



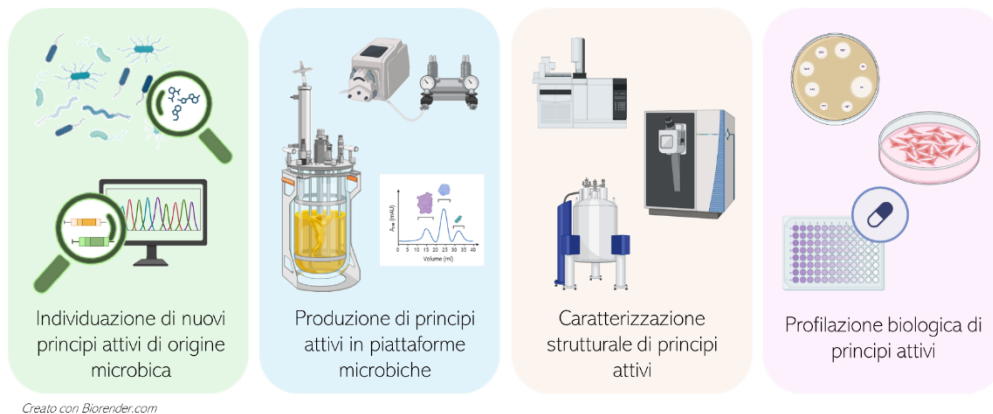
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DELL'INSUBRIA

“Produzione e caratterizzazione chimico/biologica di principi attivi di origine microbica”

Coordinatore: Dott.ssa Francesca Berini

Contatti: f.berini@uninsubria.it

Keywords: prodotti naturali, fermentazione, genomica, caratterizzazione strutturale, attività antimicrobiche, attività antineoplastiche.



Finalità: individuazione e selezione di principi attivi naturali di origine microbica, con attività e proprietà di interesse per applicazioni biotecnologiche, quali nutraceutiche e farmaceutiche, perseguendo diversi approcci di discovery, da saggi di screening fenotipico ad analisi genomiche; sviluppo di processi di produzione (upstream e downstream) di principi attivi in piattaforme di espressione microbica; caratterizzazione strutturale e funzionale delle molecole (es, determinazione del profilo di attività antimicrobica o antiossidante, valutazione del profilo di tossicità, valutazione dell'attività antineoplastica).

Localizzazione: c/o Dipartimento di Biotecnologie e Scienze della Vita, via Dunant 3, Varese

Organizzazione: La facility integra una rete che unisce gruppi di ricerca con competenze multidisciplinari (chimica delle fermentazioni, biologia molecolare, chimica analitica, farmacologia/biologia applicata) per fornire soluzioni legate allo sviluppo di principi attivi di origine microbica per diverse applicazioni biotecnologiche.

La facility è organizzata in quattro sottostrutture:

- a. Individuazione di nuovi principi attivi di origine microbica;
- b. Produzione di principi attivi in piattaforme di espressione microbica;
- c. Caratterizzazione strutturale di principi attivi di origine microbica;
- d. Profilazione biologica di principi attivi di origine microbica.

Collegamento con le Piattaforme Tecnologiche del CRIETT e le Piattaforme Scientifiche di Ateneo:

Questa facility opera in collaborazione con:

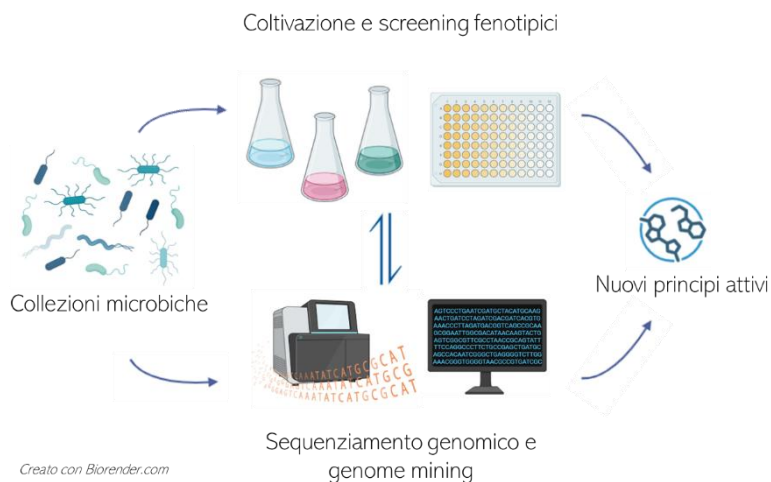
- *Piattaforma Sostenibilità*: Valorizzazione di biomasse e produzione di sostanze naturali; Sostenibilità e tutela delle risorse naturali.
- *Piattaforma Tecnologie per energia, salute e ambiente*: Materiali e nanomateriali; Tecnologie, metodi e approcci per l'indagine biomedica.
- *Piattaforma Fragilità*: Fragilità dell'anziano: nuove terapie.
- *Piattaforma di Analisi e Caratterizzazione della Materia*.
- *Piattaforma di Microscopia e Imaging*.

