

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AMBIENTALI

SEZIONE DI GENETICA E BIOTECNOLOGIE AMBIENTALI

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE**

**XIX° CICLO**

2004-2006

---

**ISOLAMENTO DI NUOVI BATTERI PRODUTTORI DI  
FITASI E CARATTERIZZAZIONE PRELIMINARE  
DELLE NUOVE ATTIVITÀ FITASICHE**

RELATORE:

Chiar.ma Prof. ANNA MARIA SANANGELANTONI

CO-RELATORE:

Dott.ssa MARINA MALATRASI

COORDINATORE:

Chiar.mo Prof. NELSON MARMIROLI

DOTTORANDA:

ELISA TRIVELLONI

*Un ringraziamento particolare*

*ad Anna Maria, Merion,*

*Chiaretta, Miche, Davide, Stan,*

*... Grazie!*

<b>SOMMARIO</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>6</b>
<b>1.1. L'ACIDO FITICO</b>	<b>6</b>
<i>1.1.1. Il problema dell'acido fitico negli ecosistemi agricoli</i>	8
<i>1.1.2. L'acido fitico come fattore antinutrizionale</i>	10
<b>1.2. LE FITASI</b>	<b>12</b>
<i>1.2.1. "Histidine acid phosphatase phytase" (HAP)</i>	15
<i>1.2.2. "β-Propeller phytase" (BPP)</i>	18
<i>1.2.3. "Purple acid phosphatase phytase"(PAP)</i>	20
<i>1.2.4. "Cysteine phosphatase phytase " (CPhy)</i>	22
<b>1.3. PROPRIETÀ CATALITICHE DELLE FITASI</b>	<b>23</b>
<i>1.3.1. Specificità di substrato</i>	23
<i>1.3.2. pH e temperatura ottimali</i>	25
<i>1.3.3. Resistenza alla proteolisi</i>	27
<i>1.3.4. Termostabilità</i>	28
<b>1.4. BIOTECNOLOGIE DELLE FITASI</b>	<b>31</b>
<i>1.4.1. Ingegneria delle fitasi</i>	31
<i>1.4.2. Espressione eterologa delle fitasi in sistemi microbici</i>	33
<i>1.4.3. Espressione eterologa delle fitasi in piante transgeniche</i>	35
<i>1.4.4. Espressione eterologa delle fitasi in animali transgenici</i>	36
<b>1.5. APPLICAZIONI DELLE FITASI</b>	<b>37</b>
<i>1.5.1. Applicazione delle fitasi nel campo della nutrizione animale</i>	38

1.5.2. <i>Applicazione delle fitasi nel campo della nutrizione umana</i>	40
1.5.3. <i>Applicazione delle fitasi nella sintesi di inositol fosfati</i>	42
1.5.4. <i>Applicazione delle fitasi in acquicoltura</i>	43
1.5.5. <i>Applicazione delle fitasi come ammendante per il suolo</i>	44
1.6. PIANTE A RIDOTTO CONTENUTO DI ACIDO FITICO NEI SEMI	46
<hr/>	
2. SCOPO DELLA RICERCA	48
<hr/>	
3. MATERIALI E METODI	51
3.1. CEPPI BATTERICI UTILIZZATI	51
3.2. TERRENI UTILIZZATI E CONDIZIONI DI CRESCITA	51
3.3. ISOLAMENTO DEL CEPPO 52 E SAGGIO DI BAE (Bae et al., 1999) PER VERIFICARE LA CAPACITÀ DI DEGRADARE IL FITATO	55
3.3.1. <i>Isolamento del ceppo 52</i>	55
3.3.2. <i>Saggio di Bae</i>	55
3.4. IDENTIFICAZIONE DEL CEPPO 52	56
3.4.1. <i>Estrazione del DNA genomico e determinazione qualitativa e quantitativa del DNA estratto</i>	56
3.4.2. <i>Amplificazione del rDNA 16S del ceppo 52 mediante PCR ("Polymerase Chain Reaction")</i>	57
3.4.3. <i>Parziale sequenziamento del rDNA 16S ed identificazione del ceppo 52</i>	58
3.5. ANALISI COMPUTAZIONALE DEL GENE <i>swphy</i> DI <i>Sphingomonas wittichii</i> RW1	60

<b>3.6. CARATTERIZZAZIONE PRELIMINARE DELL'ATTIVITÀ FITASICA DEL CEPP0 52 DI <i>Aeromonas</i> sp. E DI <i>Sphingomonas wittichii</i> RW1</b>	<b>61</b>
3.6.1. <i>Lisi cellulare con "French Press"</i>	61
3.6.2. <i>Lisi cellulare con polvere di allumina, frazionamento dell'estratto cellulare con solfato di ammonio e successiva dialisi delle frazioni proteiche</i>	62
3.6.3. <i>Determinazione della concentrazione proteica con il metodo Bradford (Bradford, 1976)</i>	66
3.6.4. <i>Analisi degli estratti cellulari e delle frazioni proteiche mediante SDS-PAGE ("Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis") e saggio di attività fitasica direttamente nel gel (Zimogramma)</i>	67
3.6.5. <i>Saggio di quantificazione dell'attività fitasica/fosfatasi</i>	71
<b>3.7. CLONAGGIO DEL GENE <i>swphy</i> DI <i>Sphingomonas wittichii</i> RW1</b>	<b>74</b>
3.7.1. <i>Vettori di espressione utilizzati</i>	74
3.7.2. <i>Amplificazione del gene <i>swphy</i> mediante PCR ("Polymerase Chain Reaction")</i>	75
3.7.3. <i>Preparazione dei vettori plasmidici e degli inserti da utilizzare nei clonaggi</i>	77
3.7.4. <i>Reazione di ligazione e trasformazione delle cellule competenti di <i>Escherichia coli</i></i>	78
3.7.5. <i>PCR su colonia, estrazione e sequenziamento del DNA plasmidico</i>	79
<b>3.8. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEL GENE <i>swphy</i> IN <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)</b>	<b>82</b>
3.8.1. <i>Preparazione di cellule competenti di BL21(DE3) e successiva trasformazione con i vettori di espressione contenenti il gene <i>swphy</i> (<i>swphy</i> e <math>\Delta</math>S<i>swphy</i>)</i>	82
3.8.2. <i>Induzione dell'espressione del gene <i>swphy</i></i>	83

3.8.3. <i>Lisi cellulare mediante “Freeze and Thaw” ed ottenimento delle frazioni TCP (“Total Cell Protein”) e delle frazioni citoplasmatiche solubili</i>	84
3.8.4. <i>Purificazione della proteina ricombinante hSWPHY</i>	85
<b>3.9. ANALISI DELLE PROPRIETÀ CATALITICHE DELLA FITASI RICOMBINANTE hSWPHY</b>	<b>86</b>
3.9.1. <i>Saggio di quantificazione dell’attività fitasica di hSWPHY</i>	86
3.9.2. <i>Effetto di ioni metallici sull’attività fitasica di hSWPHY</i>	88
3.9.3. <i>Effetto del pH sull’attività e sulla stabilità della fitasi ricombinante hSWPHY</i>	88
3.9.4. <i>Effetto della temperatura sull’attività e sulla stabilità della fitasi ricombinante hSWPHY</i>	89
3.9.5 <i>Analisi della specificità di substrato della fitasi ricombinante hSWPHY</i>	90
3.9.6 <i>Analisi della resistenza alla proteolisi della fitasi ricombinante hSWPHY</i>	91
<hr/>	
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>92</b>
4.1. <b>ISOLAMENTO DI BATTERI PRODUTTORI DI FITASI: APPROCCIO CLASSICO</b>	<b>92</b>
4.2. <b>CARATTERIZZAZIONE PRELIMINARE DELL’ATTIVITÀ FITASICA DEL CEPPPO 52 DI <i>Aeromonas</i> sp.</b>	<b>94</b>
4.2.1. <i>Effetto del pH sull’attività fitasica/fofatasica del ceppo 52 di <i>Aeromonas</i> sp.</i>	94
4.2.2. <i>Effetto della temperatura sull’attività fitasica/fofatasica del ceppo 52 di <i>Aeromonas</i> sp.</i>	96
4.2.3. <i>Analisi dell’attività fitasica/fofatasica nelle frazioni proteiche ottenute mediante frazionamento dell’estratto cellulare con solfato di ammonio</i>	98
4.2.4. <i>Analisi dell’estratto cellulare del ceppo 52 di <i>Aeromonas</i> sp. e delle frazioni proteiche mediante SDS-page e Zimogramma</i>	100

4.3.	ISOLAMENTO DI BATTERI PRODUTTORI DI FITASI: APPROCCIO COMPUTAZIONALE	101
4.4	CARATTERIZZAZIONE PRELIMINARE DELL'ATTIVITÀ FITASICA/FOSFATASICA DI <i>Sphingomonas wittichii</i> RW1	108
4.4.1.	<i>Saggio di quantificazione dell'attività fitasica/fosfatasica presente nell'estratto cellulare di S. wittichii RW1</i>	109
4.4.2.	<i>Analisi dell'estratto cellulare di S. wittichii RW1 mediante SDS- PAGE e Zimogramma</i>	110
4.4.3.	<i>Analisi dell'attività fitasica/fosfatasica delle frazioni proteiche ottenute mediante frazionamento dell'estratto cellulare con solfato di ammonio</i>	112
4.5.	CLONAGGIO DEL GENE <i>swphy</i>	115
4.6.	ESPRESSIONE DEL GENE <i>swphy</i> IN <i>Escherichia coli</i>	118
4.7.	ANALISI DELLE PROPRIETÀ CATALITICHE DELLA FITASI RICOMBINANTE hSWPHY	123
4.7.1.	<i>Effetto di ioni metallici sull'attività fitasica della fitasi ricombinante hSWPHY</i>	123
4.7.2.	<i>Effetto del pH sull'attività e sulla stabilità della fitasi ricombinante hSWPHY</i>	127
4.7.3.	<i>Effetto della temperatura sull'attività e sulla stabilità della fitasi ricombinante hSWPHY</i>	130
4.7.4.	<i>Analisi della specificità di substrato della fitasi ricombinante hSWPHY</i>	134
4.7.5.	<i>Analisi della resistenza alla proteolisi della fitasi ricombinante hSWPHY</i>	136
<hr/>		
5.	CONCLUSIONI	139
<hr/>		
6.	BIBLIOGRAFIA	143

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. L'Acido fitico

Nel 1903 Posternak descrisse l'acido fitico per la prima volta. Esso è una forma organica del fosforo chimicamente conosciuta come mio-inositolo esafofosfato (IP6) (figura 1), la sua formula molecolare è  $C_6H_{18}O_{24}P_6$ , il suo peso molecolare è 659.86, i suoi sali vengono chiamati fitati, mentre si usa il termine fitina per riferirsi ai sali di calcio e magnesio.

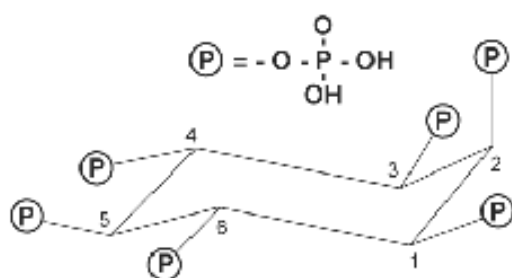


Figura 1: formula strutturale dell'acido fitico.

L'acido fitico rappresenta la principale forma di riserva del fosforo, di minerali e inositolo nei semi, ma viene anche accumulato in altri tessuti vegetali e organi quali polline, radici, tuberi (Cosgrove, 1980; Raboy, 1997; Honke et al., 1998); costituisce circa il 4-5% del peso secco dei semi e circa il 60-80% delle riserve di fosfato in essi presente (tabella 1); la maggior parte dell'acido fitico dei semi è accumulato sottoforma di fitati ed è depositato nei corpi proteici in inclusioni dette globoidi (Lott, 1984; Reddy et al., 1982; Raboy, 1990, 1997). Nei cereali circa il 90% dell'acido fitico dei semi si trova nell'aleurone e il 10% nello scutello,



nel mais, al contrario, il 90 % dell'acido fitico dei semi si trova nell'aleurone ed il 10 % nello scutello, nelle dicotiledoni l'acido fitico è depositato nell'endosperma e nelle foglie embrionali (O'Dell et al., 1972).

