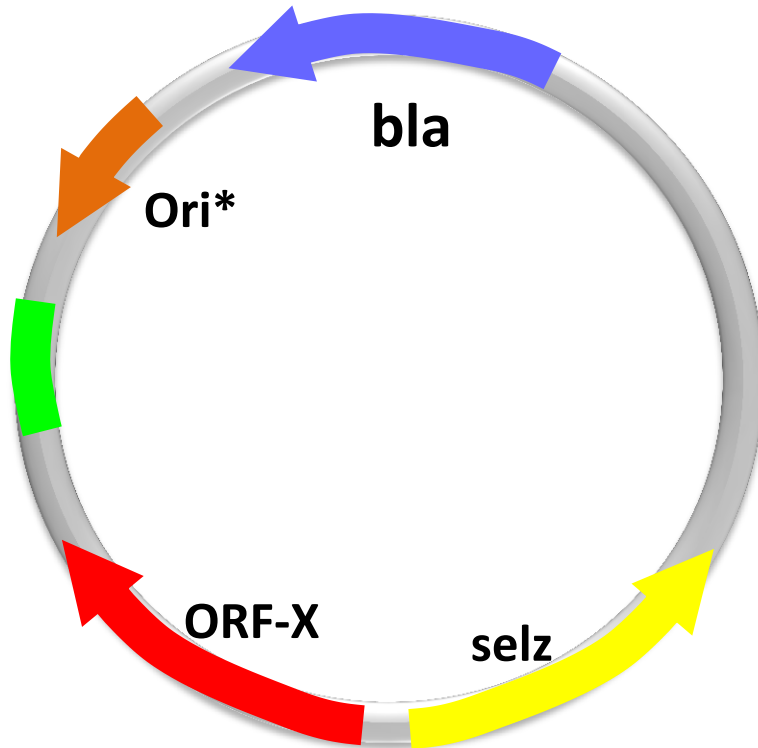
La clonazione di geni eterologhi, usualmente, impiega vettori e mantiene i geni eterologhi come elementi extracromosomiali

L'uso dell'integrazione come alternativa, poco frequente in *E. coli*, è desiderabile in *Bacillus*, una specie fortemente ricombinogenica

l'integrazione permette di ottenere l'espressione di geni in singola copia, più facilmente regolabili e sicuramente più stabili

Scegliendo oculatamente il sito di integrazione si ottengono ceppi perfettamente vitali e si dispone di un marcatore per verificare l'evento

I vettori di integrazione sono plasmidi con un replicone condizionale (ORI*) e un gene per la selezione



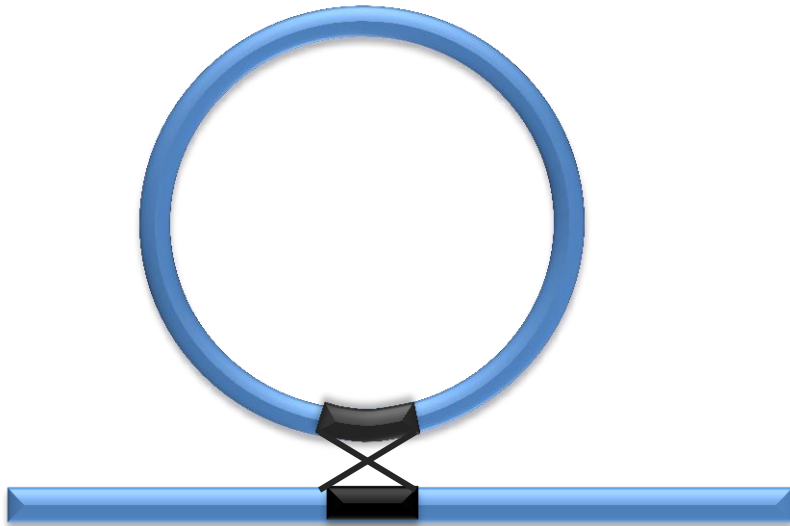
Nella maggior parte dei casi l'origine di replicazione del vettore è funzionale esclusivamente in *E. coli*

Ma in qualche caso sono impiegate origini termosensibili

Il gene per la selezione è in molti casi un determinante di antibiotico-resistenza, ma sono state proposte anche altre alternative

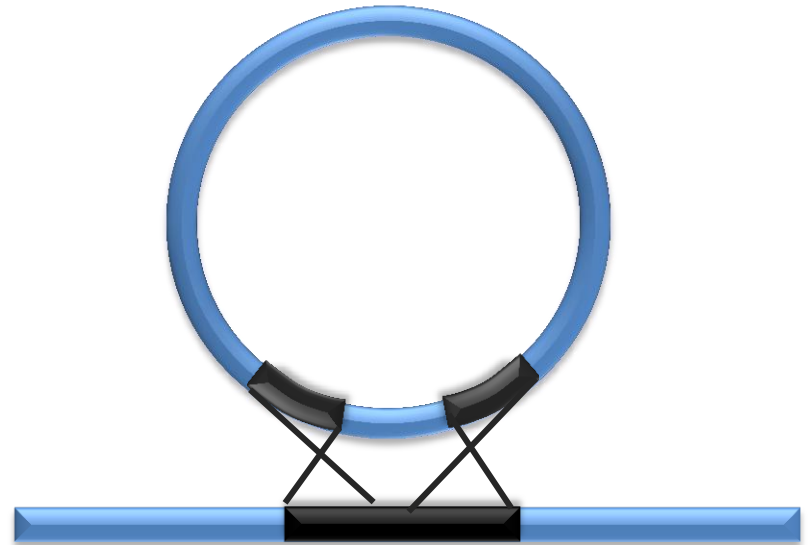
**Possono essere predisposti per
ottenere un'inserzione attraverso**

**Un singolo
Crossing-over**



**Integrazione con meccanismo
"Campbell-like"**

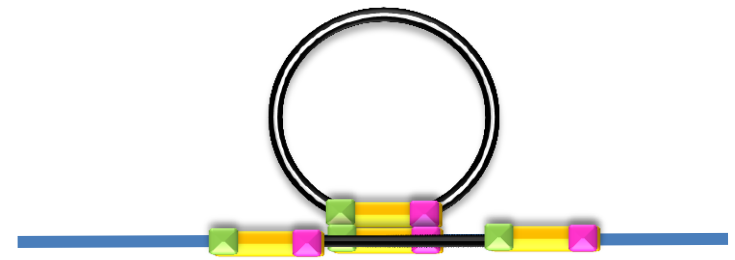
**Un doppio
Crossing-over**



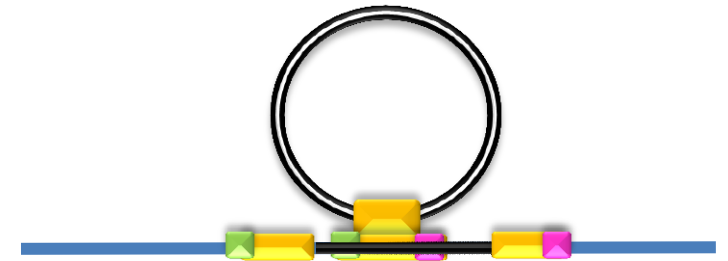
Integrazione "ectopica"

Singolo cross-over:

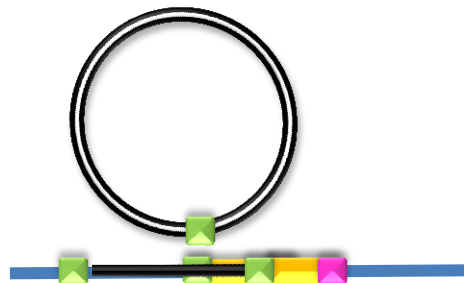
Se il gene è intero si duplicherà nel corso dell'integrazione



Per costruire mutanti inattivati, si clona nel vettore solo un frammento interno del gene



Usando solo un frammento (3' o 5') del gene bersaglio, si mantiene una copia intera + il frammento in questione

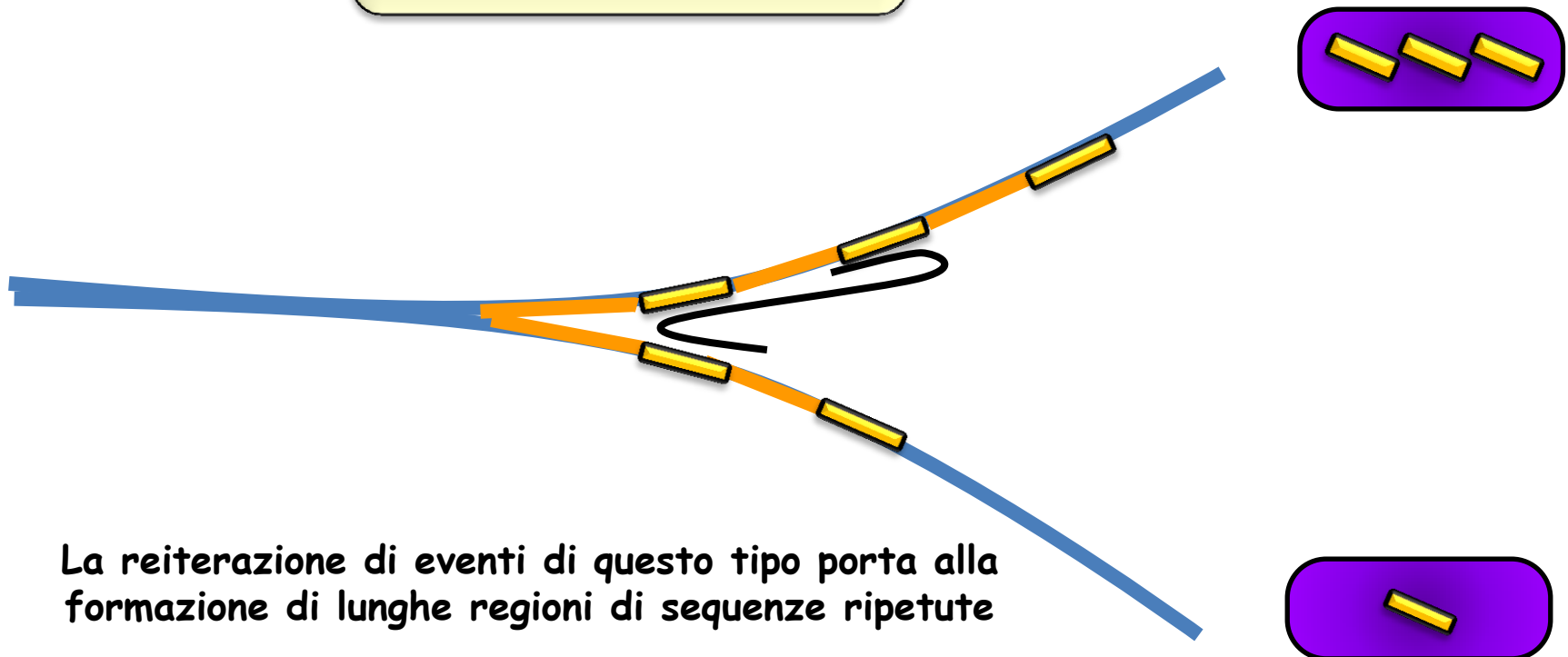


La creazione di repeat diretti ai lati del vettore inserito aumenta la frequenza di ricombinazione molecolare nel locus trattato

Una semplice ricombinazione tra i repeat porta all'escissione del plasmide

Ma possono verificarsi eventi che portano invece alla sua amplificazione e a una distribuzione delle copie ineguale tra le cellule figlie

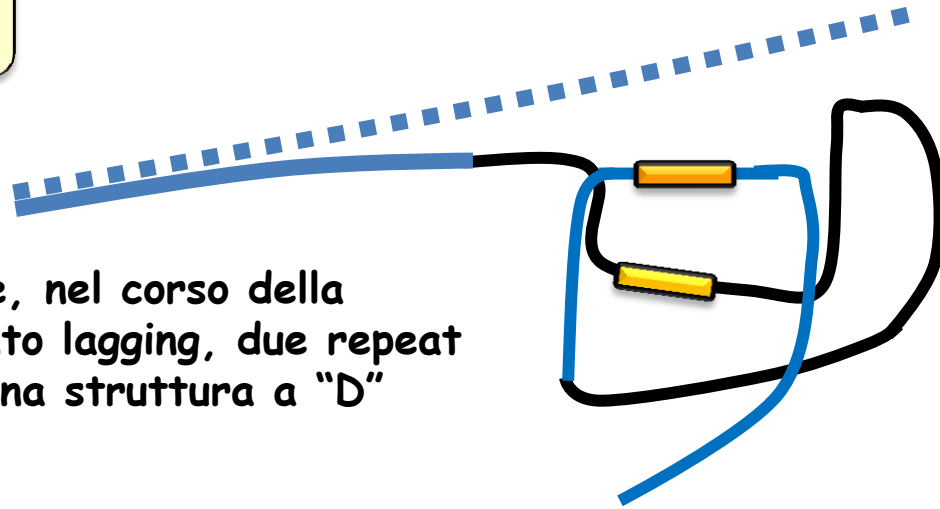
Amplificazione per
CROSSING-OVER
disuguale:



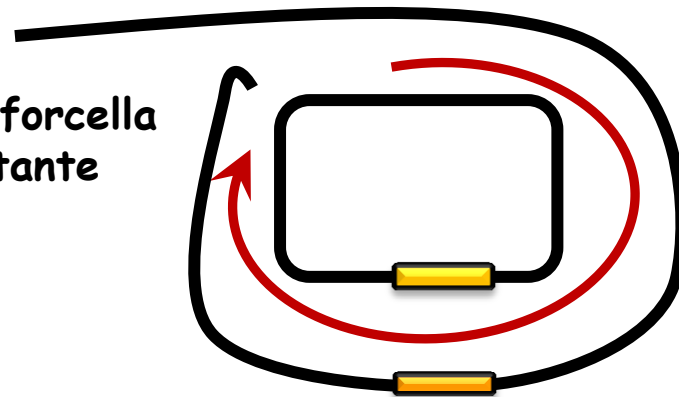
La reiterazione di eventi di questo tipo porta alla formazione di lunghe regioni di sequenze ripetute

Amplificazione per cerchio rotante

può anche accadere che, nel corso della duplicazione del filamento lagging, due repeat interagiscano creando una struttura a "D"



Questa struttura intrappola la forcella di replicazione in un cerchio rotante

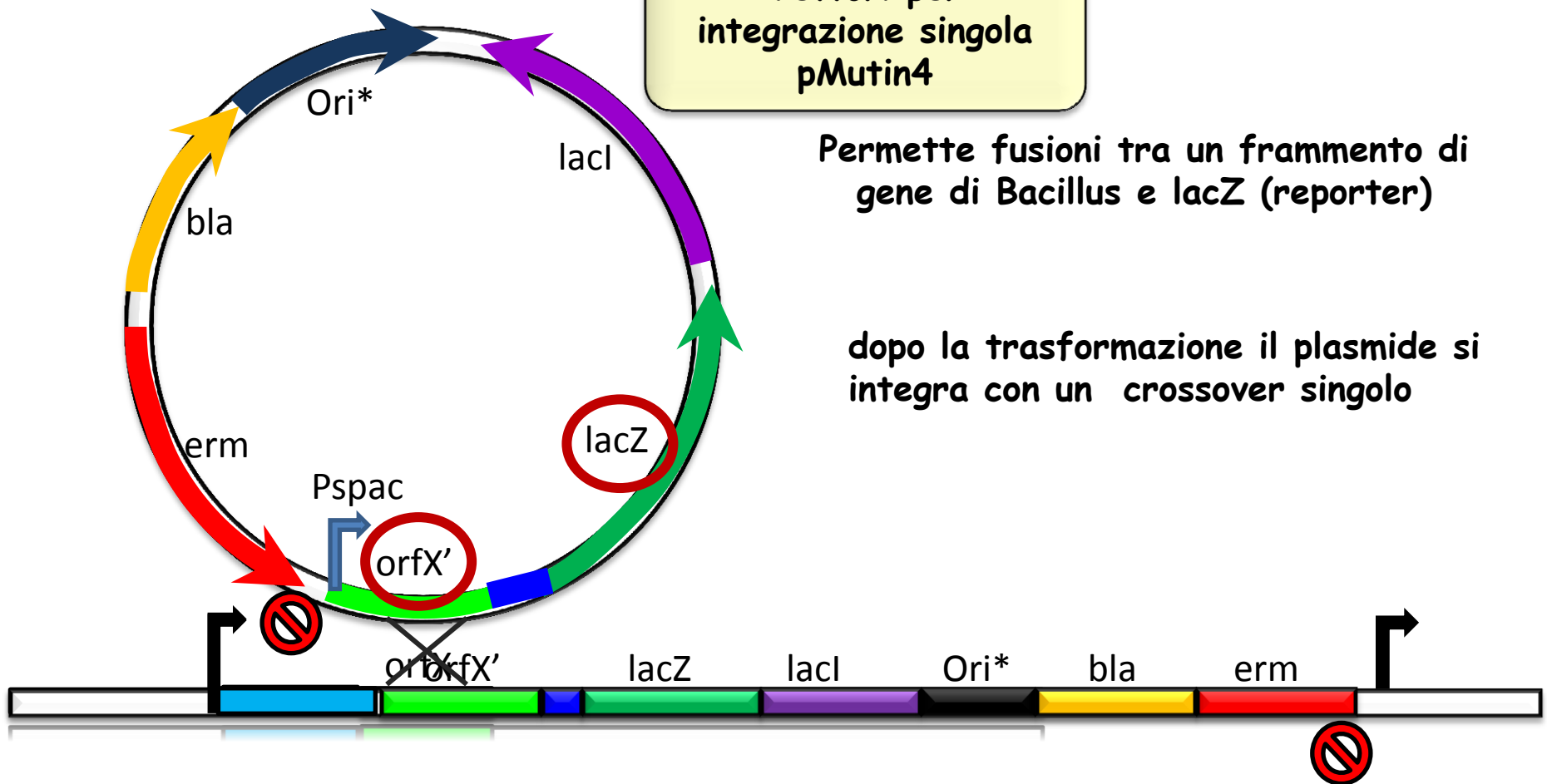


Il filamento amplificato può poi ricombinare con i repeat presenti e inserirsi stabilmente nel cromosoma

**Vettori per
integrazione singola
pMutin4**

Permette fusioni tra un frammento di
gene di *Bacillus* e lacZ (reporter)

dopo la trasformazione il plasmide si
integra con un crossover singolo

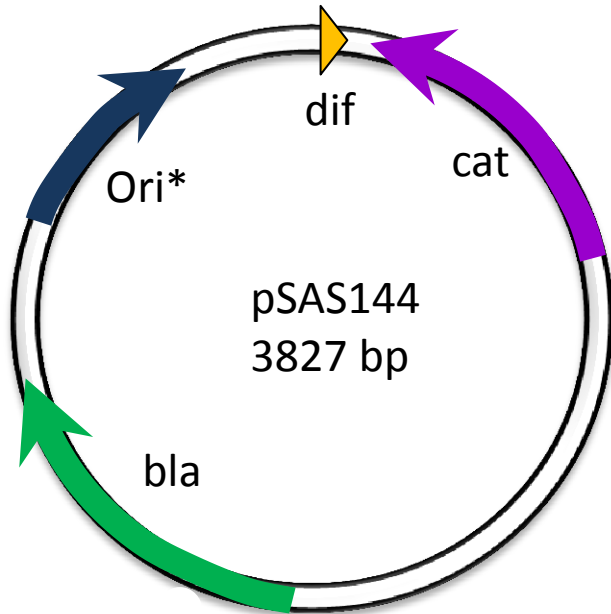


Il plasmide non si replica in *Bacillus*: il
fenotipo MLS^R indica un'integrazione

orfX si inattiva e lacZ è
reclutato dal suo promotore

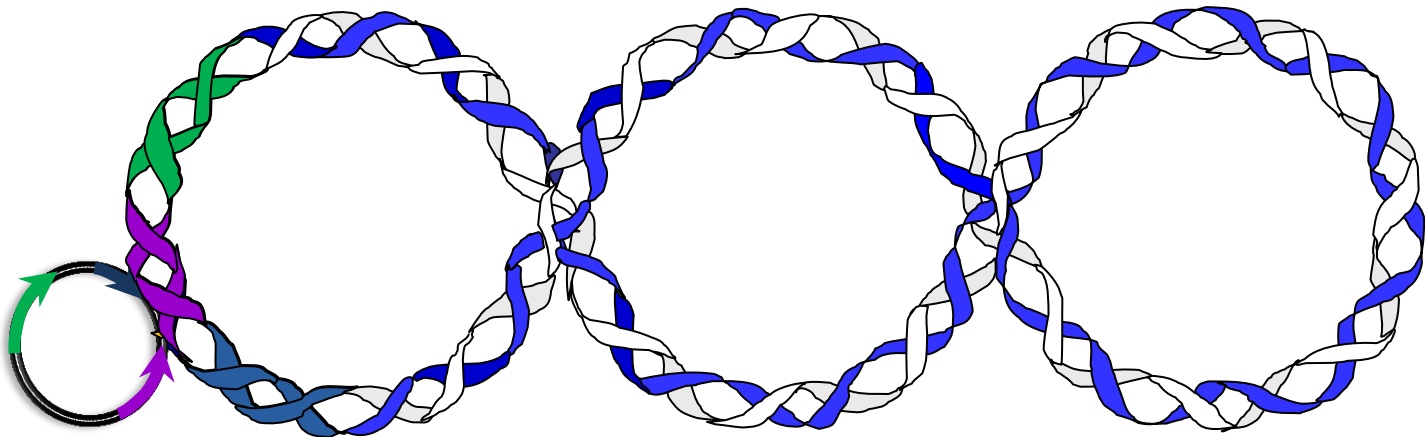
A valle di lacZ è situato un promotore che permette di inserire il plasmide
all'interno di un operone senza inattivare i geni a valle per effetto polare

Uso di dif per l'integrazione nel cromosoma (Sciochetti e Piggot, 2001)

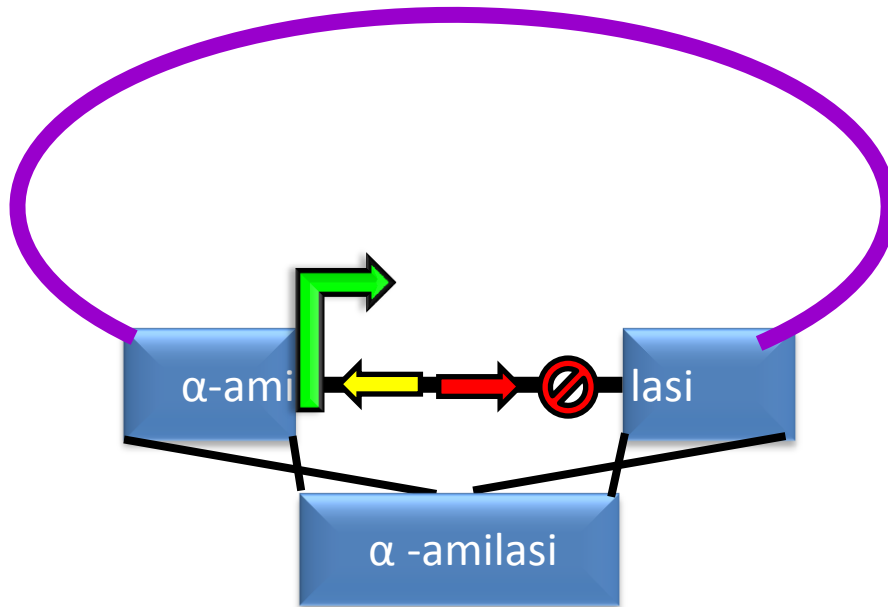


pSAS144 si integra in corrispondenza del sito dif sul cromosoma grazie a *ripX*+ *codV* (analoghi di *XerC*, *D* di *E. coli*)

Può essere usato anche con ceppi *recA*

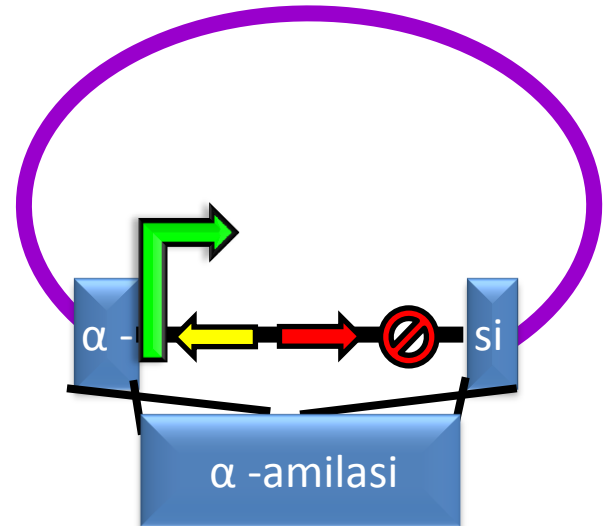


Vettori per integrazione ectopica



Tradizionalmente, i vettori di integrazione contengono due regioni di omologia che corrispondono all'intero gene bersaglio

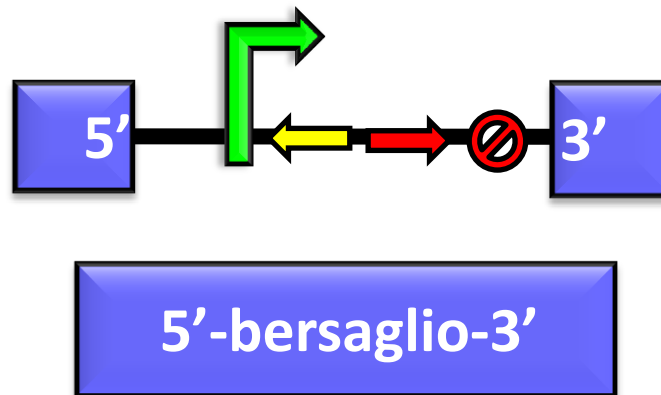
Ma le dimensioni minime richieste per una corretta integrazione, sono di circa 150 bp