Sottostruttura “Individuazione di nuovi principi attivi di origine microbica”

Responsabili: Dott.ssa Francesca Berini, Prof.ssa Flavia Marinelli

Contatti: f.berini@uninsubria.it; flavia.marinelli@uninsubria.it

Keywords: collezioni microbiche, screening funzionale, sequenziamento genomico, genome mining



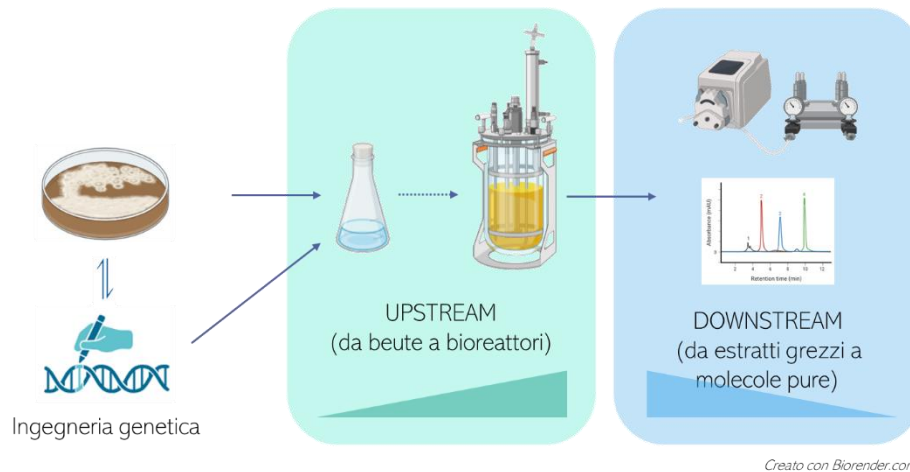
Sottostruttura dedicata all'individuazione di nuovi principi attivi naturali di origine microbica mediante l'integrazione di approcci sperimentali e computazionali avanzati, coprendo l'intero processo di identificazione delle molecole, dalla selezione delle fonti biologiche alla previsione del potenziale biosintetico. Nel dettaglio, è specializzata nello screening fenotipico di microorganismi per l'individuazione di metaboliti con attività biologiche di interesse biotecnologico e farmaceutico, quali attività antibiotiche e antiossidanti. Le attività sperimentali si basano su una ceppoteca composta da centinaia di ceppi microbici, inclusi isolati da matrici ambientali peculiari, con particolare abbondanza di attinomiceti e funghi filamentosi noti per la produzione di metaboliti specializzati. Le attività sperimentali possono essere integrate da tecnologie di sequenziamento genomico di ultima generazione e da analisi in silico per l'identificazione e la caratterizzazione di cluster biosintetici, favorendo la scoperta di nuovi principi attivi e la valorizzazione della diversità microbica. Grazie a questo approccio integrato, la sottostruttura si configura come infrastruttura di riferimento per ricerca di base, studi preclinici e applicazioni nei settori biotecnologico e farmaceutico.

Sottostruttura “Produzione di principi attivi in piattaforme di espressione microbica”

Responsabili: Prof.ssa Flavia Marinelli, Dott.ssa Francesca Berini, Prof. Enrico Caruso

Contatti: flavia.marinelli@uninsubria.it; f.berini@uninsubria.it; enrico.caruso@uninsubria.it