	Fitato [g/100 g sostanza secca]	Fitato [% di P totale]
<b>Cereali</b>		
Grano	0.24	72
Frumento	0.27	69
Orzo	0.27	64
Avena	0.29	67
Sorghum	0.24	66
Riso	0.27	77
<b>Radici e tuberi</b>		
Manioca	0.04	28
patata dolce	0.05	24

**Tabella 1: Contenuto di fitato nei cereali e nelle radici e tuberi (Ravindran et al., 1995).**

La funzione svolta dal metabolismo dell'acido fitico in questi tessuti, durante la germinazione e lo sviluppo, riguarda principalmente l'immagazzinamento ed il recupero del fosforo, dell'inositolo e di vari e importanti minerali quali calcio, potassio, magnesio, zinco, ferro, che si legano ai gruppi fosfato dell'acido fitico formando i fitati.

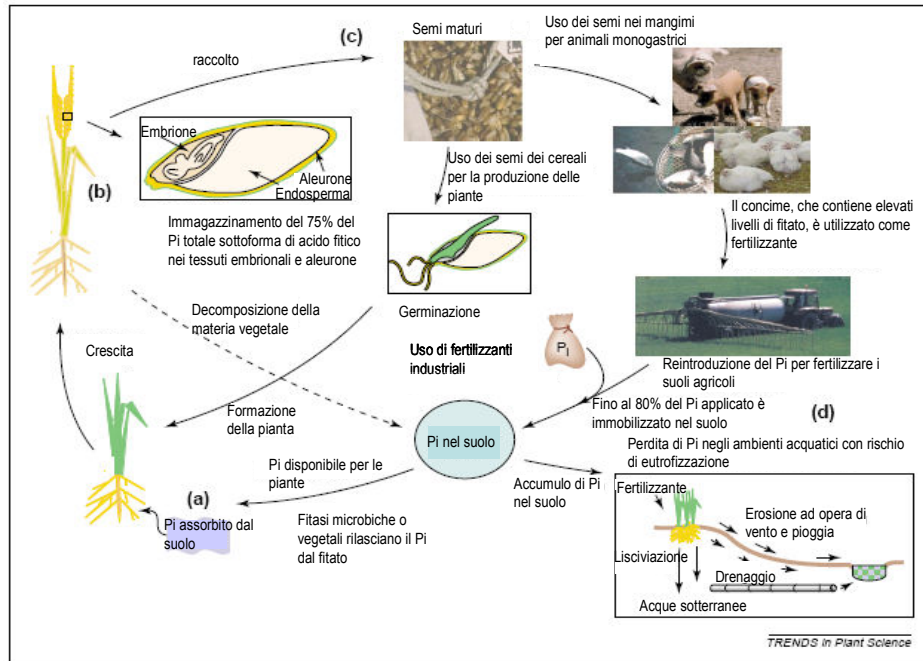
Molti enzimi importanti per la biosintesi dell'acido fitico, ed i geni che li codificano, sono stati identificati (Shi et al., 2003, 2005; Hitz et al., 2002). Essa è principalmente citoplasmatica e avviene a partire dall'inositolo attraverso una serie di passaggi fosforilativi; la

degradazione avviene durante la germinazione del seme ad opera di uno specifico gruppo di enzimi denominati fitasi (Loewus and Murthy, 2000). Alla fine degli anni 80 e 90 è stato dimostrato che l'IP6 è ubiquitario nelle specie eucariotiche ed è tipicamente la forma fosforilata dell'inositolo più abbondante nelle cellule (Sasakawa et al., 1995). Diversi studi hanno dimostrato che l'IP6 e le diverse forme fosforilate dell'inositolo intervengono nel regolare varie ed importanti funzioni cellulari quali trasduzione del segnale, esportazione dell'RNA, riparo e ricombinazione del DNA (Hanakahi and West, 2002; Luo et al., 2002), endocitosi e traffico vescicolare (Shears, 2004; Saiardi et al., 2002); è stato inoltre dimostrato che l'acido fitico funziona come antiossidante chelando i cationi divalenti come rame e ferro, prevenendo la formazione di specie reattive dell'ossigeno responsabili del danno cellulare e della carcinogenesi (Graf et al., 1987; Harland and Morris, 1995).

### **1.1.1. Il problema dell'acido fitico negli ecosistemi agricoli**

I mangimi animali sono principalmente di origine vegetale e contengono, pertanto, una elevata quantità di fitato. Gli animali poligastrici sono in grado di metabolizzare il fitato grazie ai microrganismi del rumine che posseggono gli enzimi atti alla degradazione dell'acido fitico, ovvero le fitasi. Il rumine è un ambiente complesso abitato da batteri anaerobi obbligati, funghi e protozoi, che producono una vasta serie di enzimi idrolitici; la diversità delle fitasi in esso presenti, ed anche dei microrganismi produttori, è stata recentemente esaminata (Yanke et al., 1998; Nakashima et al., 2006). Diversamente, gli animali monogastrici quali polli, maiali e pesci, in cui l'attività fitasica nel tratto digestivo è

limitata se non pressoché assente, non sono in grado di utilizzare il fitato come fonte di fosfato (Maenz et al.1998; Boiling et al., 2000).



**Figura 2: cicli del fosforo dell'acido fitico negli ecosistemi naturali e agricoli (Brinch-Pedersen et al., 2002).** (a) le radici assorbono dal suolo il fosforo inorganico (Pi) che viene trasferito al resto della pianta attraverso xilema e floema. Solo una limitata quantità del Pi del suolo è disponibile per le piante a causa della sua bassa mobilità e della sua elevata affinità per le componenti organiche ed inorganiche e per le particelle del suolo. (b) l'acido fitico è la principale riserva di fosforo nei semi. Negli ecosistemi naturali i semi germinano o si decompongono insieme alle parti vegetative della pianta, ed il Pi ritorna al suolo attraverso azione idrolitica di natura chimica, microbica e vegetale sulle forme organiche del fosforo. (c) negli ecosistemi agricoli i semi sono utilizzati sia per la produzione delle piante e sia nei mangimi per la alimentazione del bestiame. In particolare, l'alimentazione degli animali monogastrici causa l'escrezione di grandi quantità di acido fitico poiché il loro tratto digestivo manca delle fitasi. (d) fino al 80% del fosforo fornito mediante fertilizzazione rimane fissato nel suolo. Di conseguenza, per assicurare la produttività del raccolto, viene spesso applicata una eccedenza di Pi come fertilizzante. Molti anni di intensa applicazione di Pi prodotto industrialmente e del fosforo contenuto nel concime ha portato a forti accumuli di fosforo nel suolo, aumentando così la perdita di Pi nell'ambiente acquatico.

A causa di ciò gli allevatori, per soddisfare le richieste nutrizionali, sono obbligati ad implementarne la dieta con fosfato inorganico, un minerale costoso e non rinnovabile. Di conseguenza, gli animali monogastrici espellono grandi quantità di fosforo, principalmente sotto forma di acido fitico che, in seguito a fertilizzazione, viene trasferito ai terreni agricoli, dove viene idrolizzato dai microrganismi del suolo, liberando il suo contenuto di fosfato inorganico (figura 2). Circa l'80% del fosforo applicato mediante fertilizzazione rimane fissato nel suolo, pertanto, per aumentare la produttività dei terreni agricoli, viene spesso impiegato un "surplus" di fertilizzante; molti anni di intensiva applicazione ai terreni agricoli sia di fertilizzanti prodotti industrialmente che di concimi animali hanno portato a forti accumuli di fosforo nel suolo. Benché il fosfato, sia organico che inorganico, sia saldamente legato alle particelle del suolo, quest'ultimo può giungere a saturazione ed il fosfato può essere trasferito agli ambienti acquatici attraverso drenaggio, scorrimento delle acque superficiali, erosione ad opera del vento (Brinch-Pedersen et al., 2002) (figura 2), causando fenomeni di eutrofizzazione delle acque che portano a fastidiose e pericolose fioriture algali, con conseguente ipossia delle acque e morte di animali acquatici (Mallin MA., 2000).

### **1.1.2. L'acido fitico come fattore antinutrizionale**

L'acido fitico, non solo non può essere utilizzato dagli animali monogastrici come fonte di fosfato, ma è anche considerato un forte fattore antinutrizionale poiché interferisce nell'assorbimento e nell'utilizzo di cationi minerali, proteine, aminoacidi.

Il grado di interazione di minerali e proteine con gli esteri di inositolo fosfato è direttamente correlato al grado di fosforilazione dell'inositolo (Harland and Narula 1999). I sei gruppi fosfato dell'acido fitico ne fanno un forte agente chelante in grado di legare cationi minerali divalenti (Harland and Oberleas 1999) e nelle condizioni di pH dell'intestino di animali e uomini vengono formati complessi insolubili metallo-fitato, riducendone la disponibilità all'assorbimento. Le deficienze nutrizionali da zinco, ferro e calcio, fortemente diffuse nei paesi in via di sviluppo, sono state parzialmente attribuite all'acido fitico, essendo gli alimenti principali di origine vegetale (Manary et al., 2002a, b).

L'interazione del fitato con le proteine è fortemente dipendente dal pH: a pH <5 si formano principalmente complessi binari proteina-fitato, in cui la proteina è direttamente legata al fitato; a pH vicini e al di sopra della neutralità si formano, invece, complessi ternari proteina-fitato, in cui la proteina è legata a uno ione minerale che, a sua volta, è legato al fitato (Selle et al. 2000; Kies et al., 2006). Questi complessi rendono le proteine meno solubili e più resistenti alla proteolisi con una conseguente riduzione della loro digeribilità (Dvorakova, 1998).

È stato inoltre dimostrato che il fitato interferisce con la digeribilità dell'amido in seguito ad interazione con le amilasi (Yoon et al., 1983) e che inibisce l'azione di altri diversi enzimi quali tripsina, fosfatasi acide, tirosinasi (Harland and Morris, 1995).

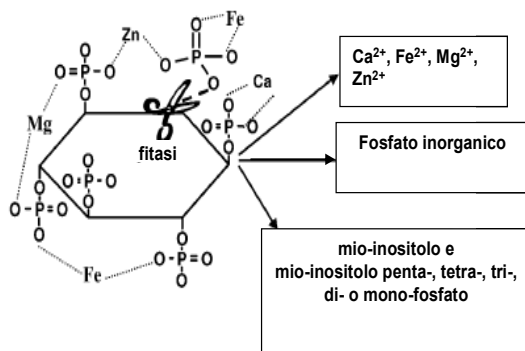
I problemi ambientali e nutrizionali concernenti la presenza di elevate quantità di fitato nei semi destinati sia all'alimentazione animale che umana possono essere risolti con le seguenti strategie:

- l'utilizzo di preparazioni commerciali di fitasi come additivo nei mangimi o nei cibi
- la creazione di piante ingegnerizzate in modo da aumentare la produzione di fitasi attiva nei semi
- la creazione di piante a ridotto contenuto di acido fitico nei semi.

Inoltre, riguardo ai problemi nutrizionali degli animali monogastrici, una ulteriore strategia può essere la creazione di animali transgenici in grado di esprimere in modo sito-specifico le fitasi.

## 1.2. Le Fitasi

Le fitasi (mio-inositolo esafosfato fosfoidrolasi) sono enzimi in grado di idrolizzare l'acido fitico formando intermedi fosforilati dell'inositolo e fosfato inorganico; sono inoltre in grado di rilasciare i metalli divalenti chelati dal fitato (figura 3).



**Figura 3: illustrazione schematica della funzione delle fitasi.**

Il fitato rappresenta il sale dell'acido fitico (mio-inositolo esafosfato) e dei metalli divalenti quali  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . Le fitasi, rappresentate come un paio di forbici, iniziano la rimozione dei gruppi fosfato dal fitato a partire dal carbonio in posizione 1 o 3 (3-fitasi) sull'anello di inositolo o in posizione 6 (6-fitasi), producendo fosforo inorganico, metalli, e mio-inositolo o gli intermedi fosforilati dell'inositolo.