I geni bersaglio proposti per l'integrazione ectopica sono diversi

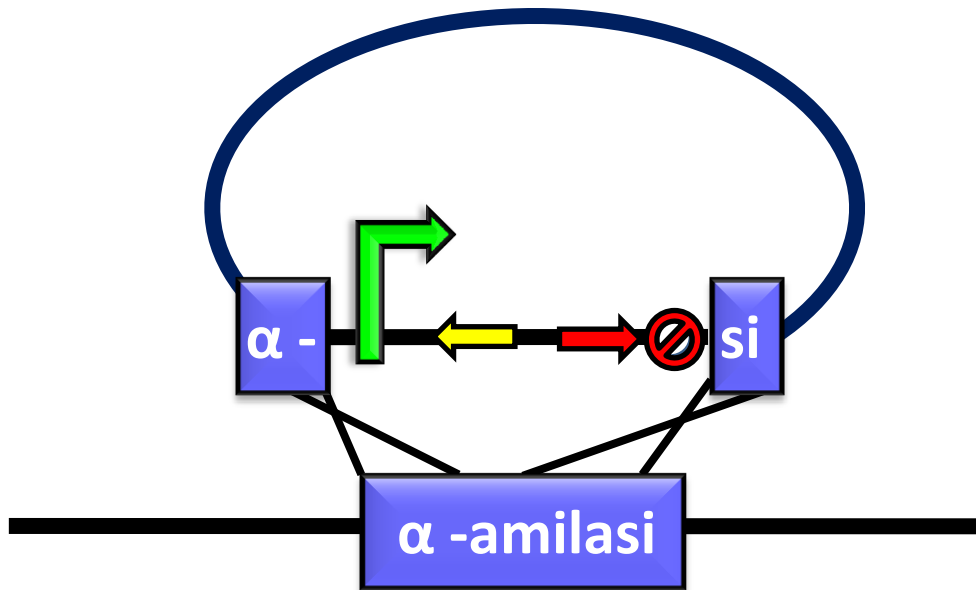
Nei vettori costruiti per un doppio cross-over

La cassetta di integrazione comprende due regioni di omologia con il sito bersaglio (che sarà inattivato)

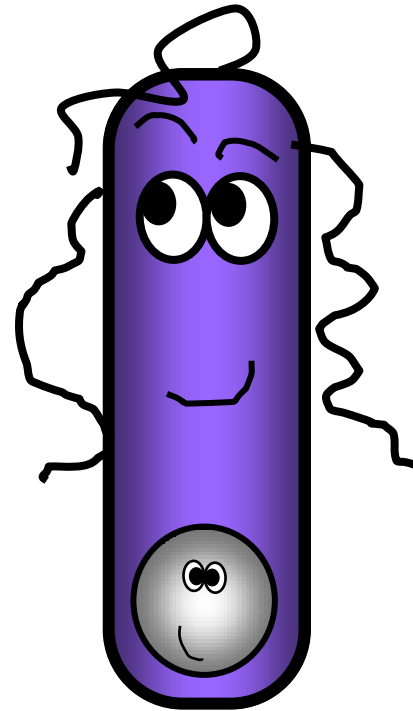


E, in mezzo a queste due regioni il gene per la selezione, quello da integrare e i rispettivi promotori e terminatori

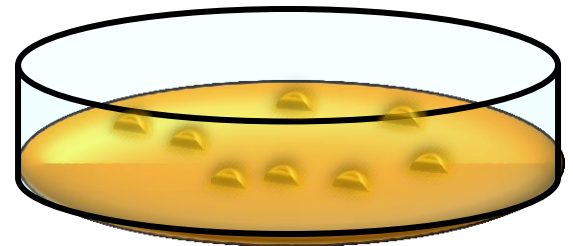
Il doppio crossing over introduce la cassetta di integrazione nel cromosoma



Le colonie resistenti all'antibiotico di scelta sono integranti e possono esprimere il gene eterologo



Il plasmide non si replica nel nuovo ospite

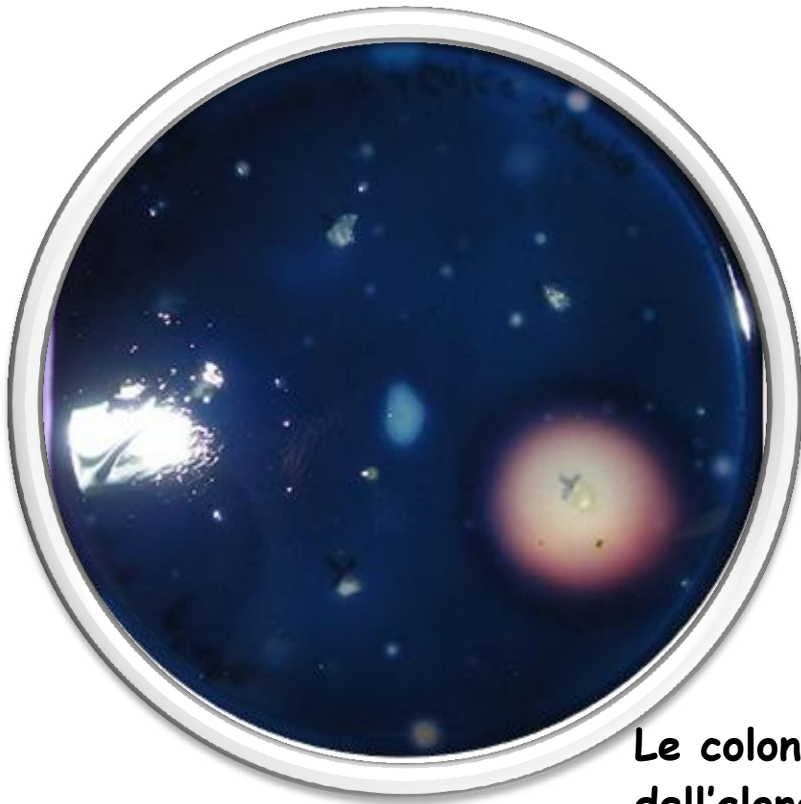


amyE - α -amilasi

Permette la rivelazione diretta dei trasformanti:

Che si coltivano su piastre
con amido per 18h circa

Le piastre si trattano poi per
qualche minuto con la soluzione
iodata della tecnica di Gram

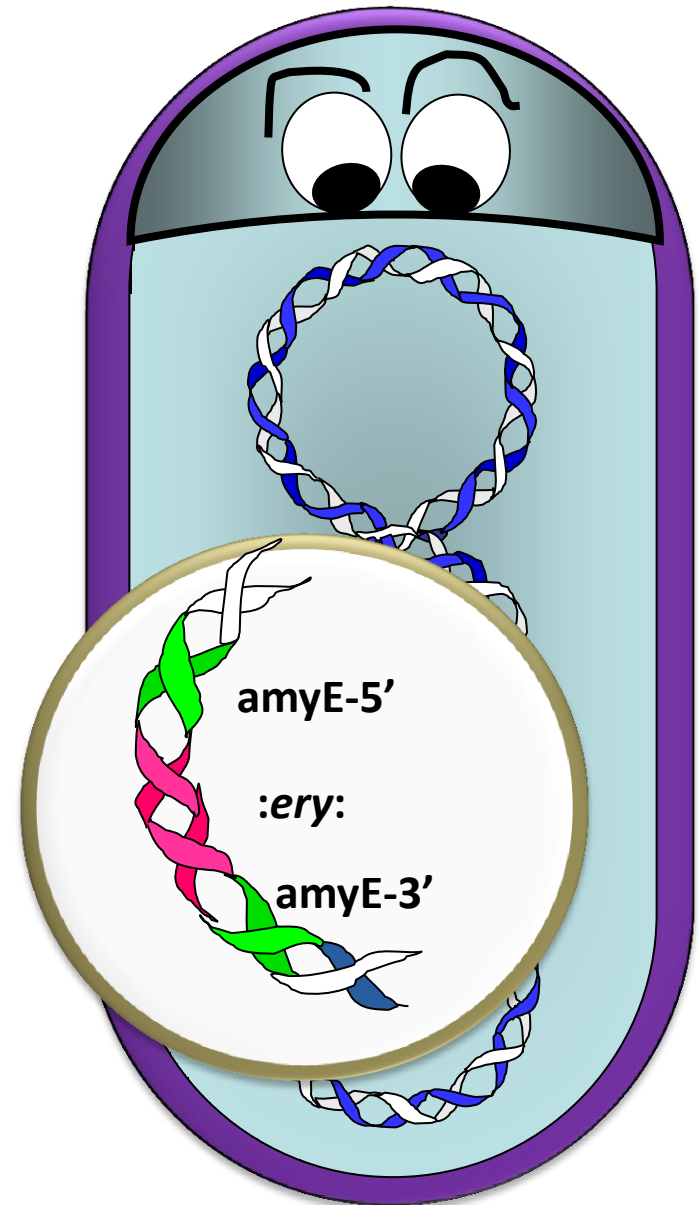


Le colonie che hanno perso l' α -amilasi sono prive
dell'alone chiaro tipico del fenotipo wild type

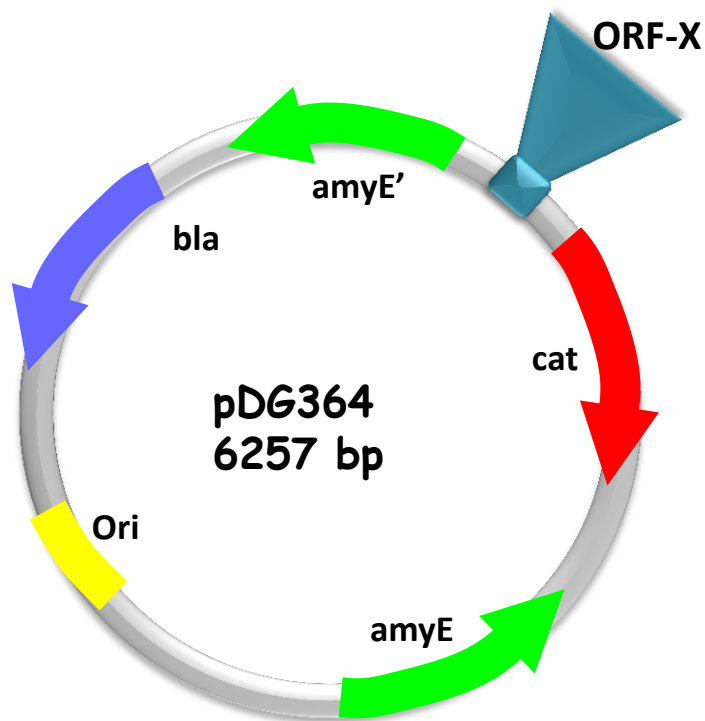
Per l'uso con alcuni vettori per integrazione ectopica è stato creato il ceppo 1A771

Inserendo la resistenza all'eritromicina all'interno del gene *amyE* (*amyE::ery*)

I trasformanti in cui è avvenuta una corretta integrazione ectopica nel locus *amyE* perdono il fenotipo *MLS^R*



**PDG364 Promuove l'integrazione ectopica del gene eterologo
con un doppio cross-over, all'interno del sito amyE**



**Cat: cloramfenicolo acetil-transferasi →
resistenza a CM, in *Bacillus* e in *E. coli***

**L'inserto eterologo viene clonato
all'interno del sito di clonazione multipla**

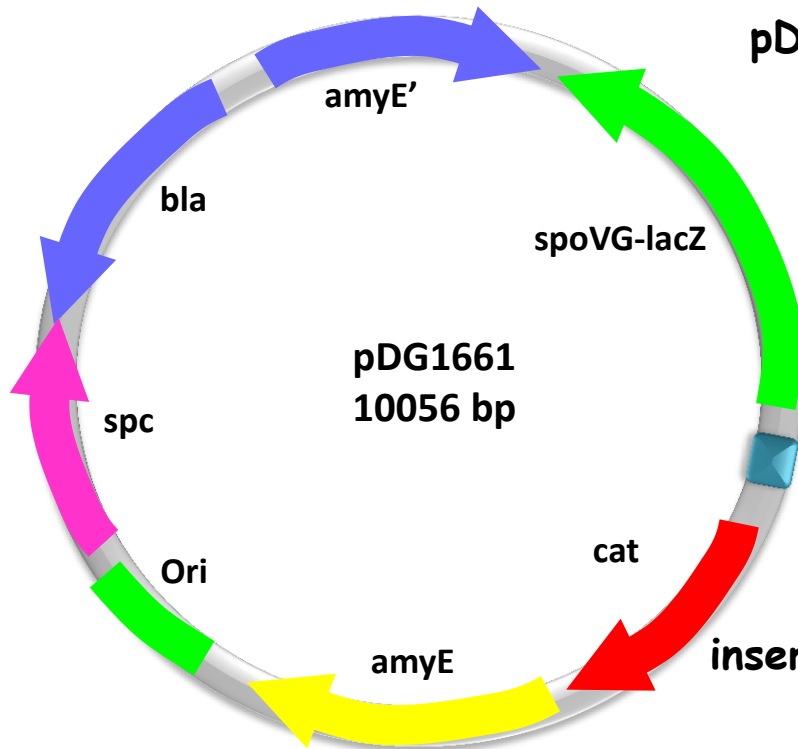
**Nel ceppo 1A771, l'inserto rimpiazza la cassetta di
resistenza MLS presente nel cromosoma**

**I trasformanti sono selezionati con il
cloramfenicolo e gli integranti perdono la
resistenza all'eritromicina (fenotipo MLS^S)**

**Se si clona in altri ceppi di *Bacillus* l'avvenuta integrazione va controllata con
la perdita dell'attività amilasica**