Keywords: fermentazione, ingegneria genetica, upstream, downstream



Sottostruttura dedicata alla produzione di principi attivi in piattaforme microbiche e allo sviluppo di processi biotecnologici scalabili per applicazioni di ricerca e preindustriali. L'integrazione di competenze in microbiologia, biologia molecolare e ingegneria dei processi consente di ottimizzare in modo sistematico tutte le fasi produttive, garantendo robustezza e trasferibilità dei processi. La sottostruttura è attrezzata per lo sviluppo di sistemi di fermentazione traslabili dalla scala di beuta a quella di bioreattore, con particolare attenzione all'ottimizzazione dei parametri di crescita e produzione per massimizzare le rese. Dispone di incubatori termostataati, fermentatori da 3 L, microscopi e strumentazioni di supporto per le attività upstream. Parallelamente, vengono applicati approcci avanzati di manipolazione genetica dei ceppi produttori per migliorare la produttività e modulare la biosintesi dei principi attivi. Le attività includono inoltre lo sviluppo di strategie di downstream per il recupero e la purificazione dei prodotti. L'esperienza consolidata nella produzione di antibiotici e molecole ad attività antiossidante costituisce una base solida per l'estensione ad altre classi di principi attivi di interesse biotecnologico e farmaceutico.

Sottostruttura “Caratterizzazione strutturale di principi attivi di origine microbica”

Responsabili: Prof. Enrico Caruso; Prof. Francesco Della Monica, Prof.ssa Lorella Izzo, Dott. Orlando Santoro

Contatti: enrico.caruso@uninsubria.it; f.dellamonica@uninsubria.it; lorella.izzo@uninsubria.it; orlando.santoro@uninsubria.it

Keywords: tecniche cromatografiche, tecniche spettroscopiche, NMR, TGA



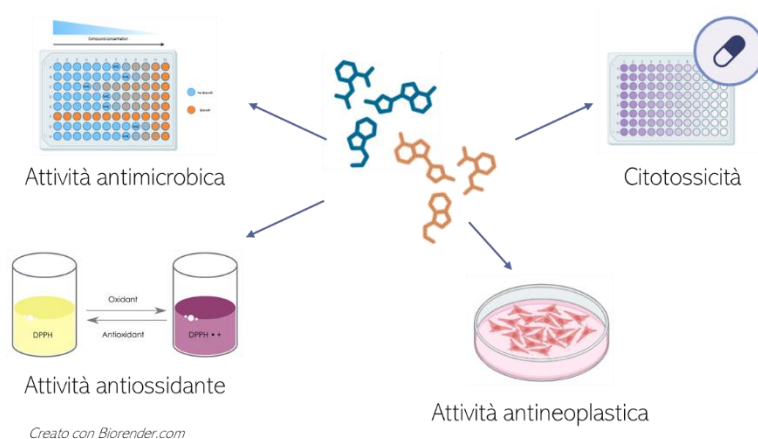
La sottostruttura fornisce un supporto integrato alle fasi avanzate del processo di scoperta e sviluppo, consentendo l'identificazione del/i componente/i dell'estratto associato/i all'attività biologica di interesse, valutandone anche la purezza e la stabilità chimica. Nello specifico, il grado di purezza dell'estratto può essere valutato utilizzando tecniche cromatografiche quali HPLC interfacciato con sistemi analitici come UV-vis e spettrometria di massa. In caso di composti più volatili, o che possano essere resi più volatili attraverso derivatizzazione, le analisi possono essere realizzate con gascromatografo (GC) interfacciato con spettrometro di massa (GC-MS). La sottostruttura possiede, inoltre, le competenze per l'applicazione di tecniche analitiche di riconoscimento quali tecniche spettroscopiche (UV-vis, fluorescenza e IR), risonanza magnetica (NMR) mono e bidimensionale, che insieme ai dati forniti dalle analisi dei segnali di massa possono aiutare nella determinazione della struttura esatta dei principi attivi. Le attività della sottostruttura includono, infine, la valutazione della stabilità termica -tramite tecnica termogravimetrica (TGA)- e della stabilità alla luce (fenomeno del photobleaching) dei principi attivi purificati.

Sottostruttura “Profilazione biologica di principi attivi di origine microbica”

Responsabili: Prof. ssa Marzia Gariboldi, Dott. Enrico Caruso, Dott. Francesca Berini, Prof.ssa Flavia Marinelli

Contatti: marzia.gariboldi@uninsubria.it; enrico.caruso@uninsubria.it; f.berini@uninsubria.it; flavia.marinelli@uninsubria.it

Keywords: attività antineoplastica, attività antimicrobica, attività antiossidante, citotossicità