Le fitasi sono enzimi ampiamente diffusi in natura, sono state infatti identificate in piante, in microrganismi, ed in alcuni tessuti animali come il sangue di uccelli, rettili e pesci (Rapoport et al., 1941) e nell'intestino tenue dei topi (Yang et al., 1991). Tra le fitasi vegetali isolate e caratterizzate vi sono quelle di frumento, grano, riso, avena, orzo, mais, soia, lupini, pomodoro (Nakano et al., 2000; Konietzny et al., 1995; Greiner et al., 1998, 1999, 2000b; Laboure et al., 1993; Hegeman & Grabau 2001; Greiner, 2002; Li et al., 1997).

Tra le fitasi batteriche isolate e caratterizzate ritroviamo ad esempio quelle di *Pseudomonas* sp. (Richardson & Hadobas, 1997), *Bacillus subtilis* (Kerovuo et al., 1998), *B. amyloliquefaciens* (Kim et al., 1998), *B.licheniformis* (Tye et al., 2002), *Klebsiella* sp. (Tambe et al., 1994; Greiner et al., 1997) *Escherichia coli* (Greiner et al., 1993), *Enterobacter* sp. (Yoon et al., 1996), *Selenomonas ruminantium* (Yanke et al., 1998), *Lactobacillus plantarum* (Zamudio et al., 2001), *Citrobacter braaki* (Kim et al., 2003), *Citrobacter amalonaticus* (Luo et al., 2007), *Obesumbacterium proteus* (Zinin et al., 2004), *Yersinia intermedia* (Huang et al., 2006), *Shewanella oneidensis* (Cheng and Lim, 2006); generalmente si tratta di fitasi intracellulari, ad eccezione di quelle di *Bacillus* sp. ed *Enterobacter* sp. che invece sono extracellulari.

Numerosissime sono le fitasi fungine isolate e caratterizzate, generalmente extracellulari, tra cui, ad esempio, quelle appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* (Liu et al., 1998), *Peniophora lycii* (Lassen et al., 2001), *Emericella nidulans* (Wyss et al., 1999b), *Thermomyces lanuginosus* (Berka et al., 1998). Negli ultimi 10-15 anni sono state identificate e caratterizzate anche le fitasi dei lieviti *Schwanniomyces occidentalis* (Segueilha et al., 1992), *Pichia anomala*

(Vohra and Satyanarayana, 2001, 2002), *Arxula adenivorans* (Sano et al., 1999), anch'esse extracellulari.

La NC-IUBMB (“Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology”) in accordo con la IUPAC (“International Union of Pure and Applied Chemistry”), in base al punto in cui inizia l'idrolisi del fitato, classificano le fitasi in 3-fitasi (EC 3.1.3.8) e 6-fitasi (EC 3.1.3.26). Le prime iniziano la defosforilazione del fitato al carbonio in posizione 3 sull'anello di inositolo (Johnson and Tate, 1969), le seconde, invece, iniziano la defosforilazione al carbonio in posizione 6 sull'anello di inositolo (Cosgrove, 1969). La maggior parte delle fitasi microbiche isolate e studiate sono 3-fitasi, con l'eccezione delle fitasi di *E. coli* (Greiner et al., 2000a), *Peniophora lycii* (Lassen et al., 2001) e *Paramecium* (van der Kaay & van Haastert, 1995) che sono 6-fitasi; la maggior parte delle fitasi vegetali sono invece 6-fitasi, con l'eccezione delle fitasi isolate nei semi di soia e di lupino che sono 3-fitasi (Greiner R., 2002).

Dal punto di vista strutturale e del meccanismo catalitico con cui tagliano i gruppi fosfato dell'inositolo, le fitasi vengono inoltre classificate in:

- “Histidine acid phosphatase phytase” (HAP) (Mullaney and Ullah, 2003)
- “ $\beta$  Propeller phytase” (BPP) (Mullaney and Ullah, 2003)
- “Purple acid phosphatase phytase”(PAP) (Mullaney and Ullah, 2003)
- “Cysteine phosphatase phytase” (CPhy) (Chu et al., 2004; Mullaney and Ullah, 2005)



### 1.2.1. “Histidine acid phosphatase phytase” (HAP)

Sono le fitasi più conosciute e più ampiamente studiate e sono state isolate in funghi, batteri, lieviti, piante, animali (Bitar and Reinold, 1972; Ullah and Gibson, 1987; Greiner et al., 1993; Mullaney et al., 2000a). Tutti i membri di questa classe condividono il motivo RHGXRRXP nel sito attivo, il cui residuo di istidina inizia un meccanismo catalitico di idrolisi in due passaggi che porta all'idrolisi del fitato; il motivo HD nella porzione C-terminale coinvolto nella catalisi; dieci residui di cisteina che contribuiscono a formare 5 ponti disolfuro necessari per mantenere la corretta struttura molecolare determinante l'attività enzimatica (Ullah and Mullaney, 1996; Wang et al., 2004).

Indipendentemente dalla loro origine, le fitasi HAP fino ad ora studiate in merito alla via di degradazione dell'acido fitico, rilasciano 5 dei 6 gruppi fosfato ad esso legati, portando ad Inositolo-(2)fosfato come prodotto finale di degradazione (Konietzny and Greiner, 2002). Sono, inoltre, fitasi acide, quindi con attività ottimale a valori di pH acidi.

Le fitasi HAP più studiate sono quelle fungine, e Wyss e collaboratori (1999a,b), paragonandone le proprietà catalitiche, hanno proposto di classificarle in due gruppi in base ai livelli di attività specifica con acido fitico come substrato ed alla capacità di idrolizzare altri substrati: il primo gruppo comprende le fitasi HAP con una ristretta specificità di substrato ed una elevata attività specifica sull'acido fitico, quali le fitasi di *Aspergillus niger*, *A. terreus*; il secondo gruppo comprende le fitasi HAP con ampia specificità di substrato ed una bassa attività specifica sull'acido fitico, quali le fitasi di *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *Myceliophthora thermophila*

La fitasi di *A. niger* NRRL 3135, è una 3-fitasi denominata PhyA (Ullah and Gibson, 1987), appartiene alla prima classe di fitasi HAP ed è la più studiata. È stata la prima fitasi ad essere commercializzata con il nome di Natuphos nel 1991 ed utilizzata come additivo nei mangimi per gli animali monogastrici in modo da risolvere i problemi ambientali e nutrizionali derivanti dalla presenza del fitato nei semi (Lei et al., 2003). Numerosi studi sono stati inoltre condotti sulla sua espressione in piante transgeniche come tabacco (Zhang et al., 2005; George et al., 2005) alfaalfa (Ullah et al., 2002), canola (Ponstein et al., 2002), *Arabidopsis thaliana* (Richardson et al., 2001).

Oltre a Natuphos<sup>®</sup> (DSM Gist- Broacades/BSF) altre fitasi PhyA di origine fungina sono attualmente sul mercato sotto il nome commerciale di Ronozyme<sup>®</sup> P/Bio-Feed<sup>®</sup> Phytase (Novo Nordisk), Finase<sup>®</sup> (AB Enzymes/Röhm Enzyme), Allzyme<sup>™</sup> phytase (Alltech), e derivano rispettivamente da *Peniophora lycii* (6-fitasi), *A. awamori* (3-fitasi) e *A.niger*.

Una seconda fitasi HAP, denominata PhyB, anch'essa isolata da *A. niger* NRRL 3135 (Ullah and Cummins, 1987) è una 3-fitasi appartenente alla seconda classe di fitasi HAP, con una più ampia specificità di substrato ed una minor attività specificità con l'acido fitico come substrato (Wyss et al., 1999a). Rispetto a PhyA ha un pH ottimale di idrolisi del fitato a pH2.5, mentre PhyA possiede due pH ottimali a pH2.5 e a pH5. Inoltre, diversamente da PhyA che è stata isolata da funghi filamentosi, batteri, lieviti e piante, PhyB è stata isolata solo in *A. niger* e in *A .awamori* (Ehrlich et al., 1993; Piddington et al., 1993) e nessuna forma commerciale di questo enzima è attualmente presente sul mercato.

Due fitasi HAP sono state isolate da *E. coli* e denominate rispettivamente AppA e AppA2 (Greiner et al., 1993; Rodriguez et al., 1999a). Queste fitasi mostrano una ristretta specificità di substrato ed una elevata attività specifica con acido fitico come substrato. I geni che le codificano presentano una similarità del 95% e le proteine differiscono tra loro per soli 7 aminoacidi. Queste differenze si traducono in una diversità nel profilo di pH per l'idrolisi del fitato (pH2.5 per AppA e 2.5-3.5 per AppA2), nell'affinità per il substrato acido fitico e nell'attività catalitica (AppA2 presenta una maggior affinità e una maggior attività specifica rispetto ad AppA) (Rodriguez et al., 1999a,b).

Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia di AppA e AppA2 come additivi per aumentare l'utilizzo del fosfato da parte degli animali monogastrici (Stahl et al., 2000; Augspurger et al., 2003, 2007; Onyango et al., 2005; Silversides et al., 2004; Jendza et al., 2005; Veum et al., 2006; Pagano et al., 2007). Rispetto alle fitasi fungine, in particolare AppA2 si è dimostrata essere più efficace nel rilasciare il fosforo dal fitato nella dieta di maiali e polli (Applegate et al., 2003; Augspurger et al., 2003). La migliore prestazione di questa fitasi rispetto alla fitasi fungina PhyA è probabilmente da attribuire al suo pH ottimale molto più acido e ad una maggior resistenza alla proteolisi da parte della pepsina. Golovan e collaboratori (2001) hanno inoltre prodotto topi e maiali transgenici che esprimono la fitasi AppA nelle ghiandole salivari, portando ad una significativa riduzione della quantità di fosforo presente nelle feci. Ultimamente è stato condotto un esperimento sulla espressione di AppA2 in grano, costituente principale della dieta degli animali monogastrici (Nyannor et al., 2007).

L'enzima AppA2 di *E.coli* e sue forme ingegnerizzate per migliorarne la termostabilità sono attualmente presenti sul mercato con il nome commerciale di Phyzyme<sup>TM</sup> (Diversa Corp./Danisco animal Nutrition), Ecophos<sup>TM</sup> (Phytex LLC, Portland, ME), Optiphos<sup>TM</sup>, (Sheridan), Quantum<sup>TM</sup> (Syngenta) ed utilizzate come additivi nei mangimi per polli e maiali.

### 1.2.2. “β-Propeller phytase” (BPP)

Diversamente dalle fitasi HAP, le fitasi “β-propeller” sono una classe di enzimi scoperti solo di recente e con un nuovo meccanismo di idrolisi dell'acido fitico (Kerovuo et al., 2000b). La prima fitasi BPP, denominata PhyC, è stata identificata in *Bacillus subtilis* (Powar et al., 1982) e, successivamente, sono state caratterizzate numerose altre fitasi BPP appartenenti a *Bacillus* sp (Kerovuo et al., 1998; Kim et al., 1998; Choi et al., 2001; Tye et al., 2002). Recentemente, da *Shewanella oneidensis*, è stata isolata la prima fitasi BPP non appartenente a *Bacillus* sp. (Cheng and Lim, 2006), inoltre numerosi geni codificanti putative fitasi BPP sono stati annotati nei genomi batterici sulla base della sequenza nucleotidica e delle sequenze aminoacidiche dedotte.

Le fitasi BPP hanno una struttura simmetrica simile ad un elica a 6 pale (“blade”), in cui ogni pala è composta da un motivo foglietto β antiparallelo; richiedono la presenza di ioni Ca<sup>2+</sup> per la loro stabilità, per l'attività catalitica e come parte del substrato; sono, inoltre, altamente specifiche per l'acido fitico, complessato con il calcio a formare Ca-fitato (Kerovuo et al., 2000a; Ha et al., 2000; Oh et al., 2001, 2006; Shin et al., 2001), ma sono in grado di rimuovere solo 3 dei suoi 6 gruppi fosfato

portando a inositolo-trifosfato come prodotto finale di degradazione (Konietzny and Greiner, 2002). Possiedono 6 siti di legame per il calcio, 3 dei quali, definiti ad alta affinità (“High-affinity binding sites”), sono responsabili della termostabilità dell’enzima, mentre gli altri 3, definiti a bassa affinità (“Low-affinity binding sites”), sono responsabili dell’attività catalitica (Ha et al., 2000). Hanno, inoltre, 2 siti di legame per il fosfato: il “cleavage site”, responsabile dell’idrolisi del substrato, e l’ “affinity site”, che aumenta l’affinità di legame per i substrati, come l’acido fitico, contenenti gruppi fosfato adiacenti (Shin et al., 2001). La struttura a raggi X della fitasi BPP di *B. amyloliquefaciens* (Ha et al., 2000) ha identificato gli specifici residui aminoacidici coinvolti nella conformazione dei 2 siti di legame per il fosfato e dei 6 siti di legame per il calcio, i quali sono conservati in tutte le fitasi BPP (Cheng and Lim, 2006).