**pDG1661 permette di controllare rapidamente
il tipo di integrazione avvenuta**

**SpoVG-lacZ: sequenza di lacZ (e.coli)
fusa al RBS del gene spoVG di *B. subtilis***



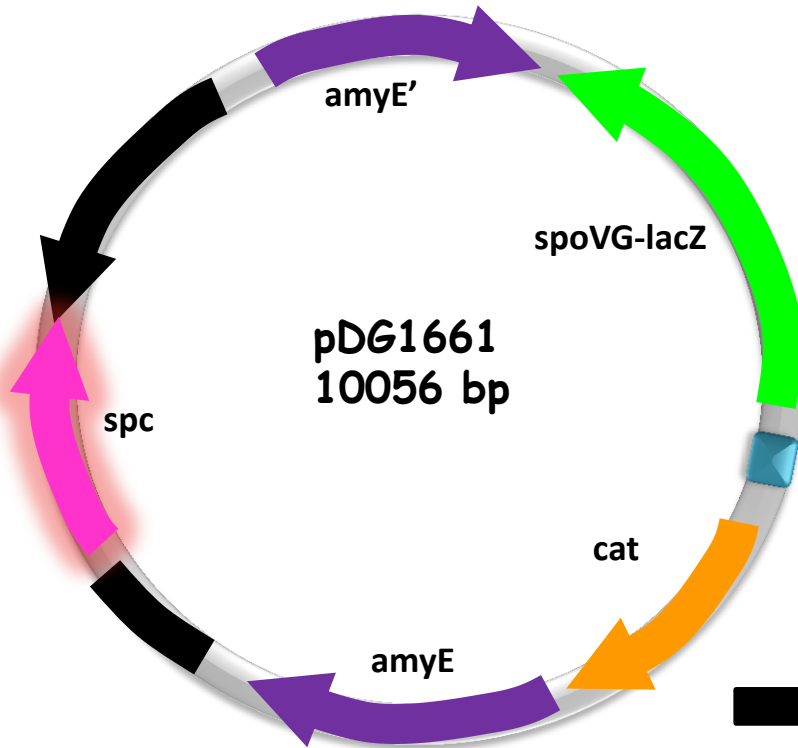
Il plasmide permette di

**inserire geni eterologhi
nel locus amyE**

**ottenere fusioni con il gene reporter lacZ, la
cui espressione si misura facilmente**

**Se il ceppo ospite è 1A771 l'avvenuta integrazione determina un fenotipo
MLS^S; gli altri ceppi si controllano con la perdita dell'attività amilasica**

Spc codifica la resistenza alla spectinomicina ed è inserito nella regione del plasmide che non si integra



L'assenza di resistenza alla spectinomicina negli integranti dimostra che l'integrazione è avvenuta correttamente con un doppio cross-over



doppio cross-over

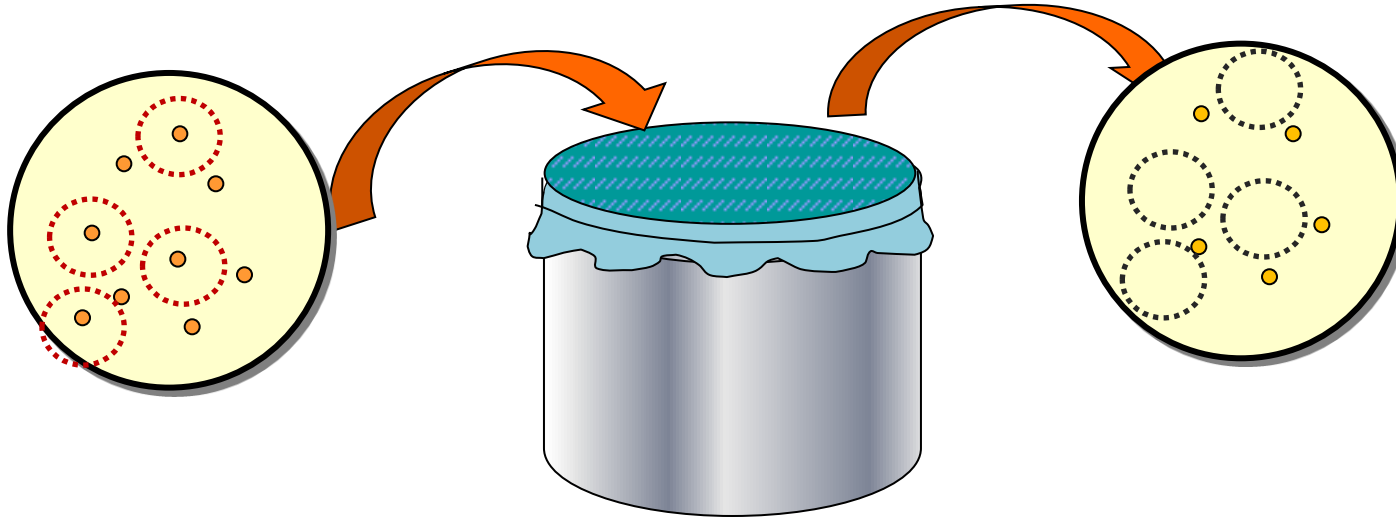


CAMPBELL-LIKE

E non in modo errato, con un'integrazione singola "Campbell-like" che porterebbe all'integrazione dell'intero plasmide e quindi anche del determinante *spc^R*

ALTRI LOCI BERSAGLIO: AUXOTROFIE E UTILIZZAZIONE DI FONTI DI CARBONIO

per identificare i trasformanti è necessario un replica plating



pyrD: diidroorotato-deidrogenasi

Gli integranti crescono solo in presenza di uracile (40 µg/ml)

gltA: glutamato sintasi

Gli integranti crescono in presenza di glutamato (500 µg/ml)

thrC - treonina-sintasi

Gli integranti crescono solo in presenza di treonina (40 µg/ml)

sacA - sucralasi

Gli integranti crescono se la fonte di carbonio è glucosio ma non se è saccarosio

L'integrazione di una cassetta di espressione lascia sul cromosoma il determinante di antibiotico resistenza usato per la selezione

Per eliminare questo inconveniente sono state proposte alcune strategie che permettono di eliminare la resistenza dal cromosoma, come l'uso della cassetta "blaI"



La cassetta può essere diretta sul bersaglio con sequenze omologhe, come già descritto e comprendere un gene eterologo all'esterno dei DR

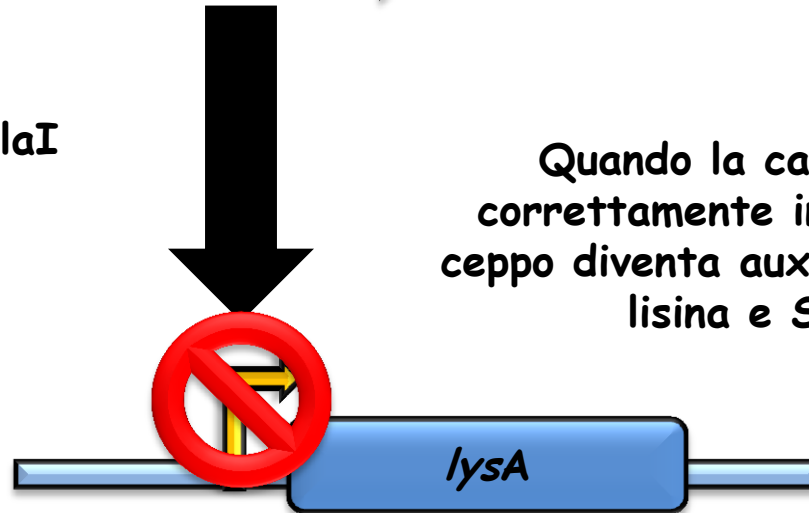
L'uso della cassetta BlaI prevede un ceppo ingegnerizzato, BS1541, in cui è stata creata un'auxotrofia condizionale per Lys

In BS1541 il promotore del gene *lysA* (biosintesi della lisina) è stato sostituito con il promotore *PblaP* (lattamasi di *B. licheniformis*)

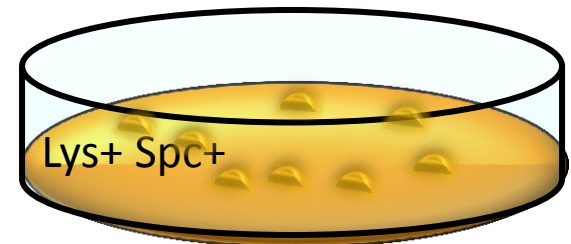


PblaP è represso da *BlaI*

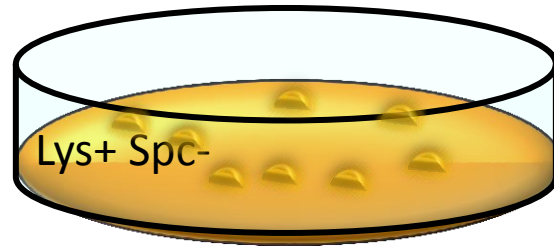
Quando la cassetta è correttamente integrata, il ceppo diventa auxotrofo per la lisina e *SpcR*



Gli integranti possono essere individuati su terreno + Lisina + spectinomomicina



Coltivando in terreno con lisina ma senza antibiotico

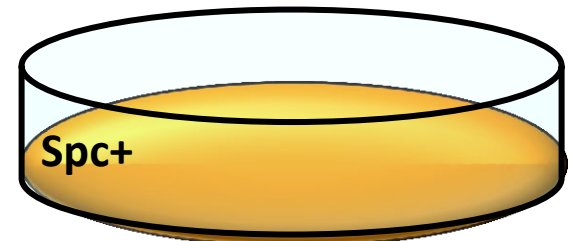
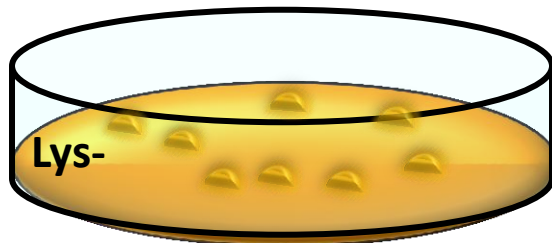


un singolo cross-over spontaneo tra i due DR può facilmente provocare l'escissione della cassetta

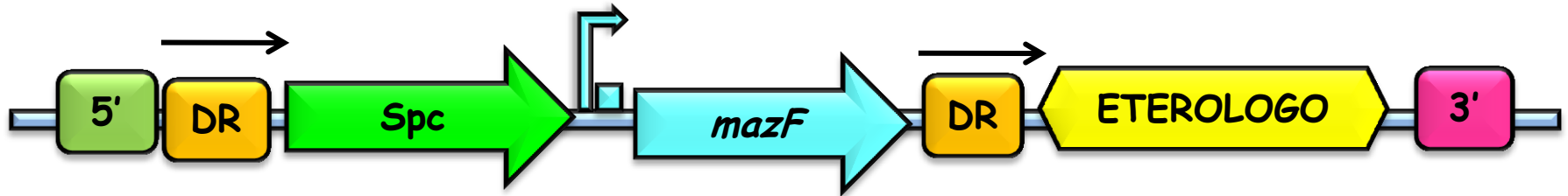


Lasciando sul cromosoma il solo gene eterologo

I ceppi che perdono la cassetta sono facilmente individuati seminando su terreno privo di lisina e controllando poi il fenotipo SpcS



Una strategia analoga, ma per cui non è necessario disporre di un ceppo particolare, si avvale della cassetta MazF



MazF è una potente tossina di *E. coli* e, nella cassetta, il gene che la codifica è stato posto sotto il controllo di Pspac, inducibile con IPTG

Quando la cassetta è integrata, le cellule hanno un fenotipo IPTG^S (uccise dall'induzione con IPTG) - SpcR

Ma quando la cassetta è persa per un evento di ricombinazione tra i DR, le cellule possono crescere anche in terreni con IPTG e possono essere poi controllate per verificare il fenotipo SpcS

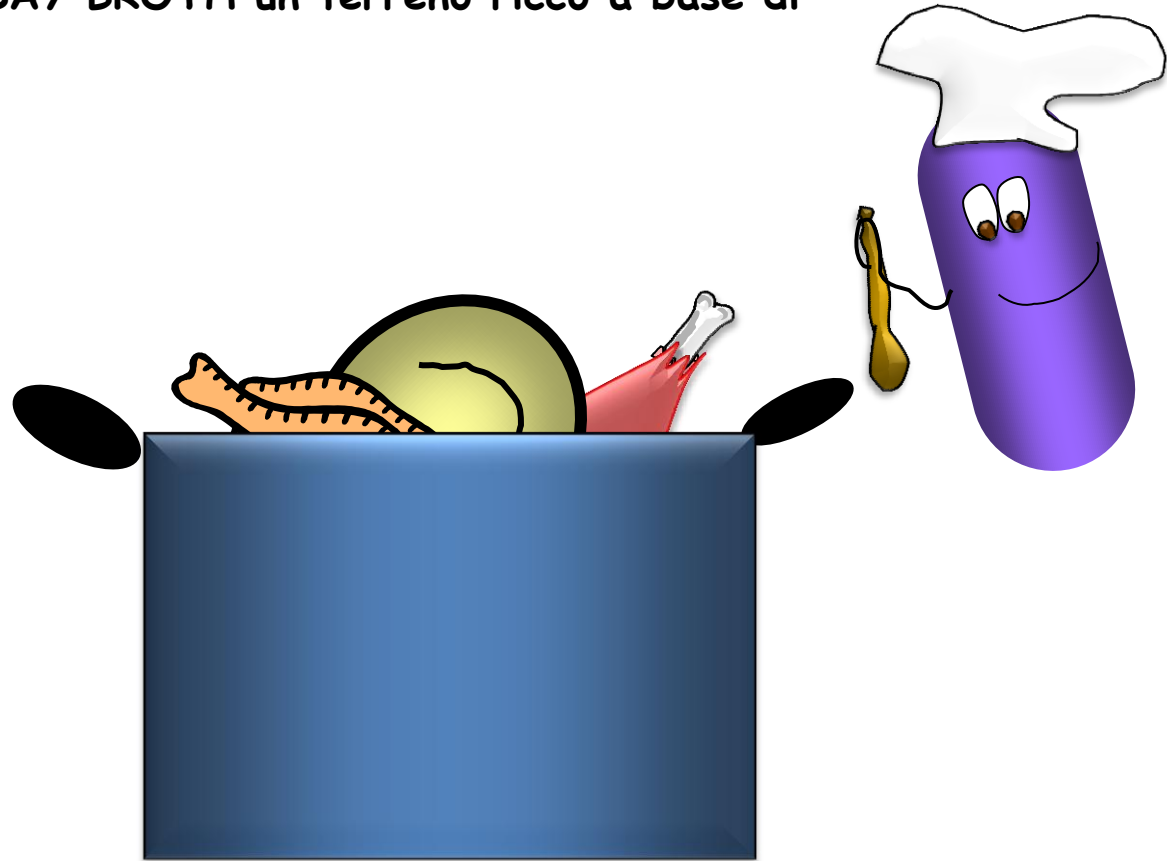
Il terreno più usato per coltivare *Bacillus* è il PENASSAY BROTH un terreno ricco a base di

peptone

estratto
di lievito

estratto
di carne

sali



Originariamente destinato a saggiare
l'attività degli antibiotici β -lattamasici

Ma particolarmente adatto per
coltivare *B. subtilis* e altre *Bacillaceae*

Per cui si possono comunque usare LB,
TSA o altri terreni già descritti

Altri terreni e soluzioni saline sono richiesti per preparare le cellule alla trasformazione