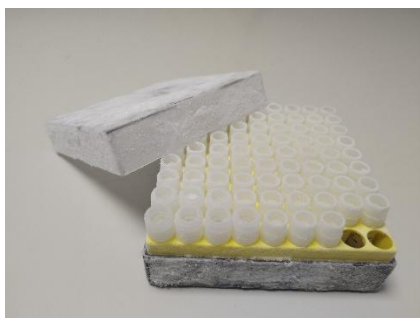


Sottostruttura dedicata alla valutazione delle proprietà biologiche di principi attivi naturali, finalizzata alla validazione funzionale del loro potenziale come antibiotici, farmaci antitumorali e molecole nutraceutiche. Le attività comprendono la profilazione dell'attività antimicrobica mediante test di suscettibilità su batteri e funghi, la valutazione dell'attività antiossidante tramite saggi radicalici e l'analisi del potenziale antineoplastico. Quest'ultima prevede la valutazione dell'effetto antiproliferativo dei principi attivi su linee cellulari tumorali umane di diversa origine, coltivate in modelli bidimensionali e tridimensionali (3D), nonché lo studio dei meccanismi molecolari coinvolti, inclusi morte cellulare, ciclo cellulare, invasività e altri processi associati a fenotipi tumorali aggressivi. Le attività della sottostruttura comprendono anche lo studio in vitro della potenziale tossicità di principi attivi. La sottostruttura dispone delle principali strumentazioni per la crescita microbica e la coltura cellulare, inclusi incubatori a CO₂, microscopi, citofluorimetro, lettore di piastre e microscopio a fluorescenza, oltre a camere per colture cellulari in ipossia, che permettono di riprodurre il microambiente dei tumori solidi e studiarne la risposta ai trattamenti.

Publicazioni:

- Andreo-Vidal, A., Yushchuk, O., Marinelli, F., & Binda, E. (2023). Cross-talking of pathway-specific regulators in glycopeptide antibiotics (teicoplanin and A40926) production. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 12(4), 641. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040641>
- Ballestri, M., Marras, E., Caruso, E., Bolognese, F., Malacarne, M. C., Martella, E., Tubertini, M., Gariboldi, M. B., & Varchi, G. (2022). Free and poly-methyl-methacrylate-bounded BODIPYs: Photodynamic and antimigratory effects in 2D and 3D cancer models. *Cancers*, 15(1), 92. <https://doi.org/10.3390/cancers15010092>
- De Leo, V., Marras, E., Maurelli, A. M., Catucci, L., Milano, F., & Gariboldi, M. B. (2024). Polydopamine-coated liposomes for methylene blue delivery in anticancer photodynamic therapy: effects in 2D and 3D cellular models. *International journal of molecular sciences*, 25(6), 3392. <https://doi.org/10.3390/ijms25063392>
- Fallica, A. N., Barbaraci, C., Amata, E., Pasquinucci, L., Turnaturi, R., Dichiarà, M., Intagliata, S., Gariboldi, M. B., Marras, E., Orlandi, V. T., Ferroni, C., Martini, C., Rescifina, A., Gentile, D., Varchi, G., & Marrazzo, A. (2021). Nitric oxide photo-donor hybrids of ciprofloxacin and norfloxacin: A shift in activity from antimicrobial to anticancer agents. *Journal of medicinal chemistry*, 64(15), 11597–11613. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00917>
- Ferrario, N., Marras, E., Vivona, V., Randisi, F., Fallica, A. N., Marrazzo, A., Perletti, G., & Gariboldi, M. B. (2024). Mechanisms of the antineoplastic effects of new fluoroquinolones in 2D and 3D human breast and bladder cancer cell lines. *Cancers*, 16(12), 2227. <https://doi.org/10.3390/cancers16122227>
- Gabano, E., Gariboldi, M. B., Marras, E., Barbato, F., & Ravera, M. (2023). Platinum(IV) combo prodrugs containing cyclohexane-1R,2R-diamine, valproic acid, and perillic acid as a multi-action chemotherapeutic platform for colon cancer. *Dalton transactions* (Cambridge, England : 2003), 52(32), 11349–11360. <https://doi.org/10.1039/d3dt01876h>
- Gariboldi, M. B., Marras, E., Vaghi, I., Margheritis, A., Malacarne, M. C., & Caruso, E. (2021). Phototoxicity of two positive-charged diaryl porphyrins in multicellular tumor spheroids. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 225, 112353. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112353>
- Orlandi, V. T., Bolognese, F., Chiodaroli, L., Armenia, I., Caruso, E., & Malacarne, M. C. (2024). Antibiofilm Activity of *Combretum micranthum* G. Don catechin-sugar phytocomplex on *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 29(9), 2091. <https://doi.org/10.3390/molecules29092091>
- Stepanyshyn, A., Rückert-Reed, C., Busche, T., Yaruta, B., Andreo-Vidal, A., Marinelli, F., Kalinowski, J., & Yushchuk, O. (2024). Complete genome assembly of *Amycolatopsis bartoniae* DSM 45807t allows the characterization of a novel glycopeptide biosynthetic gene cluster. *Genes*, 15(12), 1651. <https://doi.org/10.3390/genes15121651>
- Tallarita, R., Randisi, F., Jacobsen, L. M., Marras, E., Riva, M., Modoni, G., Fimmen, J., Bandaru, S. S. M., Schulzke, C., & Gariboldi, M. B. (2025). Anticancer effect of nature-inspired indolizine-based pentathiepienes in 2D and 3D cellular model. *Cancers*, 17(14), 2393. <https://doi.org/10.3390/cancers17142393>
- Yushchuk, O., Andreo-Vidal, A., Marcone, G. L., Bibb, M., Marinelli, F., & Binda, E. (2020). New molecular tools for regulation and improvement of a40926 glycopeptide antibiotic production in *Nonomuraea gerenzanensis* ATCC 39727. *Frontiers in microbiology*, 11, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00008>
- Yushchuk, O., Vior, N. M., Andreo-Vidal, A., Berini, F., Rückert, C., Busche, T., Binda, E., Kalinowski, J., Truman, A. W., & Marinelli, F. (2021). Genomic-led discovery of a novel glycopeptide antibiotic by *Nonomuraea coxensis* DSM 45129. *ACS chemical biology*, 16(5), 915–928. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00170>
- Yushchuk, O., Berini, F., Zhong, L., Rückert-Reed, C., Bernasconi, E., Bartolone, L., Busche, T., Kalinowski, J., Süßmuth, R. D., & Marinelli, F. (2025). A rare peptide scaffold in kineomicins, the glycopeptide antibiotics produced by *Actinokineospora auranticolor* DSM 44650. *Communications chemistry*, 8(1), 134. <https://doi.org/10.1038/s42004-025-01534-x>
- Yushchuk, O., Rückert-Reed, C., Busche, T., Marinelli, F., & Kalinowski, J. (2026). Updated sequence of ramoplanin biosynthetic gene cluster from *Actinoplanes ramoplaninifer* ATCC 33,076. *Journal of applied genetics*, 10.1007/s13353-025-01035-6. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s13353-025-01035-6>
- Zhukrovska, K., Binda, E., Fedorenko, V., Marinelli, F., & Yushchuk, O. (2024). The impact of heterologous regulatory genes from lipodepsipeptide biosynthetic gene clusters on the production of teicoplanin and A40926. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 13(2), 115. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13020115>

• **A) Individuazione di nuovi principi attivi di origine microbica**



Ceppoteca comprendente diverse centinaia di ceppi microbici, soprattutto attinomiceti e funghi filamentosi, *taxa* noti per la loro capacità di produrre principi attivi di interesse biotecnologico. La collezione è costantemente arricchita da isolati provenienti da diverse matrici ambientali a diverso impatto antropico e ancora relativamente poco esplorate per la scoperta di nuovi prodotti naturali, inclusi ca. 200 isolati da acque antartiche, ca. 150 isolati da acque artiche, ca. 40 isolati da ambienti urbani ad alto impatto antropico ecc. La ceppoteca rappresenta quindi una risorsa a cui attingere per la ricerca di nuovi principi attivi con svariate applicazioni biotecnologiche.



Tre **incubatori termostatici con agitazione** Infors HT Multitron e Sartorius Stedim Certomat, per l'incubazione a temperatura e agitazione controllata di più di 100 beute (scala di riferimento: 300 mL) in simultanea. Gli incubatori garantiscono un ambiente riproducibile per la crescita cellulare grazie all'elevata uniformità della temperatura interna (da un minimo di 5°C ad un massimo di 60°C) e una generale robustezza che ne consentono l'utilizzo 24/7. Gli incubatori rappresentano una risorsa sia per la fase di screening iniziale per la ricerca di nuovi principi attivi, sia per le attività di produzione dei principi attivi di interesse.