Diversamente dalle fitasi acide HAP e PAP (sezione 2.3), che hanno un pH ottimale di attività nell’intervallo di valori 2.5-5.5, le fitasi BPP sono neutro-alcaline ed hanno un pH ottimale di attività nell’intervallo di valori 6-8; posseggono, inoltre, una elevata termostabilità, conferitagli dal legame con gli ioni calcio (Ha et al., 2000).

Nessuna fitasi BPP è a tutt’oggi commercializzata, comunque tutte le loro caratteristiche le rendono ottime candidate per la loro applicazione come additivi nei mangimi per animali monogastrici. L’acido fitico nei semi si trova principalmente complessato con cationi divalenti, in particolare con il  $\text{Ca}^{2+}$ , ed il Ca-fitato è il substrato per le fitasi BPP. Inoltre l’intestino tenue presenta un pH neutro (6.5-7.5), condizione di pH in cui le fitasi BPP possiedono una attività ottimale (Oh et al., 2001). Park e collaboratori (1999), che hanno condotto esperimenti in vitro sul

rilascio del fosforo in mangimi a base di granaglie, hanno dimostrato che una miglior attività enzimatica può essere raggiunta combinando la fitasi di *B. amyloliquefaciens* con quella di *A. niger* poiché, grazie alla diversa efficacia a differenti valori di pH, si ha una miglior efficienza di idrolisi del fitato lungo l'intero tratto gastrointestinale degli animali monogastrici rispetto all'utilizzo di una singola fitasi.

Le fitasi BPP sono, inoltre, ottime candidate per studi in piante transgeniche poiché i valori di pH delle cellule vegetali e degli ambienti in cui crescono le piante sono generalmente vicini alla neutralità. Recentemente è stato dimostrato che una fitasi BPP di *B. subtilis* espressa in tabacco determina una riduzione del contenuto di fitato nei semi ed una miglior crescita della pianta in condizioni limitanti di fosfato (Yip et al., 2003); è stato inoltre dimostrato che la sua secrezione da parte delle radici di tabacco e *Arabidopsis* permette l'assimilazione di fitato esogeno (Lung et al., 2005; Chan et al., 2006), caratteristica molto importante che permetterebbe un miglioramento nella mobilizzazione del fosfato del suolo e, conseguentemente, una riduzione dell'utilizzo dei fertilizzanti da parte degli agricoltori e dei fenomeni di inquinamento da fosforo che ne derivano.

### **1.2.3. “Purple acid phosphatase phytase”(PAP)**

Le “Purple acid phosphatase” sono una classe di metalloenzimi che idrolizzano esteri fosfato in condizioni di pH acido. Negli anni passati sono state ampiamente studiate (Klabunde et al., 1994), e ne sono ben conosciuti sia la struttura tridimensionale che il meccanismo catalitico (Strater et al., 1995; Klabunde et al., 1996).

Le PAP sono fosfomonoesterasi con centri dinucleari Fe(III)-*Me*(II) (dove *Me* può essere Fe, Zn, o Mn) al sito attivo; presentano un'ampia specificità di substrato ed hanno attività ottimale a valori di pH acido. "PAP-like sequences" sono presenti in piante, mammiferi, funghi e batteri (Schenk et al., 2000), ed il confronto di diverse sequenze, di origine sia eucariotica che procariotica, ha delineato 7 residui aminoacidici invarianti contenuti in 5 blocchi di sequenze aminoacidiche conservate; questi 7 residui sono necessari per coordinare il metallo (**D**XG/**G**D**X**Y/**G**NH(D/E)/V**X**X**H**/**G**H**X****H**; le lettere in grassetto rappresentano i residui che legano il metallo) (Li et al 2002).

La maggior parte delle PAP fino ad ora caratterizzate non mostrano attività fitasica (Klabunde et al., 1994), ad eccezione delle fitasi GmPhy, MtPHYI ed NtPAP isolate rispettivamente dalle cotiledoni di soia (Hegeman & Grabau, 2001), di *Medicago truncatula* (Xiao et al., 2005), e dalle radici di *Nicotiana tabacum* (Lung et al., 2007); inoltre è stata recentemente depositata nel database di sequenze (GenBank) di NCBI ("National Center for Biotechnology Information") una putativa fitasi PAP di *Oryza sativa*.

Rispetto alle fitasi HAP e BPP, queste fitasi hanno una attività specifica per l'acido fitico molto più bassa e non esistono, a tutt'oggi, preparazioni commerciali di questi enzimi. È stato proposto che la bassa attività catalitica possa essere vantaggiosa nei semi dove, una lenta e bilanciata scomposizione del fitato durante la germinazione, potrebbe essere efficace.

#### 1.2.4. “Cysteine phosphatase phytase ” (CPhy)

Recentemente una fitasi che non possiede nessuna similarità con le classi di fitasi HAP, BPP e PAP, né dal punto di vista strutturale, né dal punto di vista del meccanismo catalitico, è stata isolata da un batterio del ruminante, *Selenomonas ruminantium* (Yanke et al., 1998). Essa costituisce una nuova classe di fitasi denominata “Cysteine phosphatase phytase” (CP) per la similarità strutturale riscontrata fra una porzione di questa fitasi ed il dominio catalitico tipico della superfamiglia delle “cysteine phosphatase”(Mullaney and Ullah, 2005).

La struttura di questa fitasi consiste di due domini, uno più grande ed uno più piccolo; all'estremità C-terminale, vicino al margine del dominio più grande, vi è una piccola tasca di legame del substrato contenente una struttura a due “loop” simile al sito attivo tipico delle PTPs (“protein tyrosine phosphatases”)(Nam et al., 1999); uno di questi due loop, denominato P-loop, contiene il motivo catalitico HCXXGXXR(T/S) caratteristico delle PTPs (Chu et al., 2004).

La fitasi di *S. ruminantium* è stata caratterizzata (Yanke et al., 1998): il valore ottimale di temperatura per la sua attività varia fra 50 e 55°C; il suo valore ottimale di pH varia tra 4 e 5 a seconda del tampone utilizzato per saggiarne l'attività; è quasi completamente inibita dalla presenza di ioni  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , mentre la presenza di ioni  $\text{Pb}^{2+}$  ne intensifica l'attività; è altamente specifica per il fitato, infatti, ne catalizza la defosforilazione portando ad inositolo-(2)fosfato come prodotto finale di degradazione.

A tutt'oggi non ci sono preparazioni commerciali di questo enzima. Recentemente è stato effettuato uno studio sulla sua espressione in semi di riso durante la germinazione per analizzarne una potenziale



applicazione come additivo nei mangimi degli animali monogastrici (Hong et al., 2004).

### **1.3. Proprietà catalitiche delle fitasi**

In generale, a seconda dell'applicazione cui è destinato, un enzima di interesse commerciale dovrebbe soddisfare una serie di criteri di qualità predefiniti che, nel caso delle fitasi, includono: efficacia nell'idrolizzare il fitato nel tratto digestivo, stabilità durante il processo di pellettizzazione dei mangimi destinati agli animali monogastrici o durante il processamento dei cibi destinati all'alimentazione umana, buona stabilità durante lo stoccaggio, convenienza economica del metodo produttivo (Wyss et al., 1999b; Lei and Stahl, 2001).

La capacità di una fitasi di degradare il fitato nel tratto digestivo è determinata dalle sue proprietà enzimatiche quali affinità elevata per il fitato ed elevata attività specifica, temperatura e pH ottimale, resistenza alla proteolisi.

#### **1.3.1. Specificità di substrato**

Le fitasi microbiche si differenziano abbastanza per quanto riguarda la specificità di substrato. Ad esempio, le fitasi di *A. niger*, *A. terreus*, *E. coli*, *Pseudomonas syringae*, mostrano una elevata specificità per l'acido fitico ed una ristretta specificità di substrato, mentre le fitasi di *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *E. nidulans*, *M. thermophila*, mostrano una bassa specificità per l'acido fitico ed una più ampia specificità di substrato

idrolizzando, oltre al fitato, composti fosforilati quali AMP, ADP, ATP, GMP, GTP, p-nitrofenilfosfato, fruttosio 1,6-difosfato, fruttosio 6-fosfato,  $\alpha$ -glicerolfosfato,  $\beta$ -glicerolfosfato, glucosio 6-fosfato, pirofosfato (Shimizu, 1993; Wyss et al., 1999a; Pasamontes et al., 1997a,b; Konietzny & Greiner, 2002; Cho et al., 2003).

Le fitasi di *Bacillus* sp. sono state descritte come altamente specifiche per l'acido fitico e la loro capacità di idrolizzare altri composti fosforilati è bassa o pressoché nulla (Power and Jagannathan, 1982; Kim et al., 1998; Choi et al., 2001; Gulati et al., 2007). Le fitasi delle piante mostrano generalmente una ampia specificità di substrato ad eccezione di quelle del polline di giglio e tifa che invece sono state descritte come altamente specifiche per il fitato (Baldi et al., 1988; Hara et al., 1985; Konietzny & Greiner, 2002).

La differenza nella specificità di substrato delle varie fitasi si riflette, considerevolmente, in una diversità nella attività specifica sul fitato come substrato, poiché fitasi con ampia specificità di substrato mostrano generalmente una bassa attività specifica sul fitato, mentre fitasi con ristretta specificità di substrato mostrano una elevata attività specifica sul fitato (Wyss et al., 1999a,b).

L'attività specifica è un fattore chiave per lo sfruttamento commerciale di un enzima, poiché ha un impatto sulla economia del suo futuro impiego. L'attività specifica delle fitasi ad oggi caratterizzate, misurata a 37°C e nelle loro condizioni ottimali di pH, varia da <10U/mg (polline di giglio, soia, fagiolo, mais, *Penicillium simplicissimum*) a >1000U/mg (*Citrobacter braakii*, *Candida krusei*, *Peniophora lycii*) (Greiner and Konietzny, 2006). Le fitasi commerciali attualmente utilizzate come

additivo nei mangimi sono piuttosto specifiche per l'acido fitico e possiedono una elevata attività specifica.

I risultati ottenuti da diversi studi condotti sulle fitasi hanno portato a concludere che le fitasi con ampia specificità di substrato sarebbero preferibili, da un punto di vista applicativo, a quelle con ristretta specificità di substrato poiché degradano al meglio l'acido fitico, senza un significativo accumulo di intermedi fosforilati, e portando a mio-inositolo monofosfato come prodotto finale di degradazione; quelle a ristretta specificità di substrato portano, invece, all'accumulo di mio-inositolo tris-fosfato e bis-fosfato durante la degradazione dell'acido fitico suggerendo una minore specificità per gli intermedi fosforilati dell'inositolo (Wyss et al., 1999a). Sfortunatamente, l'ampia specificità di substrato è generalmente associata a un bassa attività specifica per il fitato.

È stato inoltre dimostrato che l'azione idrolitica delle fitasi sul fitato è modulata dalla presenza di ioni metallici che possono inibire o aumentare l'attività di degradazione del fitato. La maggior parte delle fitasi fino ad ora caratterizzate sono fortemente inibite dalla presenza di ioni  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . Le fitasi di *Bacillus* sp. sono, invece, Ca-dipendenti e richiedono la presenza di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  per l'attività catalitica, per la stabilità dell'enzima e come parte del substrato (Oh et al., 2001, 2006).