Alla base di questi terreni ci sono soluzioni di sali

Soluzione P

0,25M MgSO₄, 0,05M CaCl₂ μ M MnSO₄

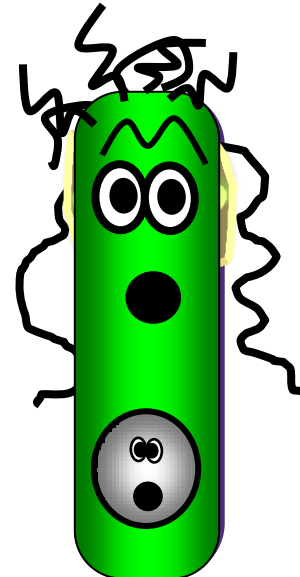
Sali di Spizizen (5x)

1% w/v NH₄SO₄; 10% tampone fosfato,
0.5% citrato trisodico; 0.1% MgSO₄

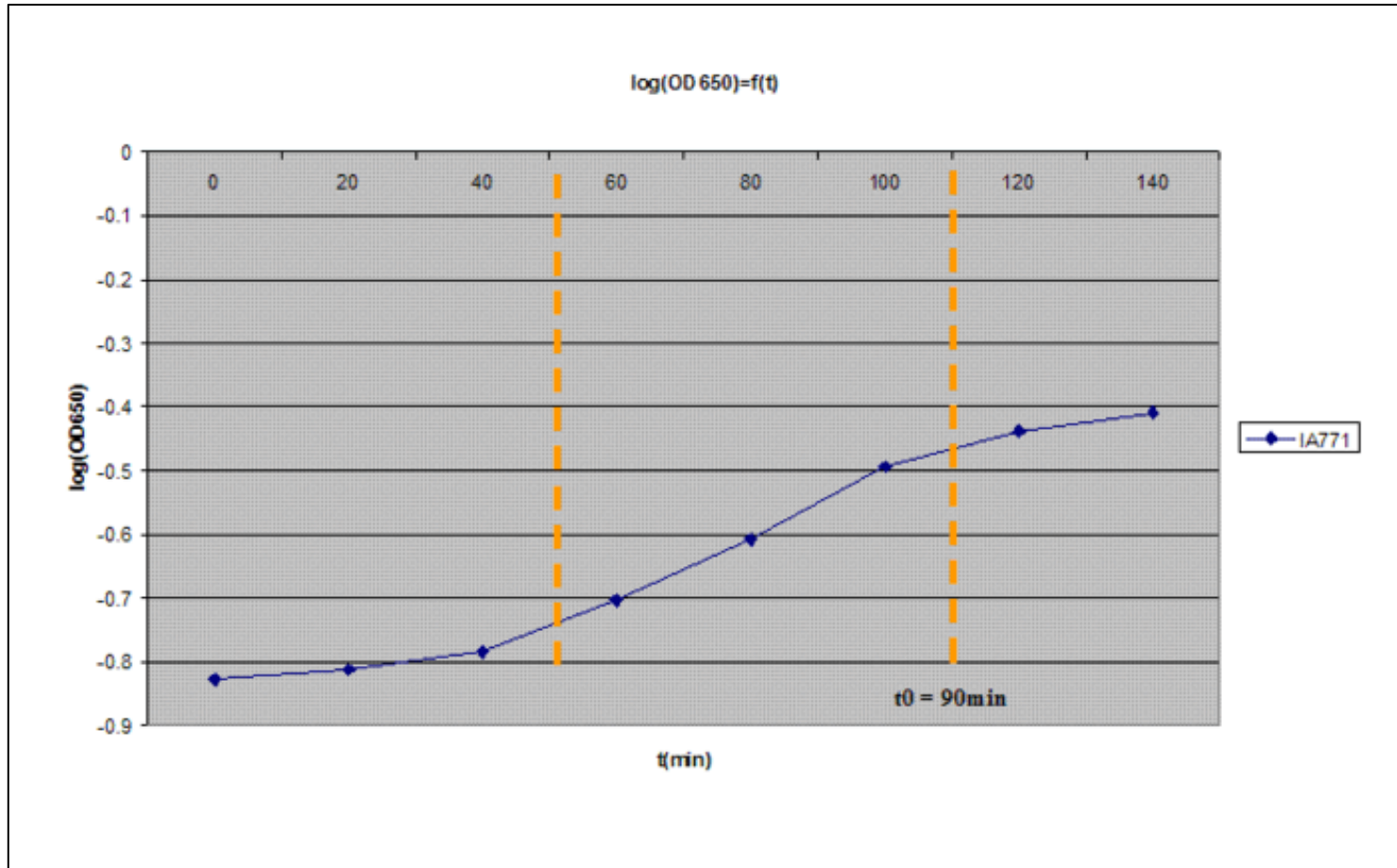
PTM (Pre-transformation Medium)
usato per indurre la piena competenza:
Spizizen's 1x, glucosio 1%, mix di aa
0,4%; indolo o triptofano 11 mg/ml)

TM (Transformation Medium)
usato per la trasformazione:
simile al precedente ma senza
soluzione P e quantità diverse di
glucosio (0,6%) e mix di aa (0,01%)

**Indolo o triptofano servono per i ceppi
auxotrofi (la maggior parte di quelli usati
in laboratorio, derivati da Bsub168)**



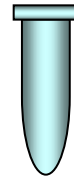
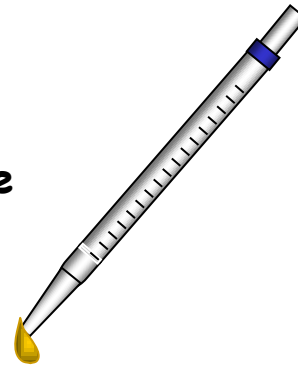
Bacillus subtilis è naturalmente competente; per poterlo trasformare con successo è sufficiente coltivarlo nelle condizioni ottimali, senza necessità di ulteriori trattamenti



Si coltiva in PTM e in aerazione fino a ($A_{600} \approx 1,7 - 3$)

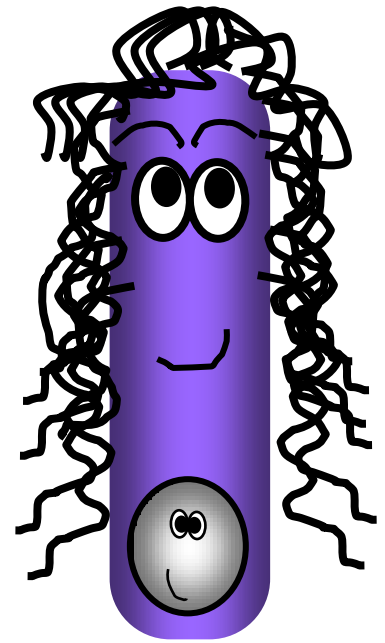
si controlla al microscopio: le cellule
competenti sono molto mobili

Si diluisce la coltura (1ml+1ml per ciascuna
trasformazione) in TM con circa 0,5 μ g di
DNA plasmidico in non più di 5 μ L di volume



+1 ml
TM

Si lascia crescere per 30-90' a 37 °C e in agitazione
e poi si piastra sull'antibiotico di selezione



Bacillus megaterium

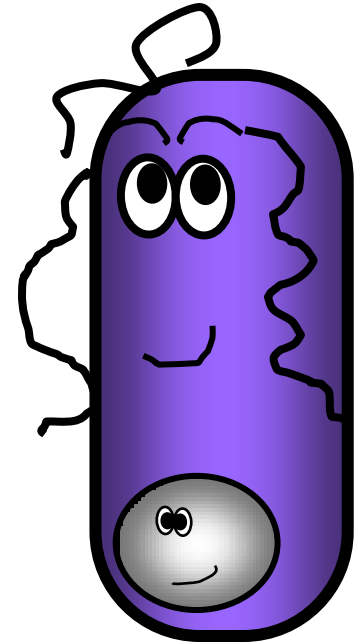
La specie di *Bacillus* con la cellula di maggiori dimensioni

Molto versatile metabolicamente, è stato trovato in reflui da industrie di carne come da effluenti di industrie petrolchimiche

Degrada insetticidi persistenti ed è potenzialmente utile per processi di bioriparazione

Usato per la produzione industriale di molti enzimi particolari, tra cui amilasi e le penicillino-amidasi impiegati per costruire antibiotici semisintetici

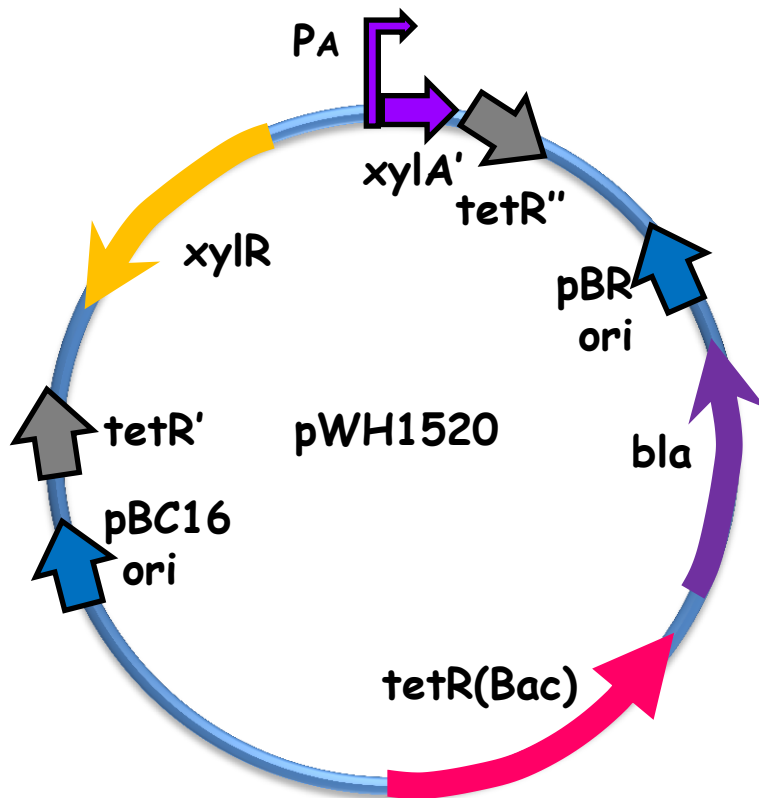
L'operone dello xilosio, strettamente regolato, è alla base dei sistemi di espressione impiegati per questo microrganismo



Come ospite per l'espressione eterologa *B. megaterium*

Ha il vantaggio di mancare delle proteasi alcaline

I vettori di espressione si basano sul promotore
dell'operone dello xilosio, forte e strettamente regolabile



dal primo vettore pWH1520
con siti di restrizione nel frammento di *xylA*

Sono stati ottenuti derivati per
l'espressione citoplasmatica o esterna

Predisposti con Tag per la purificazione
(6xHis o Strep o entrambi)

E per la rimozione del Tag con sito di taglio
per la proteasi TEV o per il fattore Xa

pSTOP1622



His-TAG

TEV

pC-His1622



Xa

strep-TAG

pHisTEV1622



PxylA

pN-Strept-TEV1622



pN-Strept-Xa-1622



pC-Strep1622



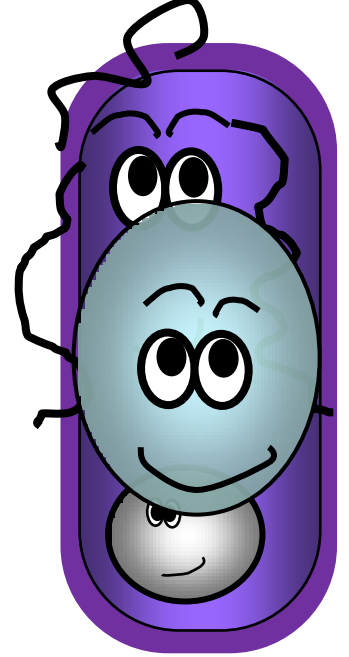
Diversamente da *B. subtilis*, *B. megaterium* non è naturalmente competente

per ottenere l'ingresso del plasmide nella cellula è necessario allestire i protoplasti

Con il termine protoplasto si intende una cellula batterica da cui sia stata rimossa la parete mediante trattamenti enzimatici

La cellula assume una morfologia sferica ed è fragile in ambienti ipotonici perché resta delimitata dalla sola membrana citoplasmatica