Un **incubatore termostatico** MPM Instruments M 80 - TB, con porta a doppio isolamento e isolamento termico con fibra minerale naturale, per garantire un'ottima tenuta e il mantenimento costante della temperatura di incubazione desiderata, nel range 5-80°C. La capienza di 80 L dell'incubatore consente l'incubazione simultanea di ca. 500 piastre (diametro di riferimento: 90 mm).



<https://www.uninsubria.it/ricerca/strutture-la-ricerca/centri-speciali/centro-di-ricerca-e-trasferimento-tecnologico-criett>

La sottostruttura può ricorrere all'utilizzo del **sequenziatore genomico** gestito dal CRIETT per il sequenziamento di genomi di specie microbiche di interesse, prerequisito per l'applicazione di approcci di genome mining per l'identificazione di cluster biosintetici codificanti i prodotti di interesse.

• B) Produzione di principi attivi in piattaforme di espressione microbica



Biofermentatori da 3 L (P100 Applikon) con un volume operativo massimo di 2 L per ciascun fermentatore, sono ideali per la coltura di cellule microbiche, inclusi microorganismi filamentosi, e la produzione di principi attivi su scala ridotta. Equipaggiati con elettrodi per il monitoraggio continuo di parametri cruciali come pH, temperatura, livello di schiuma e concentrazione di ossigeno disciolto (dO₂), questi fermentatori offrono un controllo preciso e in tempo reale delle condizioni di coltura, permettendo di ottimizzare la crescita cellulare e la produzione di metaboliti in ambienti controllati.



FPLC ÄKTA Start, rappresenta un sistema entry-level compatto e automatizzato per la purificazione su scala di laboratorio di peptidi e acidi nucleici. Vista l'elevata adattabilità, può essere applicato per la separazione di prodotti naturali di natura peptidica (ad esempio, antibiotici glicopeptidici) tramite diverse strategie di purificazione, quali cromatografia di affinità o a scambio ionico.



Sistemi di ultrafiltrazione Millipore, con membrane a permeabilità selettiva, adatte per la filtrazione di brodi di coltura e la concentrazione e parziale purificazione di biomolecole ivi presenti. Grazie alla loro efficacia, semplicità ed il costo operativo ridotto, rappresentano un punto di partenza per processi di downstream per il recovery dei principi attivi di interesse.



La sottostruttura può accedere all'uso dei sistemi di centrifugazione presenti presso il DBSV, incluse tre **supercentrifughe** per il trattamento simultaneo di ca. 1.5 L di campione a strumento (adattabili eventualmente anche con rotori con capienza maggiore), utili per la separazione di biomassa e brodo esausto, nonché per supportare fasi successive di frazionamento/purificazione, e un sistema **Savant SpeedVac** per la concentrazione sotto vuoto di campioni in diversi solventi.

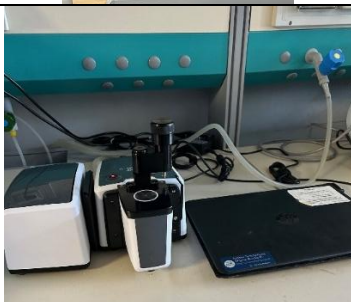
• **C) Caratterizzazione strutturale di principi attivi di origine microbica**



Due **sistemi HPLC** con Diode array detector e index detector, per l'analisi di principi attivi in tutte le fasi del processo di produzione e purificazione. In aggiunta ai due strumenti, la sottostruttura può accedere anche ad analoga strumentazione di pertinenza del CRIETT.



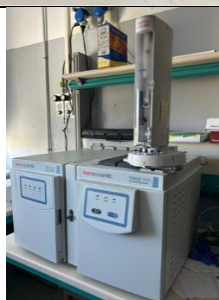
Stufa da vuoto per essiccare o trattare a basse temperature campioni sensibili al calore o all'ossidazione, grazie alla pressione ridotta che facilita l'evaporazione dei solventi (anche infiammabili).



Spettrofotometro infrarosso a trasformata di Fourier (FT-IR). Parte degli strumenti del DBSV, è utile per l'identificazione dei gruppi funzionali dei principi attivi. Lo strumento può analizzare campioni in soluzione e, grazie al modulo ATR (Attenuated Total Reflection), anche sostanze allo stato solido o liquido.






Spettrofluorimetro: un tipo di fluorimetro in grado di registrare spettri di emissione, facendo una scansione di lunghezze d'onda. L'emissione viene generalmente raccolta a 90° rispetto alla luce incidente. Serve per determinare le lunghezze d'onda e la resa quantica di fluorescenza.