### **1.3.2. pH e temperatura ottimali**

Fino ad oggi, sono stati isolati due principali tipi di fitasi: quelle acide, con pH ottimale nell'intervallo 4.5-6, e quelle neutro-alcaline con pH ottimale nell'intervallo 6-8. Le fitasi microbiche e vegetali sono

sostanzialmente fitasi acide. Ad esempio la fitasi di *A. niger* ha due pH ottimali a 2.5 e a 5.5 (Ullah & Gibson, 1987), quella di *A. fumigatus* ha un ampio intervallo di attività fra pH4 e pH7.3, con optimum di attività nell'intervallo 5-6 (Wyss et al., 1999a); quella di *E. coli* ha attività ottimale a pH2.5 e pH3.5 (Rodriguez et al., 1999a,b); grano, farro e riso hanno attività ottimale a pH6 (Nakano et al., 2000; Konietzny et al., 1995; Greiner et al., 1998). Le fitasi di *Bacillus* sp. ed alcune fitasi vegetali sono invece fitasi neutro-alcaline, ad esempio quelle di *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. laevolacticus* hanno attività ottimale, rispettivamente, nell'intervallo di pH6-7.5, pH7-8, pH7-10 (Kerovuo et al., 1998; Kim et al., 1998; Choi et al., 2001; Tye et al., 2002; Gulati et al., 2007); le fitasi isolate da semi di legumi, polline di giglio e tifa hanno attività ottimale a pH8 (Scott, 1991; Baldi et al., 1988; Hara et al., 1985). Riguardo alle condizioni di pH del tratto gastrointestinale è importante considerare che il gozzo dei polli ha valori di pH nell'intervallo 5-6.5, lo stomaco ha valori di pH nell'intervallo 2-5, l'intestino tenue ha valori di pH nell'intervallo 6.5-7.5; è quindi utile un assortimento di fitasi diverse poiché diversi possono essere i "target" di applicazione, anche se le fitasi commerciali ad oggi utilizzate come additivo nei mangimi sono fitasi acide, quindi attive ai valori di pH acido dello stomaco.

Per quanto riguarda la stabilità a diversi valori di pH, le fitasi microbiche mostrano una stabilità molto più elevata rispetto alle fitasi vegetali. La stabilità di queste ultime, infatti, decade drasticamente a valori di pH inferiori a pH4 e superiori a pH7.5, mentre la maggior parte delle fitasi microbiche sono piuttosto stabili anche a valori di pH superiori a pH8 ed inferiori a pH3. La fitasi di *E. coli*, ad esempio, non perde attività dopo esposizione a 4°C per 2 ore a pH2 e a pH10 (Greiner et al., 1993).

Le temperature ottimali per l'attività delle fitasi ad oggi caratterizzate variano tra 35 e 77°C. Le fitasi di origine vegetale presentano optimum di temperatura fra 35 e 58 °C, mentre la maggior parte di quelle microbiche presentano optimum di attività a temperature più elevate, nell'intervallo 50-60°C (Konietzny & Greiner, 2002; Vohra and Satyanarayana, 2003; Kim et al., 2003; Huang et al., 2006; Luo et al., 2007; Wang et al., 2007). *Aspergillus terreus*, *Bacillus amyloliquefaciens* DS11, *B. laevolacticus* presentano un optimum di temperatura a 70°C (Wyss et al., 1999a, b; Kim et al., 1998; Gulati et al., 2007); *A. caespitosus* a 80°C (Guimarães et al., 2004), *Arxula adenivorans* a 75°C, *Pichia rhodanensis* e *P. spartinae* nell'intervallo 70-75°C e 75-80°C rispettivamente (Sano et al., 1999; Nakamura et al., 2000), *Schwanniomyces castellii* a 77°C (Segueilha et al., 1992).

Optimum di temperatura relativamente alti precludono la piena attività alle temperature dello stomaco (37-40°C), tuttavia, fitasi con elevati optimum di temperatura sono desiderabili per applicazioni industriali, poiché ne deriva una maggior termostabilità dell'enzima. Il processamento dei mangimi e dei cibi avviene ad elevate temperature, quindi si necessitano enzimi resistenti alla denaturazione ad opera del calore.

### **1.3.3. Resistenza alla proteolisi**

Una fitasi efficiente deve possedere una forte resistenza all'attacco proteolitico da parte delle proteasi presenti lungo il tratto digestivo, quali la pepsina dello stomaco e le proteasi pancreatiche.

Le fitasi microbiche sono generalmente più stabili rispetto a quelle vegetali. Phillipy (1999), ad esempio, ha riportato che la fitasi di frumento è meno resistente all'attacco di pepsina e pancreatina rispetto alla fitasi di *A. niger*. Fitasi fungine e batteriche mostrano una differente sensibilità a pepsina e tripsina ed in particolare quelle batteriche possiedono una più alta resistenza alla degradazione proteolitica rispetto a quelle fungine (Igbasan et al., 2000). La fitasi di *E. coli* è molto resistente all'attacco della pepsina, anche quando questa è presente in concentrazioni molto elevate, mentre quella di *A. niger* è gradualmente inattivata all'aumentare della concentrazione di pepsina; entrambe, inoltre, sono abbastanza resistenti all'attacco delle proteasi pancreatiche (Rodriguez et al., 1999b; Golovan et al., 2000; Simon & Igbasan, 2002). Le fitasi di *Bacillus* sp. sono fortemente resistenti alle proteasi pancreatiche quali tripsina, pancreatina e papaina, ma sono molto suscettibili alla pepsina (Kerovuo et al., 1998).

Dal punto di vista applicativo è importante che una fitasi acida, con attività nell'intervallo di pH acido dello stomaco e del gozzo dei polli, e probabilmente non attiva ai valori di pH neutro-alcino dell'intestino tenue, sia resistente all'attacco della pepsina, mentre una fitasi neutro-alcina, attiva nell'intestino tenue, sia stabile nel sito di azione del tratto digestivo ma anche resistente all'attacco della pepsina durante il passaggio attraverso lo stomaco.

#### **1.3.4. Termostabilità**

La maggior parte dei mangimi destinati all'alimentazione degli animali monogastrici subisce un processo di pellettizzazione, un procedimento

industriale di agglomerazione che trasforma materiali originariamente polverulenti in prodotti granulari di forma sferoidale o cilindrica. Esso comporta l'utilizzo di elevate temperature (65-95°C) per un breve periodo di tempo (da qualche secondo a pochi minuti, a seconda del sistema di raffreddamento utilizzato), pertanto, gli enzimi utilizzati come additivi, o sono termostabili, oppure, per evitare una sostanziale perdita di attività enzimatica durante questo processo, devono essere aggiunti al mangime come formulazioni con stabilizzatori, quali sali e polioli (Lamosa et al., 2000), che proteggono gli enzimi dall'inattivazione ad opera del calore, o in forma liquida dopo il processo di pellettizzazione (Garret et al., 2004). Entrambe queste pratiche implicano costi aggiuntivi alla produzione dei mangimi, in particolare l'aggiunta di enzimi in forma liquida dopo il processo di pellettizzazione comporta l'utilizzo di un equipaggiamento specializzato e costoso di cui non possono disporre molte industrie mangimistiche.

Anche la potenziale applicazione delle fitasi nei cibi destinati all'alimentazione umana richiederebbe fitasi termostabili per resistere alle elevate temperature di alcune tecniche di processamento e di preparazione dei cibi quali, ad esempio, la cottura.

La termostabilità di un enzima dipende dalla sua capacità di resistere alla denaturazione ad opera del calore, come nel caso degli organismi ipertermofili che vivono in ambienti con temperatura  $>70^{\circ}\text{C}$ , e/o dalla sua abilità nel riacquisire la conformazione nativa pienamente attiva a seguito di una esposizione ad elevate temperature. Sfortunatamente, un inconveniente notevole di un enzima termostabile è la sua bassa attività a temperatura ambiente, causata da una grande rigidità ed una ridotta flessibilità della proteina (Lei & Porres, 2003).

Le fitasi ad oggi commercializzate ed utilizzate come additivo nei mangimi per gli animali monogastrici, ad eccezione della fitasi Quantum<sup>TM</sup> di *E. coli*, ingegnerizzata per migliorarne la termostabilità, non mostrano una elevata termostabilità: le fitasi di *A. niger* e *A. awamori*, ad esempio, mantengono solo circa il 40% della loro attività enzimatica dopo l'esposizione a 70° C per 10 minuti (Ullah and Sethumadhavan, 2003).

La ricerca di fitasi più termostabili ha portato all'isolamento e alla caratterizzazione di numerose nuove fitasi di interesse che però non hanno ancora trovato una applicazione commerciale. Tra le fitasi batteriche quelle di *Bacillus* sp., ad esempio, mostrano una elevata termostabilità che in generale si è dimostrata essere Ca-dipendente (Kerovuo et al., 2000a), ad eccezione della fitasi di *B. laevolacticus*, recentemente isolata, che invece è abbastanza termostabile anche in assenza di calcio (Gulati et al., 2007); le fitasi di *Pichia anomala* (Vohra and Satyanarayana, 2002), *Schwanniomyces castelli* (Segueilha et al., 1992) e *Lactobacillus sanfranciscensis* (De Angelis et al., 2003) non mostrano una perdita significativa di attività a seguito di una incubazione per 10 minuti a 70°C, e la fitasi di *P. anomala*, addirittura, può tollerare un trattamento di 30h a 70°C senza alcuna perdita significativa della sua attività; tra le fitasi fungine quella di *A. fumigatus* ha dimostrato di possedere una elevata termostabilità perdendo solo il 10% della sua attività dopo 10 minuti di esposizione a 100°C (Pasamontes et al., 1997a), tuttavia la sua attività specificità per il fitato è troppo bassa per essere sfruttabile da un punto di vista commerciale.

Diversamente dalle fitasi microbiche, le fitasi vegetali non sono molto termostabili, la maggior parte, infatti, perde irreversibilmente attività in



seguito ad esposizione per alcuni minuti a temperature superiori a 70°C (Greiner and Konietzny, 2006).

## **1.4. Biotecnologie delle fitasi**

Mentre la crescente consapevolezza dei problemi ambientali e nutrizionali legati all'acido fitico ha creato la necessità dell'utilizzo delle fitasi, l'impiego delle biotecnologie ha permesso di giungere allo sviluppo della loro applicazione allo stato attuale. Benché la capacità delle fitasi di degradare l'acido fitico sia stata documentata ben più di 30 anni fa (Nelson et al., 1971) l'applicazione commerciale non è stata possibile per molti anni a causa della bassa resa e degli elevati costi di produzione. Con lo sviluppo dei sistemi microbici di espressione eterologa è stata possibile la produzione di elevate quantità di enzima da poter applicare nell'industria dei mangimi a costi relativamente bassi, le tecniche di manipolazione genetica hanno poi permesso il miglioramento delle proprietà catalitiche delle fitasi.

### **1.4.1. Ingegneria delle fitasi**

Benché le proprietà delle fitasi siano varie, non esiste un singolo enzima che sia perfetto o ideale per tutti i “target” di applicazione. In realtà la cosiddetta “fitasi ideale”, che racchiude tutte le proprietà quali efficienza catalitica, resistenza alla proteolisi, termostabilità ed economia di produzione, non potrà mai essere trovata in natura o generata.

Gli approcci utilizzati per lo sviluppo di fitasi efficaci sono due: l'identificazione di nuove fitasi, di origine sia microbica che vegetale, con caratteristiche migliori per la loro applicazione, ed il miglioramento, attraverso la manipolazione genetica, di una o più proprietà delle fitasi già caratterizzate.