La definizione si applica alle sole cellule dei batteri Gram-positivi



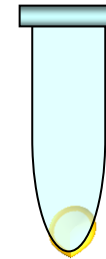
per preparare i protoplasti deve essere eliminata la parete per mezzo di enzimi litici, in presenza di stabilizzatori osmotici

si coltiva a 37 °C in Penassay
Broth fino ad $A_{575} = 0,7-1$



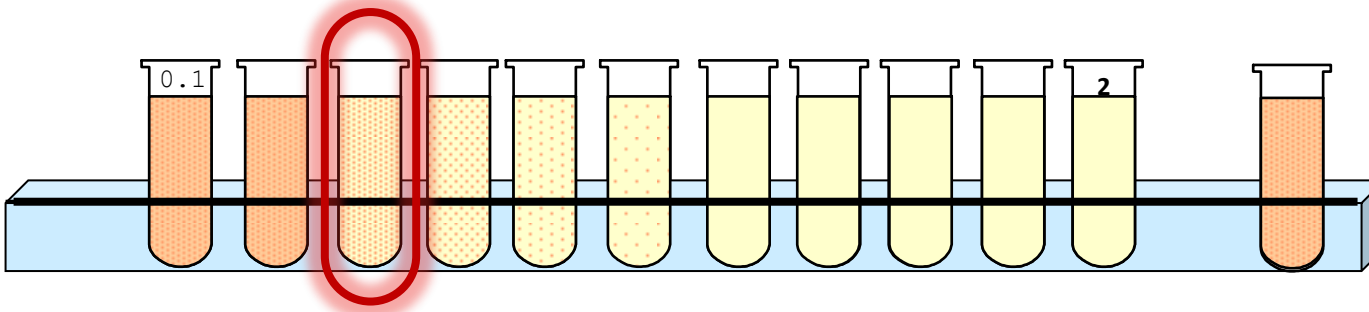
Si raccoglie per centrifugazione e si sospende in
1/10 di volume di tampone osmoticamente controllato

Protoplast-Maintenance Buffer-PMB:
(saccarosio 0,5M + sali di K^+ e Mg^{++})



si lascia in agitazione gentile, con
lisozima sterile, a 37 °C per due ore

Questa fase può essere resa più efficiente coltivando
con concentrazioni sub-inibenti di glicina, tra 0,1 - 2%



la concentrazione di glicina che dimezza l'assorbanza
rispetto al controllo è quella da impiegare

Si raccolgono i protoplasti per centrifugazione e si lavano per tre
volte con 5 ml di PMB fresco per eliminare completamente il LZM

I protoplasti lavati si
sospendono in due ml di PMB

i protoplasti si trasformano con un protocollo che prevede l'uso di PEG6000 (polietilenglicole con massa media delle molecole ~ 6000 Da) e tamponi e terreni dedicati

SMMP: Penassay broth reso 500 mM in saccarosio e 20 mM in maleato di sodio e cloruro di magnesio

PEG-P: Peg6000 40% in SMMP

CR5-TOP AGAR: si ottiene combinando le componenti A e B dopo la sterilizzazione e aggiungendo la soluzione "C" quando il terreno è a 50 °C:

A)

51.5 g saccarosio
3.25 g MOPS
0.33 g NaOH
acqua 250 ml
Aggiustare il pH a 7.3
Sterilizzare per filtrazione

B)

2 g agar
0,1 g casamino acids
5 g Estratto di lievito
Acqua 142,5 ml
Autoclavare in bottiglie da 500 ml
con una ancoretta magnetica

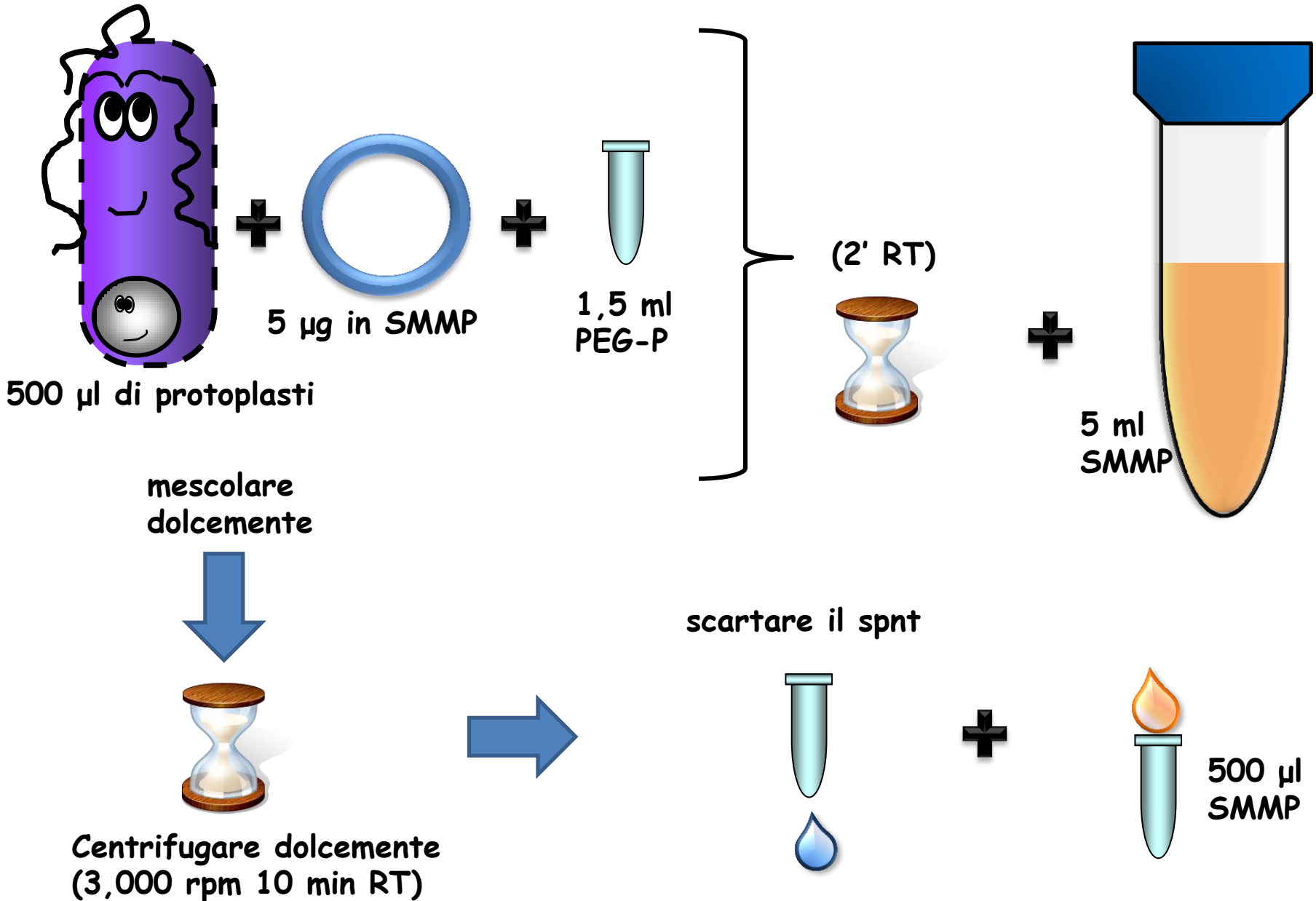
C)

57.5 ml di Sali 8x *
25 ml prolina 12 % sterile
25 ml glucosio 20 % sterile

***CR5-Sali 8x stock:**

1,25 g K₂SO₄
50 g MgCl₂ x 6 H₂O
0,25 g KH₂PO₄
11 g CaCl₂ x 2 H₂O
625 ml H₂O

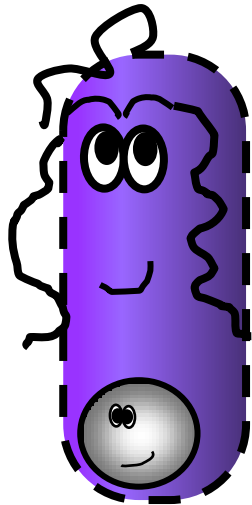
Tamponi e Peg6000 servono anche per trasformare i protoplasti con i plasmidi



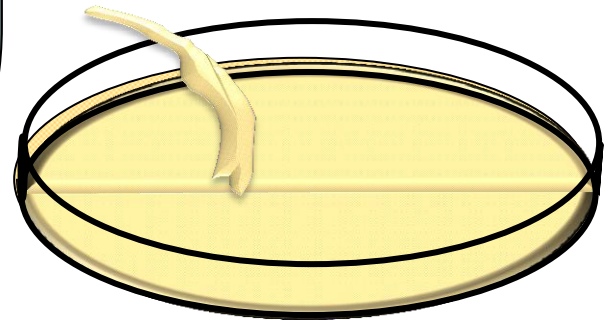
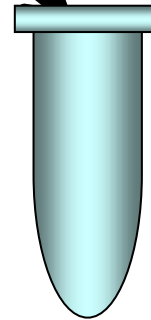
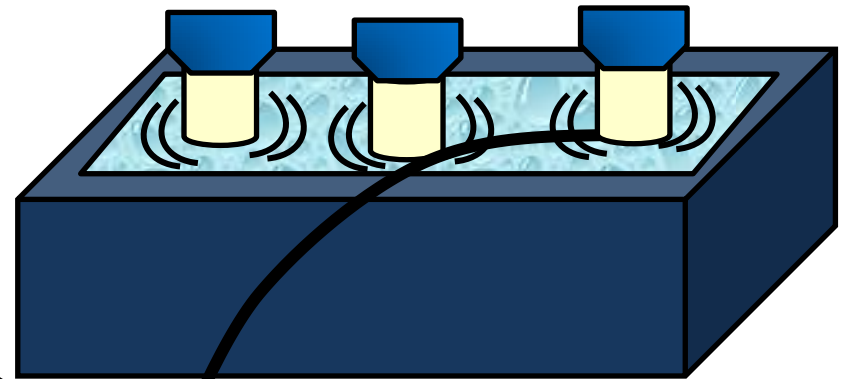
37 °C 90' in agitazione gentile
(max. 100 rpm)

Scaldare aliquote da 2.5 ml di
CR5-top agar in provette sterili
a bagnomaria (max. 43 °C)

Finita l'incubazione



50-200 µl di protoplasti



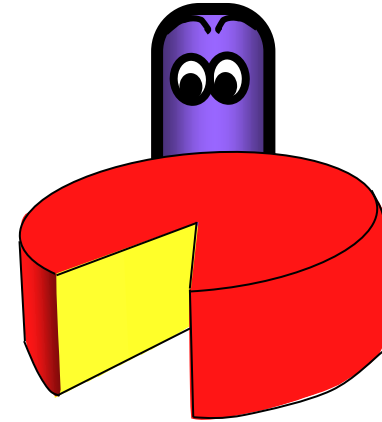
mischiare gentilmente tra le mani senza vortexare
versare su una piastra di LB antibiotata e preriscaldata
Incubare overnight at 37 °C

Brevibacillus choshinensis
(*Bacillus brevis*)

Sporigeno strettamente aerobio, frequente
nel suolo e nei prodotti caseari

molto meno versatile di *B. subtilis* per
lo spettro di substrati utilizzati

Ma molto adattabile alle
variazioni ambientali



→ Molti fattori σ

→ Molte MCP

Secerne un grande quantità
di proteine extracellulari

Ma la sua attività proteasica
extracellulare è praticamente assente

Queste caratteristiche ne hanno fatto un ospite
interessante per la produzione di proteine eterologhe

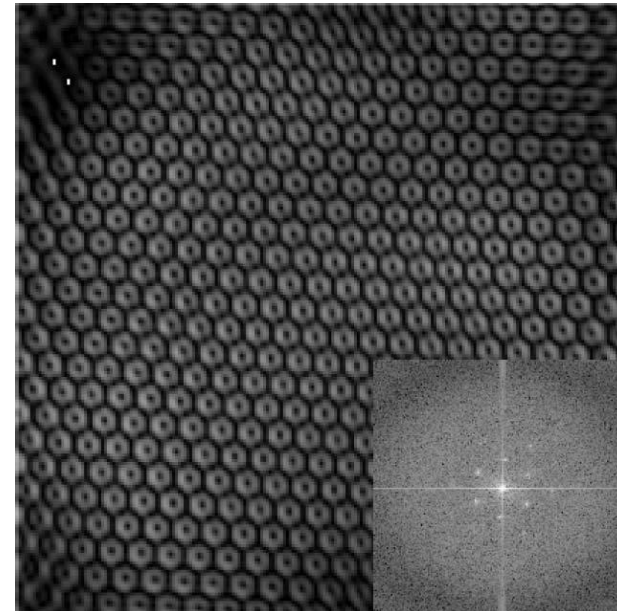
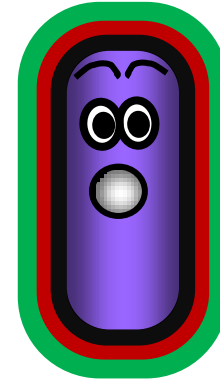
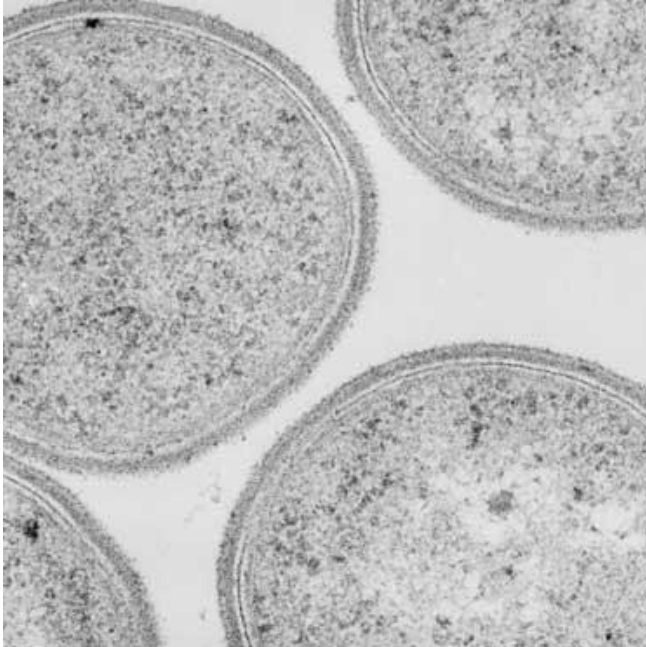
Il ceppo usato è *B. choshinensis*
NBRC 100599