Il **Gas Cromatografo accoppiato a spettrometro di massa (GC-MS)**, gestito dal DBSV, viene usato per la separazione, identificazione e quantificazione di sostanze volatili aventi masse comprese tra 1.2 e 1100 u.m.a. L'analisi cromatografica permette la separazione di componenti di una miscela (anche complessa) mentre l'analisi spettroscopica consente di indentificare ciascuna sostanza tramite lo studio dei pattern di frammentazione.



Evaporatore rotante per la rimozione dei solventi di una soluzione. Grazie alla pressione ridotta, l'evaporazione avviene a temperature basse, permettendo di prevenire la degradazione termica delle sostanze.

	<p>Cromatografia liquida accoppiata a spettrometro di massa (LC-MS) gestito dalla piattaforma CRIETT per la separazione, identificazione e quantificazione di sostanze non volatili e/o termolabili. Analogamente alla GC-MS, l'analisi cromatografica permette la separazione dei componenti di una miscela e la spettroscopia di massa garantisce l'identificare delle molecole.</p>
	<p>Spettrometro di Risonanza Magnetica Nucleare gestito dal CRIETT per l'analisi strutturale dei principi attivi. La tecnica consente di determinare non solo la connettività degli atomi ma anche la presenza di eventuali impurezze. Lo strumento lavora in soluzione e permette l'acquisizione di spettri mono e bidimensionali analizzando i segnali di ^1H, ^{13}C ed eteronuclei come ^{19}F e ^{31}P.</p>
	<p>Analisi TermoGravimetrica (TGA) per la valutazione della stabilità termica dei principi attivi. Lo strumento, parte della dotazione del CRIETT, registra le variazioni di peso del campione all'aumentare della temperatura consentendo di valutare eventuali degradazioni, perdite di molecole di solvente e/o presenza di residui inorganici. Le misure possono essere effettuate sia in atmosfera inerte sia all'aria.</p>

• **D) Profilazione biologica di principi attivi di origine microbica**



Citofluorimetro FACSCalibur, strumento del DBSV indispensabile per la realizzazione di saggi per la caratterizzazione dei meccanismi d'azione alla base dell'attività antitumorale (morte cellulare, produzione di ROS, uptake...).



Letto di piastre iMark, BIO-RAD, strumento del DBSV che può essere utilizzato per eseguire test di vitalità, allo scopo di valutare l'effetto antiproliferativo dei principi attivi naturali identificati, test Elisa e quantificazione del contenuto proteico per analisi Western blot.



<https://www.uninsubria.it/ricerca/strutture-la-ricerca/centri-speciali/centro-di-ricerca-e-trasferimento-tecnologico-criett>

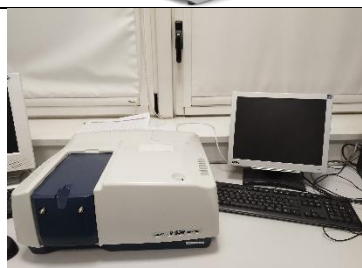
La sottostruttura può ricorrere all'utilizzo del **microscopio confocale** gestito dal CRIETT per la valutazione della localizzazione subcellulare dei prodotti naturali fluorescenti.



La **camera ipossica Billups-Rothenberg** può essere utilizzata per riprodurre condizioni di ipossia controllata tramite l'insufflazione di una miscela gassosa con una concentrazione di ossigeno pari allo 0,1%.



Microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse Ts2R. E' uno strumento del DBSV che consente di ottenere immagini da associare ai dati ottenuti con il citofluorimetro.



Spettrofotometro-UV Jasco V630, strumento versatile per la realizzazione di saggi volti all'identificazione di attività antimicrobiche, antiossidanti ecc. In aggiunta a questo spettrofotometro, la sottostruttura può appoggiarsi a spettrofotometri e spettrofluorimetri del DBSV, presenti sia nella sede di Varese che in quella di Busto Arsizio.



La sottostruttura può utilizzare anche il **lettore di assorbanza, fluorescenza e luminescenza per piastre Tecan Infinite 200 PRO** del DBSV. Grazie alla sua compatibilità con piastre multipozzetto, permette l'analisi simultanea di numerosi campioni, diventando quindi uno strumento importante per facilitare e velocizzare la profilazione biologica delle molecole in studio.