Il miglioramento della termostabilità e l'aumento dell'attività specifica delle fitasi sono i punti su cui la ricerca si è focalizzata maggiormente. La mutagenesi sito-specifica, basandosi sulla conoscenza della struttura tridimensionale delle fitasi (Kostrewa et al., 1997; Lim et al., 2000; Xiang et al., 2004), è una delle tecniche utilizzate allo scopo. La sostituzione di un singolo residuo aminoacidico nel sito attivo della fitasi termostabile di *A. fumigatus* ha portato ad un incremento dell'attività specifica di circa 3.5 volte rispetto alla fitasi nativa (Tomschy et al., 2000); una singola sostituzione aminoacidica nel sito attivo della fitasi PhyA di *A. niger* ha portato ad un incremento dell'attività di idrolisi del fitato a pH4 e a pH5, rispettivamente del 56% e 19% rispetto alla fitasi nativa (Mullaney et al., 2002); la sostituzione di sette residui aminoacidici nel sito di legame al substrato della fitasi PhyA di *A. niger* ha portato ad uno spostamento del pH ottimale di PhyA a pH3.8 per meglio adattarlo alle condizioni dello stomaco (Kim et al., 2006a); l'introduzione di tre siti di glicosilazione nella sequenza aminoacidica della fitasi AppA di *E. coli* ha portato al cambiamento della sua temperatura ottimale da 55°C a 65°C in seguito ad espressione dell'enzima in *Pichia pastoris* (Rodriguez et al., 2000b). Mediante un ulteriore approccio di tecnologia GSSM ("Gene Site Saturation Mutagenesis") (Kretz et al., 2004) ne è stata poi ottimizzata la performance in termini di aumentata termostabilità e maggiore stabilità

gastrica (Garrett et al., 2004). Lehmann e collaboratori (2000a,b) hanno utilizzato un “approccio consenso” per aumentare la termostabilità di fitasi fungine. Dopo aver paragonato le sequenze aminoacidiche di 13 fitasi fungine abbastanza termostabili, hanno costruito una fitasi consenso contenente i residui aminoacidici più conservati, ed hanno ottenuto una fitasi con una termostabilità molto più elevata di tutte le altre fitasi fungine utilizzate nell’esperimento, anche se caratterizzata da una bassa attività specifica per il fitato. Successivamente, lo scambio di tutti i residui aminoacidici divergenti presenti nel sito attivo della fitasi consenso, con quelli del sito attivo della fitasi PhyA di *A. niger*, ha portato ad un aumento dell’attività specifica di circa il 50% (Lehmann et al., 2000c). Jermutus e collaboratori (2001) hanno dimostrato che anche la costruzione di fitasi ibride, derivanti da geni ibridi di *Aspergillus* sp., porta ad un moderato miglioramento della termostabilità.

#### **1.4.2. Espressione eterologa delle fitasi in sistemi microbici**

Una fitasi non può essere competitiva sul mercato se non può essere prodotta con elevata resa e purezza e mediante un sistema relativamente poco costoso. A causa della bassa quantità di fitasi che generalmente si ottiene dagli organismi “wild-type” e dagli elevati costi di purificazione dell’enzima prodotto, essi non sempre sono adatti per essere utilizzati come fonte di enzimi di interesse industriale. Sono stati quindi sviluppati diversi sistemi di espressione che utilizzano microrganismi ricombinanti e sono stati valutati diversi ospiti potenziali per l’espressione quali, lieviti, batteri, funghi filamentosi.

Tra i lieviti, buoni livelli di fitasi attive, sia fungine che batteriche, sono stati ottenuti utilizzando *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* e *Pichia pastoris* (Han and Lei., 1999; Han et al., 1999; Wyss et al., 1999a; Rodriguez et al., 1999a, 2000a, 2000b; Chen et al., 2004; Lee et al., 2005; Kim et al., 2006b; Xiong et al., 2006; Zou et al., 2006; Zhao et al., 2007). Le fitasi di *E. coli* attualmente commercializzate sono prodotte in *P. pastoris* e in *Schizosaccharomyces pombe* (Lee et al., 2005; Kaur et al., 2007).

L'utilizzo di sistemi batterici si è rivelato non soddisfacente per la produzione di fitasi fungine, a causa della loro incapacità di apportare la glicosilazione necessaria per l'attività dell'enzima (Phillippy and Mullaney, 1997). Al contrario, la fitasi di *E. coli* è stata espressa ad elevati livelli utilizzando il sistema di espressione *E. coli* (Miksch et al., 2002). La fitasi di *B. subtilis* è stata espressa sia nel sistema *E. coli* che *B. subtilis*, tuttavia l'espressione intracellulare in *E. coli* e l'instabilità del plasmide ricombinante in *B. subtilis* hanno limitato lo sviluppo della sua applicazione commerciale (Kim et al., 1998). Recentemente, invece, un derivato del gene *phyC*, codificante la fitasi di *B. subtilis*, è stato espresso con successo in *P. pastoris* (Zou et al., 2006).

Le fitasi fungine attualmente commercializzate ed utilizzate come additivi nei mangimi sono prodotte da ceppi ricombinanti di funghi filamentosi quali *A. niger*, *Trichoderma reesei*, *A. oryzae* (Simon and Igbasan 2002). Natuphos<sup>®</sup>, Finase<sup>®</sup>, Ronozyme P<sup>®</sup>/Bio-Feed<sup>®</sup> phytase sono fitasi derivate dal processo SmF ("submerged fermentation") di fermentazione sommersa, Allzyme<sup>™</sup> phytase è ottenuta, invece, mediante la tecnologia SSF ("solid state fermentation") di fermentazione in stato solido (Roland et al., 2003). Mentre la tecnologia SmF utilizza

organismi geneticamente manipolati per raggiungere massimi livelli di produzione dell'enzima ed il processo di fermentazione è condotto in liquido, nella tecnologia SSF il processo di fermentazione avviene su un supporto solido, in assenza di acqua, ed utilizza microrganismi non modificati (Hölker et al., 2004).

### **1.4.3. Espressione eterologa delle fitasi in piante transgeniche**

L'utilizzo delle fitasi come additivo nei mangimi per gli animali monogastrici comporta una serie di problemi quali costi associati alla produzione, purificazione e supplemento dell'enzima, inattivazione ad opera del calore durante il processo di pellettizzazione del mangime, perdita di attività durante il deposito.

I costi di produzione, purificazione e supplemento possono essere superati mediante l'espressione eterologa delle fitasi nelle piante. In particolare, la biotecnologia delle piante è stata valutata sia per lo sviluppo di varietà contenenti un sufficiente quantitativo di fitasi nei semi utilizzati come componente per i mangimi, sia per l'utilizzo delle piante coltivate come bioreattori per la produzione commerciale delle fitasi in sostituzione ai sistemi microbici di espressione eterologa .

La fitasi di *A. niger* è stata espressa ad alti livelli nei semi di tabacco (Pen et al., 1993), canola (Ponstein et al., 2002), frumento (Brinch-Pedersen et al., 2000), soia (Denbow et al., 1998), mais (Chen et al., 2007); la fitasi di *A. fumigatus* nei semi di riso (Lucca et al., 2001a,b); la fitasi di *E. coli* è stata espressa nei semi di *Arabidopsis* (Coello et al., 2001) e, insieme alla fitasi di *Selenomonas ruminantium*, nei semi di riso (Hong et al.,

2004); recentemente anche la fitasi di *Schwanniomyces occidentalis* è stata espressa ad alti livelli in riso (Hamada et al., 2006). Da questi studi è emerso che l'utilizzo di semi ad elevato contenuto di fitasi è una valida alternativa al supplemento dei mangimi con fitasi esogene, e che è sufficiente solo una piccola quantità di semi transgenici per assicurare la degradazione dell'acido fitico dei mangimi durante la digestione degli animali monogastrici (Pen et al., 1993; Zhang et al., 2000).

Verwoerd e collaboratori (1995) hanno valutato la possibilità di utilizzare come bioettori le piante coltivate esprimendo la fitasi di *A. niger* nelle foglie di tabacco: essa era accumulata extracellularmente durante la maturazione della pianta fino a costituire circa il 14% delle proteine solubili totali, inoltre, a parte una differenza nel livello di glicosilazione, essa conservava le proprietà della fitasi nativa. Ullah e collaboratori (2002) hanno espresso la fitasi di *A. niger* in alfalfa in modo tale che la maggior parte dell'enzima fosse contenuto nel succo ottenuto dopo il processamento della pianta.

#### **1.4.4. Espressione eterologa delle fitasi in animali transgenici**

L'espressione delle fitasi direttamente in animali transgenici è un ulteriore approccio che è stato esaminato non solo per evitare i costi associati al supplemento di fitasi nei mangimi, ma anche per risolvere il problema di inattivazione delle fitasi durante il processo di pellettizzazione dei mangimi e di perdita di attività durante il deposito. Le fitasi si aggiungono al repertorio di enzimi digestivi normalmente prodotti dagli animali monogastrici che acquisiscono così la capacità di

degradare l'acido fitico. A tal proposito Golovan e collaboratori (2001) hanno creato maiali transgenici in grado di esprimere costitutivamente la fitasi di *E. coli* nelle ghiandole salivari. L'enzima presente nella saliva assicurava la completa digestione del fitato della dieta, riducendo quindi la necessità di aggiungere fosforo inorganico, e la diminuzione dell'emissione di fosforo fecale fino al 75%. Ad ogni modo l'espressione di geni microbici in animali transgenici presenta non pochi problemi, il più importante dei quali è la preoccupazione pubblica riguardo al fatto che proteine "estranee" all'animale transgenico siano deleterie per la salute umana (Ward, 2001). Uno dei dubbi principali consiste nella possibilità che le "nuove" proteine espresse nell'animale transgenico possano avere proprietà allergeniche. È per tale motivo che questi maiali transgenici non sono ancora stati sfruttati da un punto di vista commerciale, nonostante i potenziali benefici finanziari che ne deriverebbero.

Recentemente Cho e collaboratori (2006) hanno proposto di generare polli transgenici in grado di secernere la fitasi nativa MINPP ("multiple inositol polyphosphate phosphatase") direttamente nel tratto digestivo. Essendo questa una fitasi endogena ai polli, tale approccio genetico potrebbe essere tollerato da chi crede che sia rischioso utilizzare geni "estranei" all'organismo.

## **1.5. Applicazioni delle fitasi**

Sono due le principali aree in cui le fitasi possono essere applicate: la prima riguarda l'industria alimentare, sia animale che umana, in modo da

risolvere i problemi nutrizionali ed ambientali legati alla presenza dell'acido fitico nei semi ad uso alimentare; la seconda riguarda la preparazione di intermedi fosforilati dell'inositolo da utilizzare in studi biochimici. Inoltre, in aggiunta a queste due principali aree di applicazione, si contano i potenziali usi in acquicoltura e come ammendante per il suolo (Mullaney et al., 2000b; Lei and Stahl, 2001; Vohra and Satyanarayana, 2003; Lei & Porres, 2003; Haefner et al., 2005).

### **1.5.1. Applicazione delle fitasi nel campo della nutrizione animale**

L'incapacità da parte degli animali monogastrici di utilizzare la molecola del fitato come fonte di fosfato ha tradizionalmente portato gli allevatori ad implementarne la dieta con fosforo inorganico, un minerale costoso e non rinnovabile.

Il crescente interesse pubblico riguardo all'impatto ambientale di alti livelli di fosforo, nella forma sia di acido fitico che di fosforo inorganico, presenti nelle deiezioni fecali animali utilizzate come concime per i suoli agricoli, hanno portato allo sviluppo biotecnologico delle fitasi ed al loro utilizzo nel campo della nutrizione animale.

Numerose ricerche di laboratorio ed applicazioni dirette nel settore hanno dimostrato che circa 500-1000 unità di enzima fitasi possono sostituire approssimativamente l'aggiunta di 1g di fosforo inorganico ai mangimi e ridurre la escrezione di fosforo totale di circa il 20-50% (Kemmer et al., 1997a,b; Lei et al., 1993; Harper et al., 1997; Yi et al., 1996a,b; Han et al., 1998). Il beneficio ottenuto dall'applicazione delle fitasi nei mangimi



è, dunque, duplice: da un lato permette di evitare l'utilizzo di una risorsa costosa e non rinnovabile quale è il fosforo inorganico, dall'altro permette la protezione dell'ambiente dall'inquinamento da fosforo.

L'aggiunta di fitasi alla dieta degli animali monogastrici, inoltre, non solo permette di migliorarne la disponibilità del fosforo, ma anche quella di minerali, aminoacidi ed energia. La molecola del fitato, ed in generale i nutrienti da esso legati, non possono essere assorbiti nel tratto digestivo senza la previa degradazione enzimatica ad opera delle fitasi che, generalmente, può avvenire nel tratto digestivo e/o nel mangime prima del consumo. Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia dell'utilizzo delle fitasi in termini di aumento della disponibilità di calcio (Schoener and Hoppe, 2002; Veum et al., 2006), magnesio (Brink et al., 1991), e di molti elementi in tracce quali zinco (Yi et al., 1996c) rame (Adeola, 1999), ferro (Pallauf et al., 1999); in termini di miglioramento della digeribilità delle proteine (Yi et al., 1996d; Braña et al., 2006; Cowieson et al., 2006a; Kies et al., 2006); in termini di aumento dell'utilizzo di energia (Cowieson et al., 2006b).