Studi su questo ceppo hanno rivelato che la
parete di *B. brevis* è formata da tre strati

Peptidoglicano

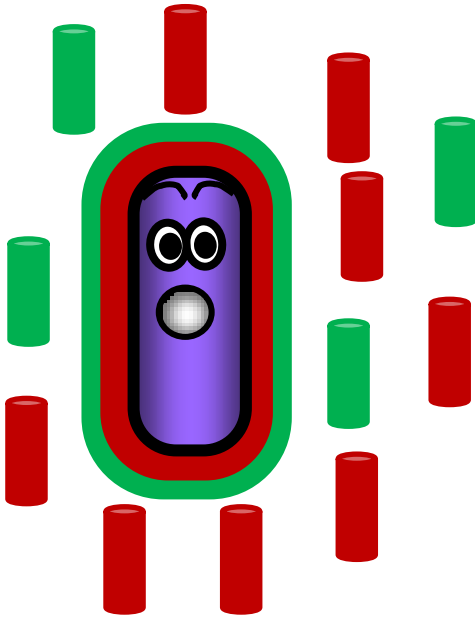
Strato S (medio)

Strato S (esterno)



Strato S cristallino di proteine

Quando la coltura arriva in fase stazionaria, le proteine che compongono gli strati S si staccano dalla parete e passano al terreno



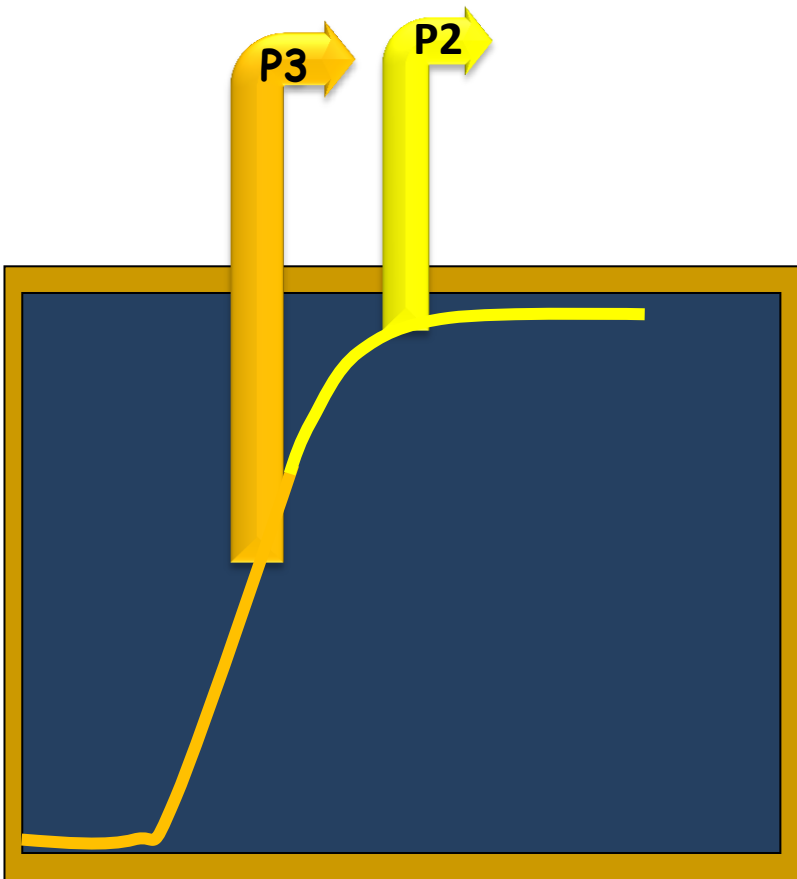
La sintesi delle proteine di parete, lenta fino a quel momento, si alza di colpo per sostituire le proteine che man mano vanno perdute

La sintesi delle proteine esterne prosegue a lungo dopo il cambiamento di morfologia

La quantità di proteine extracellulari raggiunge in condizioni ottimali i 12g/L: più del doppio della quantità di proteine totali associate alla cellula

L'analisi della regione codificante le proteine dello strato S ha rivelato un operone (*cwp*) con una regione di regolazione particolarmente articolata

Con 5 promotori e due regioni SD alternative



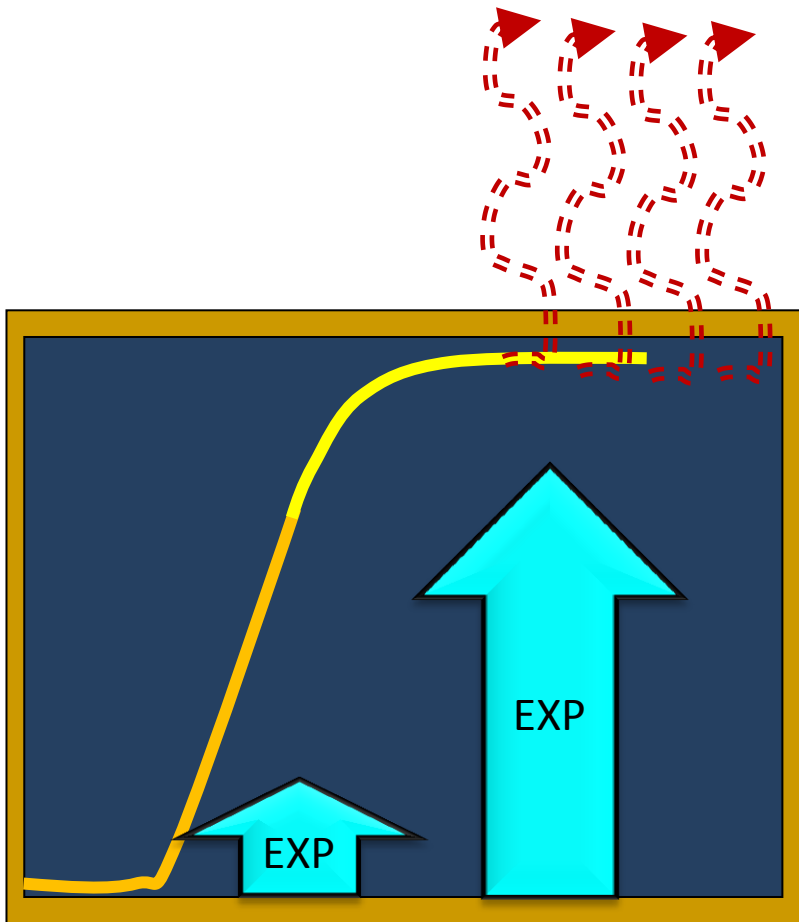
I promotori principali nella trascrizione di *cwp* sono P2 e P3

P3 è indotto durante la fase esponenziale

P2 è attivo tra la fase esponenziale e quella stazionaria

La regolazione della sintesi e della secrezione delle proteine della parete è coordinata con i cambiamenti fisiologici

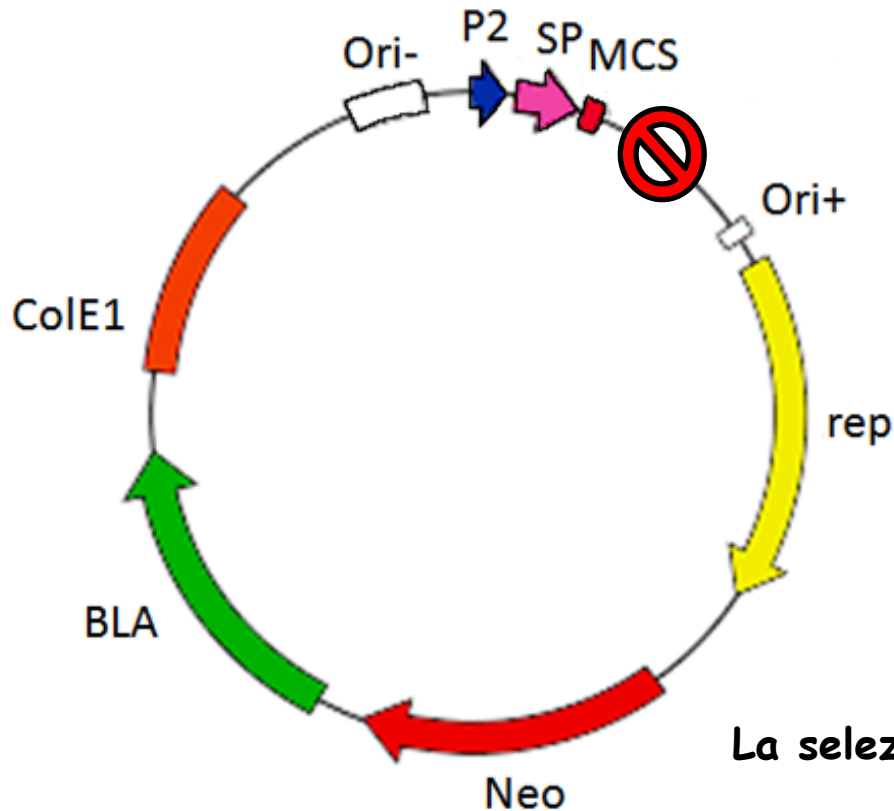
Finchè lo strato proteico occupa la superficie della cellula l'espressione si mantiene bassa



La perdita degli strati superficiali, correlata alla deplezione in Ca^{++} e Mg^{++}

dereprime la trascrizione da P2 e permette la sintesi massiva e la secrezione delle proteine della parete

Il sistema di espressione messo a punto per *B. choshinensis* si basa sul promotore P2, non attivo in *E. coli*



E prevede la preparazione del DNA plasmidico in *E. coli*

Il passaggio in *E. coli* può essere evitato perchè *B. choshinensis* si trasforma per elettroporazione con efficienza elevata

La selezione per *Brevibacillus* è Neomicina; le due regioni SD sono mantenute

La sequenza segnale per la secrezione è quella della proteina MWP (strato-S più interno)

P2 è un promotore molto forte, se il prodotto eterologo ostacola la crescita dell'ospite può non essere adatto

In questo caso si può usare invece P5

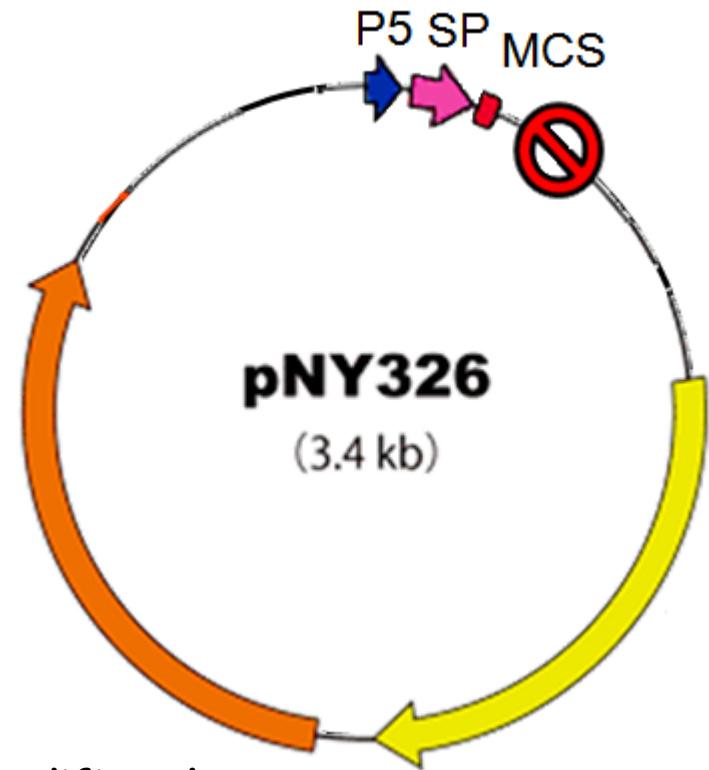
P5 è molto più debole ma assicura una resa costante che non interferisce con la crescita

Il plasmide con P5 è stato costruito per essere usato direttamente in *Brevibacillus*

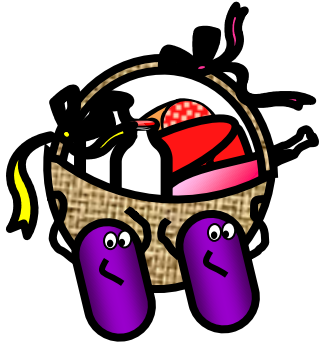
alla sequenza segnale è stata apportata una modifica: la SP naturale è riconosciuta da "Sec"

Questo sistema di secrezione trasloca anche proteine che non hanno ancora assunto il folding corretto