Ad oggi le fitasi sono utilizzate principalmente come additivo nella dieta di maiali e polli e in alcuni casi anche nella dieta dei pesci. La prima fitasi ad essere commercializzata nel 1991 è stata PhyA di *A. niger* con il nome di Natuphos (Gist Brocades-Basf) (Simon and Igbasan, 2002; Misset, 2003). Si tratta di una 3-fitasi prodotta da un ceppo ricombinante di *A. niger*: molteplici copie del gene *phyA* sono state clonate ed espresse nell'ospite portando ad elevati livelli di fitasi prodotta extracellularmente. Successivamente altre fitasi, prodotte da diverse compagnie, sono apparse sul mercato: Finase<sup>®</sup> (AB Enzymes/Röhm Enzyme) è una 3-fitasi derivante da *A. awamori* e prodotta da *Trichoderma reesei*; Ronozyme<sup>®</sup>

P/Bio-Feed<sup>®</sup> phytase (Novo Nordisk) è una 6-fitasi derivante da *Peniophora lycii* e prodotta da *A. oryzae* (Haefner et al., 2005); Allzyme<sup>™</sup> phytase (Alltech) è una 3-fitasi derivante e prodotta da *A. niger*. Le fitasi commerciali derivanti dal gene *appA2* di *E. coli* sono Phyzyme<sup>™</sup> (Diversa Corp./Danisco animal Nutrition), Ecophos<sup>™</sup> (Phytex LLC, Portland, ME), Optiphos<sup>™</sup> (Sheridan) e Quantum<sup>™</sup> (Syngenta); tutte sono prodotte mediante sistemi di espressione in lievito. In particolare la fitasi Quantum deriva da modificazioni del gene *appA2* di *E. coli*, apportate per migliorarne la termostabilità e la resistenza alla proteolisi (Syngenta animal nutrition 2007).

### **1.5.2. Applicazione delle fitasi nel campo della nutrizione umana**

Le fitasi posseggono un grande potenziale applicativo nel campo della nutrizione umana, tuttavia, fino ad ora, nessuna fitasi è stata commercializzata a questo scopo. L'interesse dell'industria alimentare per le fitasi riguarda da una lato la possibilità di migliorare la bio-disponibilità dei minerali, riducendo il contenuto di acido fitico, in quelle diete basate sul consumo di prodotti alimentari a base di cereali e legumi, dall'altro lato la possibilità di produrre cibi con valore aggiunto.

Si stima che più di due miliardi di persone, specialmente vegetariani, donne in età fertile e bambini dei paesi in via di sviluppo, soffrano di carenze da ferro e zinco. Tali deficienze sono principalmente causate da un basso contenuto di questi minerali nei cibi comunemente utilizzati, da una mancanza di verdure e carne nella dieta, e dall'ingestione di elevati livelli di fitato mediante il consumo di prodotti alimentari a base di

cereali e legumi (Tatala et al., 1998). Una efficiente idrolisi del fitato presente nelle matrici alimentari di origine vegetale può essere ottenuta durante il processamento dei cibi sia ottimizzando l'attività delle fitasi vegetali native mediante tecniche di processamento quali "soaking" (idratazione), germinazione, fermentazione, sia aggiungendo preparazioni di fitasi microbiche (Li et al., 1997). Questa seconda opzione sembra essere la più efficiente per ridurre i livelli del fitato presente nei cibi. Sandberg e collaboratori (1996) hanno dimostrato l'efficacia della fitasi di *A. niger* nel degradare il fitato presente nella farina di frumento e nell'aumentare l'assorbimento di ferro da parte dell'uomo; Hurrell e collaboratori (2003) hanno dimostrato l'efficacia delle fitasi nel degradare l'acido fitico durante la lavorazione dei cibi complementari basati su farina di riso, frumento, mais, sorgo, avena; Haros e collaboratori (2001) hanno documentato l'efficacia dell'utilizzo delle fitasi nel processo di fabbricazione del pane.

Il concetto di piante ad elevato contenuto di fitasi è importante anche per quanto concerne il potenziale applicativo delle fitasi nella nutrizione umana. Infatti, per aumentare l'attività di degradazione del fitato durante il processamento dei cibi, l'incorporazione di piante ad elevato contenuto di attività fitasica nel materiale di origine vegetale non ancora processato è visto come una valida alternativa all'aggiunta di fitasi esogene (Greiner and Konietzny, 2006). La degradazione del fitato può avvenire non solo durante il processamento dei cibi, ma anche nel tratto gastrointestinale umano. In generale l'attività delle fitasi native non è sufficientemente elevata da poter idrolizzare il fitato della dieta durante il passaggio attraverso lo stomaco, mentre l'aggiunta di preparazioni di fitasi ai cibi ed anche lo sviluppo di piante transgeniche con elevati livelli di fitasi

nelle parti commestibili potrebbe portare ad una maggiore degradazione del fitato nello stomaco dell'uomo (Greiner and Konietzny, 2006). Queste fitasi, però, devono essere termostabili poiché il processamento e la preparazione dei cibi implicano l'esposizione ad elevate temperature. È stato dimostrato che alcuni inositol fosfati hanno effetti benefici sulla salute umana, riducendo il rischio di disturbi di cuore (Potter et al., 1995), della formazione di calcoli renali (Ohkawa et al., 1984) e di alcuni tipi di cancro (Vucenik et al., 2003). Indipendentemente dalla loro origine microbica o vegetale, le fitasi acide fino ad ora caratterizzate in merito al "pathway" degradativo del fitato, sono in grado di rilasciare 5 dei suoi 6 gruppi fosfato, portando a mio-inositolo monofosfato come prodotto finale di degradazione, mentre le fitasi alcaline portano a mio-inositolo trifosfato. Il numero e la posizione dei gruppi fosfato sull'anello dell'inositolo sono molto importanti per quanto riguarda il ruolo fisiologico che gli inositol fosfati possono svolgere. A seconda della fitasi utilizzata, possono essere rilasciati dal fitato differenti intermedi fosforilati dell'inositolo, pertanto le fitasi possono essere utili per la produzione di cibi con un regolato contenuto e una data composizione di mio-inositol fosfati con effetti benefici per la salute umana.

### **1.5.3. Applicazione delle fitasi nella sintesi di inositol fosfati**

Gli esteri del mio-inositolo (mono-, bis-, tris- e tetra-fosfati) giocano un ruolo importante nel processo di trasduzione del segnale transmembrana e nella mobilizzazione del calcio dalle riserve intracellulari dei tessuti sia animali che vegetali (Dasgupta et al., 1996), inoltre, alcuni inositol fosfati, posseggono effetti benefici sulla salute umana. Il numero e la

posizione dei gruppi fosfato sull'anello di mio-inositolo è di grande importanza per la loro funzione fisiologica.

L'interesse scientifico verso questa area di ricerca ha promosso la necessità di diverse preparazioni di inositol fosfati. Mentre la sintesi chimica è abbastanza difficile, al contrario la sintesi enzimatica offre il vantaggio di una elevata stereospecificità e di migliori condizioni di reazione (Vohra and Satyanarayana, 2003; Haefner et al., 2005). L'idrolisi sequenziale del mio-inositolo esafosfato ad opera delle fitasi rilascia diversi intermedi fosforilati dell'inositolo che sono utili per lo studio del loro effetto fisiologico. È stato dimostrato che l'uso delle fitasi microbiche è efficace nella preparazione di diversi inositol fosfati utilizzando l'acido fitico come substrato (Greiner and Konietzny, 1996; Dvorakova et al., 2000).

#### **1.5.4. Applicazione delle fitasi in acquicoltura**

I mangimi utilizzati in acquicoltura sono abbastanza costosi poiché sono composti principalmente di farina di pesce e olio di pesce. Il costo dei mangimi costituisce circa il 70% dei totali costi di produzione del pesce (Rumsey, 1993), per questo motivo la ricerca nel campo della nutrizione ittica, negli ultimi anni, sembra essersi focalizzata sulla sostituzione delle proteine di origine animale con le meno costose proteine di origine vegetale. Da questi studi è emerso che, a causa della presenza di fattori antinutrizionali quali l'acido fitico, i pesci non sono in grado di trarre il massimo nutrimento dalla materia vegetale rispetto ad una dieta basata su proteine di origine animale (Ofojekwu and Kigbu, 2002). Come i polli e i maiali, anche i pesci, mancano nel loro tratto digestivo delle fitasi, quindi

non sono in grado di degradare il fitato, che viene quindi escreto nell'ambiente acquoso. L'utilizzo delle fitasi in acquicoltura è stato valutato come un mezzo sia per mantenere il livello di fosforo nell'ambiente acquoso in limiti accettabili, sia per aumentare l'utilizzo di proteine di origine vegetale nella dieta dei pesci e ridurre i costi di produzione del mangime. Numerosi studi hanno documentato il potenziale applicativo delle fitasi microbiche nella dieta dei pesci basata sull'utilizzo di proteine di origine vegetale, migliorando l'utilizzo dei nutrienti e quindi la crescita del pesce stesso ed il profitto dell'acquicoltura (Gabriel et al., 2007).

A causa delle più elevate temperature necessarie per la pellettizzazione dei mangimi destinati ai pesci e della diversa struttura e fisiologia del sistema digestivo delle varie specie di pesce, rispetto a quella dei polli e maiali, le fitasi tutt'oggi commercializzate non soddisfano al meglio le condizioni ideali per l'applicazione in acquicoltura (Mullaney et al., 2000b; Vohra and Satyanarayana, 2003). Lo sviluppo di specifici tipi di fitasi microbiche meglio adatte alle condizioni dello stomaco dei pesci sarà dunque di crescente interesse. Ad esempio le fitasi di *Bacillus* sp., molto termostabili e con valori ottimali di pH nell'intervallo 6-8, sembrano adatte alle condizioni di pH neutro del tratto digestivo delle trote e ciprinidi (Zou et al., 2006).

### **1.5.5. Applicazione delle fitasi come ammendante per il suolo**

Il fosforo è un nutriente essenziale, ma spesso limitante, per la crescita e lo sviluppo delle piante. Grandi quantità di fertilizzante vengono

impiegate ogni anno nelle aree coltivabili, ma solo il 10%-20% del fosforo applicato è prontamente utilizzabile dalle piante (Holford, 1997), mentre la maggior parte viene immobilizzata nel suolo in forma sia organica che inorganica e non viene assorbito dalle radici (Richardson et al., 2001).

Il fosforo organico costituisce il 20-80% del fosforo totale presente nello strato superficiale del suolo, e può contribuire al nutrimento delle piante solo dopo il processo di mineralizzazione. Il fitato rappresenta la principale forma organica del fosforo nel suolo, costituendone fino al 60%, ma è scarsamente utilizzato dalle piante (Mudge et al., 2003).

L'ampio utilizzo di fosfato come fertilizzante non solo è molto costoso, ma anche potenzialmente inquinante e non sostenibile (Abelson, 1999). Inoltre, secondo recenti stime, le risorse mondiali di fosfato inorganico potrebbero essere esaurite entro il 2050 (Vance et al., 2003).

L'incapacità delle piante di utilizzare il fitato nel suolo è associata alla mancanza, nelle radici, di una fitasi extracellulare che possa degradarlo. Le fitasi sono state identificate nelle radici di diverse piante, ma l'attività di questi enzimi è inadeguata per una effettiva utilizzazione del fitato presente nel suolo (Hübel and Beck, 1996; Richardson et al., 2000). Le tecniche di ingegneria genetica potrebbero essere indirizzate alla produzione di piante transgeniche che producono fitasi nelle radici, in modo da migliorarne la capacità di "uptake" del fosforo organico del suolo. È stato dimostrato che l'espressione transgenica della fitasi di *A. niger* (Richardson et al., 2001; Mudge et al., 2003) e della fitasi di *M. truncatula* (Xiao et al., 2005) nelle radici di *Arabidopsis* porta ad un significativo miglioramento della capacità di utilizzo del fosforo organico

e della crescita della pianta in presenza di fitato come unica fonte di fosfato.