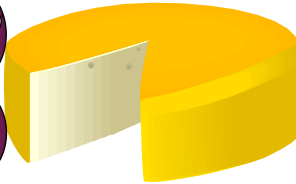
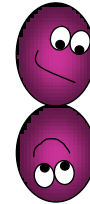
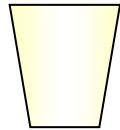
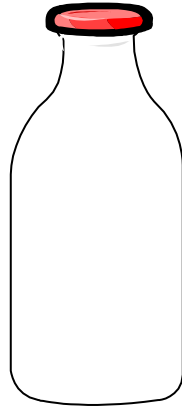
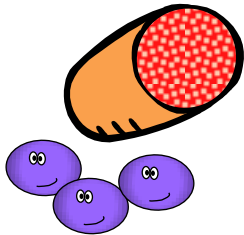
Nella SP è stato quindi inserito il motivo di riconoscimento per TAT che secerne solo proteine ripiegate correttamente e la sequenza è stata leggermente modificata per evitarne il riconoscimento da parte di SEC



I BATTERI ACIDOLATTICI



La normativa che regola le produzioni destinate all'uso alimentare o farmaceutico è restrittiva



Per questo motivo l'interesse per possibili ospiti batterici già impiegati per produzioni di questo tipo è elevato

La proposta di utilizzare come ospiti alcuni batteri acidolattici (LAB) nasce proprio da questa esigenza

Batteri lattici (LAB)
Formano acido lattico come prodotto finale
della fermentazione lattica

```
graph TD; LAB["Batteri lattici (LAB)  
Formano acido lattico come prodotto finale  
della fermentazione lattica"] --> Streptococcus["Streptococcus  
Patogeni per uomo e animali"]; LAB --> Lactobacillus["Lactobacillus:  
Importanti nel settore lattiero-caseario"]; LAB --> Leuconostoc["Leuconostoc  
fermentazione eterolattica"]; LAB --> Enterococcus["Enterococcus:  
Vivono nell'intestino di mammiferi"];
```

Lactobacillus:
Importanti nel settore lattiero-caseario

Streptococcus
Patogeni per uomo e animali

Leuconostoc
fermentazione eterolattica

Enterococcus:
Vivono nell'intestino di mammiferi

**I batteri acidolattici sono monodermi, immobili,
eterotrofi, a metabolismo fermentativo**

**Sono associati a substrati ricchi sotto il profilo nutrizionale, perché hanno
spesso difetti di sintesi e richiedono la presenza di aminoacidi e vitamina**

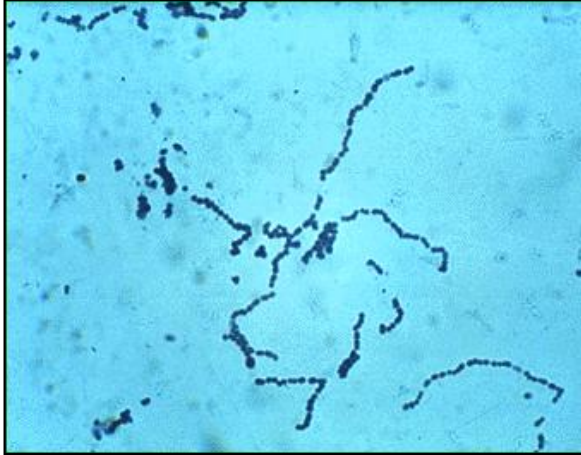
**Si trovano associati a mucose (*Streptococcus* - *Lactobacillus*), all'intestino di uomo
e animali (*Enterococcus* - *Lactobacillus*), a foglie (*Leuconostoc*-*Lactobacillus*) o
comunque materia organica in decomposizione di varia natura**

ALCUNI BATTERI ACIDOLATTICI
Sono di largo impiego nell'industria alimentare
categoria GRAS

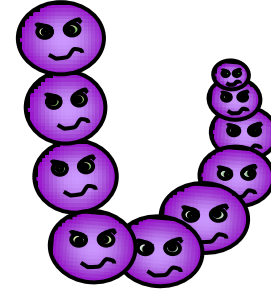


**sono stati considerati promettenti per
l'espressione di proteine omologhe o eterologhe**

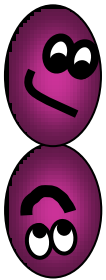
Streptococchi: cocci disposti in catenelle



Questa disposizione è dovuta alla separazione, spesso incompleta, tra le cellule figlie e al tipo di piano di divisione



Alcuni sono patogeni ma molti sono commensali di uomo o animali **NON** fanno parte delle specie usate per produzioni alimentari

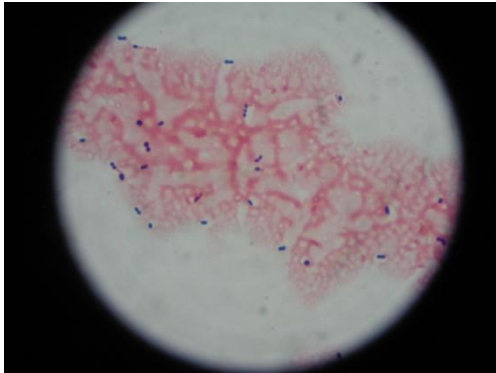
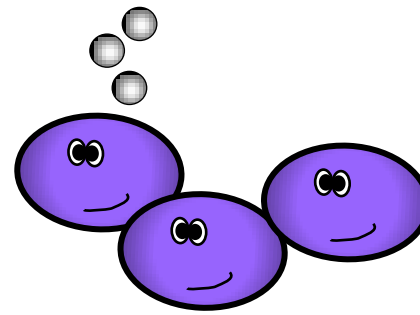


Enterococchi: cocci ovalari in catenelle corte

Vivono come commensali nell'intestino di uomo e animali e sono considerati indicatori di inquinamento fecale dell'ambiente

Leuconostoc

Capace di fermentazione eterolattica (acido lattico + etanolo + CO_2)

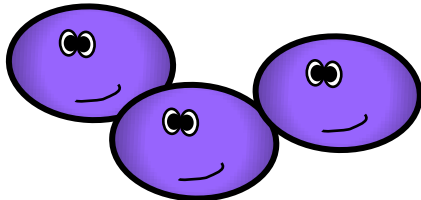


Produce diacetile e acetoina, che conferiscono sapore e aroma agli alimenti fermentati

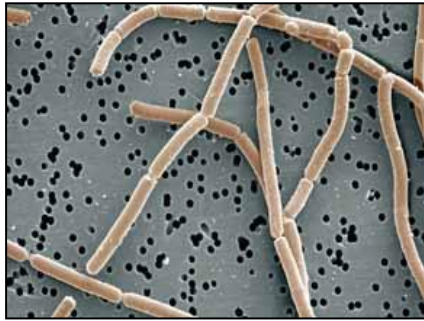
Preferisce substrati con pH solo debolmente acidi o francamente neutri

Lactococcus

Cocchi omofermentativi, non producono gas dalla fermentazione



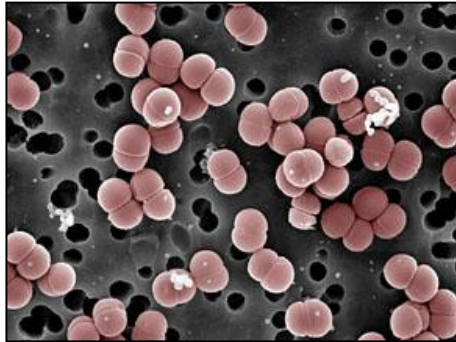
Lactobacillus: producono acido lattico per fermentazione (omolattica)



Omofermentanti obbligati (Gruppo I)

Il prodotto finale della fermentazione è esclusivamente acido lattico

L. acidophilus, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. salivarius*



Eterofermentanti facoltativi (Gruppo II)

Il prodotto finale è principalmente acido lattico ma, se il glucosio è limitato, sono prodotti anche lattato, acetato, etanolo o acido formico

L. casei, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sakei*

Eterofermentanti obbligati (Gruppo III)

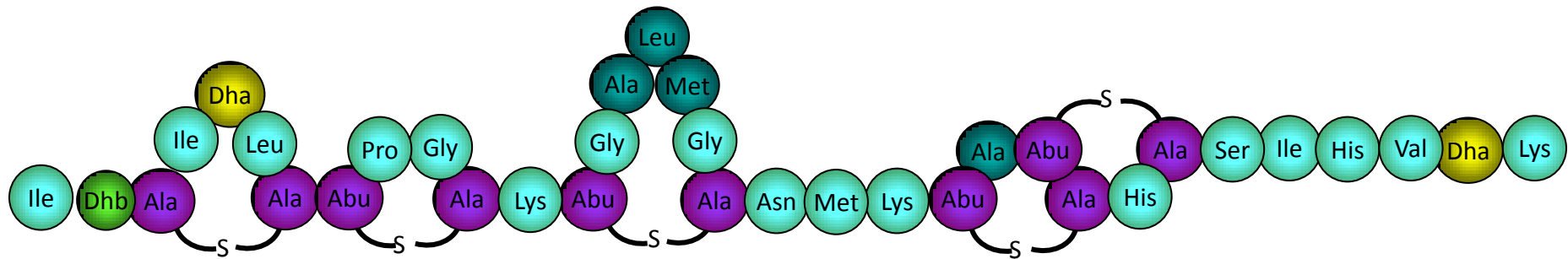
Prodotti finali: lattato, acetato (o etanolo) e CO_2

L. brevis, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. reuteri*

Sono usati nella conservazione del cibo attraverso processi di fermentazione (sauerkraut, yoghurt). Abbassano il pH dell'alimento e impediscono ad altri microrganismi di deteriorare gli alimenti

Alcuni ceppi producono batteriocine che antagonizzano i batteri potenzialmente pericolosi, che vengono anche dette Lantibiotici

Tra i lantibiotici uno dei più noti e già in uso come additivo alimentare è la NISINA



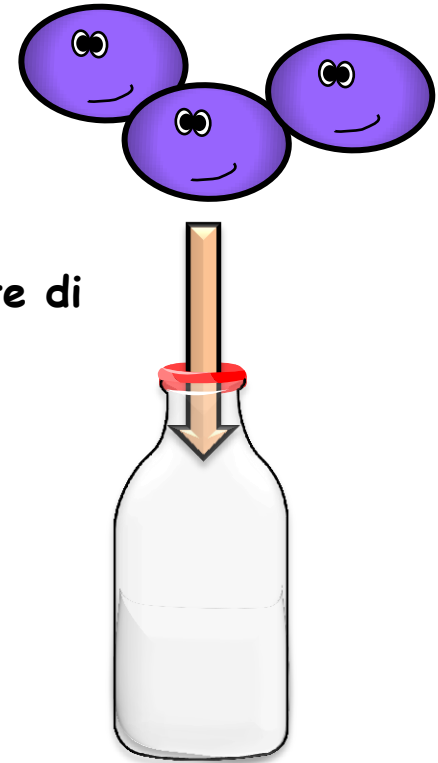
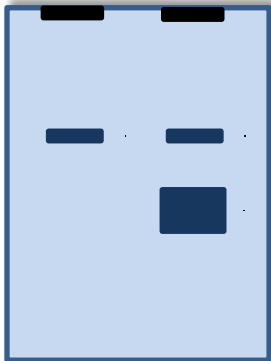
Un peptide soggetto a modificazioni post traduzionali,
prodotto da ceppi di *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis è la specie modello tra i LAB

L'espressione mediante questo microrganismo permette di ottenere il prodotto direttamente nell'alimento

i vantaggi offerti da *L. lactis* sono

Pochissime proteine sono secrete e,
di queste, solo una in quantità
rilevabili con la tecnica di Comassie



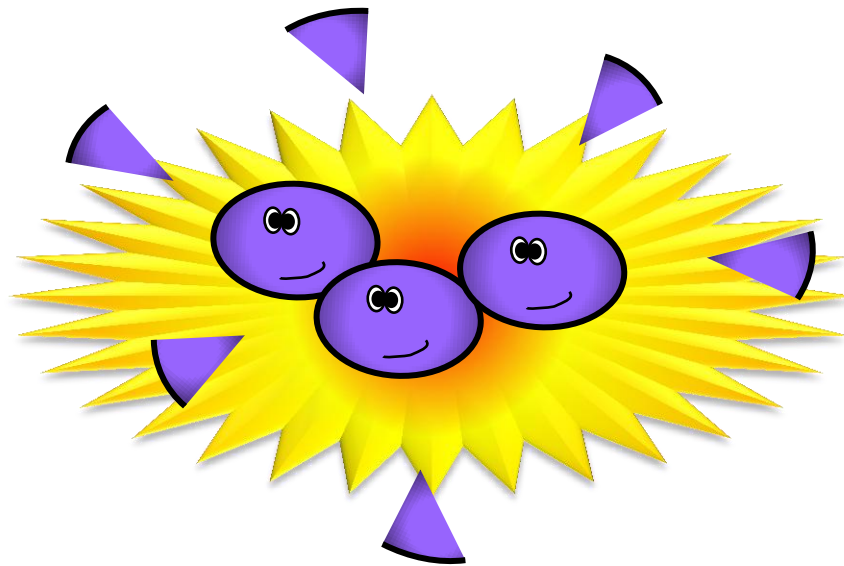
La mancanza di proteasi
extracellulari

Il sistema di espressione regolabile meglio caratterizzato è basato sull'operone *lac*

Ma ha un basso livello di induzione e la concentrazione dell'intermedio chiave (tagatosio-6-P) non può essere controllata con sufficiente accuratezza

Il sistema T7, presenta lo stesso problema e, per giunta si serve di un gene eterologo il cui uso non è autorizzato nelle produzioni alimentari

Un altro sistema, basato sul batteriofago $\phi 31$ di *Lactococcus* "*explosive gene expression*" aumenta la resa di circa 30 volte



ma può provocare una lisi completa e non controllabile