Un miglioramento della capacità di “uptake” del fosforo da parte delle piante sarebbe quindi molto vantaggioso per l’agricoltura, riducendo l’utilizzo di fertilizzanti ed il negativo impatto che questi hanno sull’ambiente. Inoltre, l’approccio transgenico, potrebbe anche essere utilizzato per risolvere il problema dell’accumulo di fosforo nei suoli agricoli, legato alla presenza di elevati livelli di fosforo nei concimi, utilizzando le piante transgeniche per rimuoverne l’eccesso.

Il potenziale della produzione delle fitasi nelle radici delle piante è stato riconosciuto solo negli ultimi anni, ad ogni modo la fattibilità di questo approccio transgenico dipende dall’accettazione pubblica degli organismi geneticamente modificati.

## **1.6. Piante a ridotto contenuto di acido fitico nei semi**

La produzione di piante transgeniche a basso contenuto di acido fitico nei semi è una ulteriore strategia analizzata per risolvere i problemi ambientali e nutrizionali legati alla presenza dell’acido fitico nei semi utilizzati per la alimentazione sia animale che umana.

A partire dai primi anni 90 diversi mutanti *lpa* (“low phytic acid”) a ridotto contenuto di acido fitico, poiché deficienti nella sua biosintesi, sono stati isolati in mais, orzo, soia, riso, frumento e *Arabidopsis* (Raboy and Gerbasi, 1996; Pilu et al., 2003; Raboy, 2007). Normalmente, nei semi “wild-type”, l’acido fitico rappresenta circa il 75% del fosforo totale



presente, mentre il fosforo inorganico rappresenta circa il 5%; i mutanti *lpa* isolati, invece, sono caratterizzati da una riduzione dei livelli di acido fitico del 50-95% e da un aumento del fosforo inorganico in modo da mantenere inalterati i livelli totali di fosforo del seme (Raboy, 2007). I risultati accumulati fino ad ora in letteratura indicano che la massima riduzione nei livelli di acido fitico compatibile con la sopravvivenza e la germinazione del seme, sembra essere del 55-65% per il mais, 70% per l'orzo e 45% per il riso (Raboy, 2001). Inoltre, numerosi studi condotti sulla nutrizione di maiali, polli e pesci alimentati con mais e orzo *lpa* hanno dimostrato che questi animali assorbono maggior quantità di fosforo rispetto alla controparte alimentata con mais e orzo "wild-type", riducendo così la necessità di supplementare la dieta con fosforo inorganico o con fitasi ed anche la quantità di fosforo escreto (Ertl et al., 1998; Spencer et al., 2000). Studi condotti sulla nutrizione umana hanno dimostrato che l'assorbimento di ferro e zinco e calcio è significativamente più elevata in quei soggetti alimentati con pasti preparati con mais *lpa* piuttosto che con mais "wild-type" (Mendoza et al., 1998; Raboy, 2001).

Una delle difficoltà riscontrate con questa strategia consiste nel fatto che la sistematica riduzione di acido fitico ha solitamente effetti negativi sulle performance del seme e della pianta quali, ad esempio, germinazione compromessa, tolleranza agli stress, formazione del seme.

## 2. SCOPO DELLA RICERCA

I problemi ambientali e nutrizionali legati alla presenza dell'acido fitico nei semi destinati all'alimentazione sia animale che umana hanno suscitato un forte interesse, da parte della comunità scientifica e degli imprenditori, per gli enzimi in grado di degradare l'acido fitico, ovvero le fitasi, spingendo i ricercatori all'isolamento ed alla caratterizzazione di numerose fitasi di origine sia microbica che vegetale.

Le fitasi attualmente commercializzate sono di origine microbica e sono utilizzate come additivo nei mangimi di maiali, polli, ed in alcuni casi anche dei pesci. Diverse sono le potenziali applicazioni delle fitasi, tuttavia le caratteristiche delle fitasi ad oggi commercializzate non sono ottimali per estenderne l'uso anche agli altri possibili campi di applicazione. Benché le proprietà delle fitasi siano varie, non esiste un singolo enzima che sia perfetto o ideale per tutti i "target" di applicazione. La cosiddetta "fitasi ideale", che racchiude tutte le proprietà ottimali da un punto di vista applicativo, quali efficienza catalitica, resistenza alla proteolisi, termostabilità ed economia di produzione, non potrà mai essere trovata in natura o generata.

Gli approcci che la ricerca può utilizzare per lo sviluppo di fitasi efficaci sono due: l'identificazione di nuove fitasi, sia microbiche che vegetali, con caratteristiche ottimali per un determinato target di applicazione, ed il miglioramento, mediante la manipolazione genetica, di una o più proprietà delle fitasi già caratterizzate.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato l'isolamento di nuovi batteri produttori di fitasi e la caratterizzazione della loro attività fitasica.

L'isolamento di nuovi batteri produttori di fitasi ha previsto l'utilizzo di due approcci: un approccio classico ed un approccio computazionale. Il primo è basato sull'utilizzo del test di Bae (Bae et al., 1999), un saggio colorimetrico che permette di verificare visivamente, direttamente in piastra Petri, la presenza dell'attività degradativa sul fitato ad opera delle colonie batteriche che sono state seminate in terreno minimo con fitato come unica fonte di fosfato. In questo lavoro di tesi, le colonie batteriche saggiate con questo test sono state isolate dalle vasche di ossidazione del depuratore a fanghi attivi situato a Roncocesi (Reggio Emilia), il quale riceve gli scarichi di numerosi allevamenti suinicoli, quindi si presuppone sia ricco di fitato e di batteri in grado di degradarlo. Il secondo approccio è basato, invece, sull'analisi del "database" di genomi microbici sequenziati disponibile in NCBI ("National Center for Biotechnology Information", <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), alla ricerca di geni codificanti ipotetiche fitasi, così annotati in base ad omologia di sequenza con altre fitasi conosciute e, pertanto, non ancora caratterizzati. Si è scelto di caratterizzare la fitasi del batterio gram-negativo *Spingomonas wittichii* RW1, un  $\alpha$ -proteobatterio ben conosciuto nel campo della biorimediazione per la sua eccezionale capacità di mineralizzare dibenzofurano e dibenzo-p-diossina (Halden et al., 1999) e di biotrasformare derivati mono- e di-clorurati (Hong et al., 2002), la cui fitasi, però, che dai dati bioinformatici sembra essere di tipo  $\beta$ -propeller, non è stata mai caratterizzata.

La preliminare caratterizzazione dell'attività fitasica, in termini di optimum di temperatura e optimum di pH, dei ceppi isolati con entrambi gli approcci, ha previsto l'utilizzo di un saggio di quantificazione dell'attività fitasica (Kim and Lei, 2005; Han et al., 1999), che è stato

eseguito sia sugli estratti cellulari grezzi, che sulle frazioni proteiche ottenute mediante frazionamento dell'estratto con solfato di ammonio e successiva dialisi delle frazioni ottenute.

Per il ceppo produttore di fitasi isolato mediante l'approccio classico, si è proceduto all'identificazione attraverso il parziale sequenziamento del 16S rDNA e l'utilizzo della analisi BLAST-N per la ricerca di similarità con le sequenze di 16S rDNA depositate nel "database" di NCBI.

Per *Spingomonas wittichii* RW1, si è proseguito, invece, all'amplificazione del gene codificante la fitasi, ed al suo clonaggio ed espressione in *E. coli* (BL21DE3). La proteina ottenuta, fusa ad un "tag" di istidina all'estremità N-terminale, è stata poi purificata, e ne è stata determinata e caratterizzata l'attività fitasica, in termini di optimum di temperatura e optimum di pH, dipendenza dalla presenza di ioni minerali (calcio, magnesio, manganese, litio, zinco, ferro), termostabilità, specificità di substrato, stabilità, resistenza alla proteolisi da parte di tripsina e pepsina.

## 3. MATERIALE E METODI

### 3.1. CEPPI BATTERICI UTILIZZATI

#### *Escherichia coli*:

- ✓ ceppo JM109 (*endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), *relA1*, *supE44*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), [F' *traD36*, *proAB*, *laqI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15]) (“JM109 High Efficiency Competent Cells”, Promega)
- ✓ ceppo BL21 (DE3) (*ompT*, *hsdS $\beta$* ( $r_\beta$ - $m_\beta$ -), *dcm*, *gal*, (DE3) *tonA*)

*Sphingomonas wittichii* RW1, acquistato presso DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

**Ceppo 52**, appartenente al genere *Aeromonas*, isolato in questo lavoro di tesi, da un campione ambientale prelevato dalle vasche di ossidazione del depuratore a fanghi attivi di Roncoesi (Reggio Emilia).

### 3.2. TERRENI UTILIZZATI E CONDIZIONI DI CRESCITA

- ✓ *E. coli* è stato fatto crescere in terreno LB liquido o solidificato con l'aggiunta di agar batteriologico (15 g/l). Per la selezione genetica è stata aggiunta kanamicina (30  $\mu$ g/ml) o ampicillina

(100 µg/ml). La crescita è avvenuta in condizioni di aerazione a 37°C.

**Terreno Luria-Bertani (LB):**

NaCl	10 g/l
Tryptone	10 g/l
Estratto di lievito	5 g/l
Acqua bidistillata	A volume di 1 L

Sterilizzare in autoclave per 20 minuti a 121°C

- ✓ *Sphingomonas wittichii* RW1 è stato fatto crescere in terreno M1 liquido, in condizioni di aerazione a 30°C.

**Terreno M1**

Estratto di carne	3,0 g/l
Peptone	5,0 g/l
Acqua bidistillata	A volume di 1L

Aggiustare il pH a 7 e sterilizzare in autoclave per 20 minuti a 121°C

- ✓ Il ceppo 52 è stato fatto crescere in terreno PCA, in terreno CM liquido e in terreno MPSM solidificato con l'aggiunta di agar batteriologico (15 g/l). La crescita è avvenuta in condizioni di aerazione a 30°C.

**Terreno “Plate Count Agar” (PCA)**

Peptone (caseina)	5 g/l
Estratto di lievito	2,5 g/l
D(+)-glucosio	1 g/l
Agar-agar	14 g/l
Acqua bidistillata	A volume di 1L

Sterilizzare in autoclave per 20 minuti a 121°C

**Terreno Casamino (CM) (Jareonkitmongkol et al., 1996)**

Glucosio	5 g/l
NaCl	5 g/l
Peptone	10 g/l
Estratto di lievito	10 g/l
Acqua bidistillata	A volume di 1L

Aggiustare il pH a 7 e sterilizzare in autoclave per 20 minuti a 121°C

**Terreno “Modified Phytase Specific Medium” (MPSM) (Chen, 1998)**

(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	1 g/l
Urea	1 g/l
Acido citrico	3 g/l
Citrato di sodio	2 g/l
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1 g/l
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,1 g/l
Tiamina HCl	0,02 g/l
Na-fitato	3 g/l
Tris-HCl pH8 1M	100 ml
Glucosio	10 g/l
Agar	15 g/l
Acqua bidistillata	A volume di 1L

Sterilizzare il Na-fitato per filtrazione (Millex-HA, 45 µm) e aggiungerlo al terreno dopo che questo è stato sterilizzato in autoclave per 20 minuti a 121°C



### **3.3. ISOLAMENTO DEL CEPPO 52 E SAGGIO DI BAE (Bae et al., 1999) PER VERIFICARE LA CAPACITÀ DI DEGRADARE IL FITATO**

#### ***3.3.1. Isolamento del ceppo 52***

Il campione ambientale prelevato dalle vasche di ossidazione del depuratore a fanghi attivi di Roncofesi (Reggio Emilia), è stato diluito in soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) di un fattore 10X e 100X, e 100µl di ciascuna diluizione sono stati seminati su piastre di terreno PCA contenente l'antibiotico cicloesimide (50 µg/ml), per impedire la crescita di colonie fungine. Le colonie batteriche isolate sono state poi selezionate in base alla capacità di crescere, a 30°C, su piastre di terreno minerale MPSM con fitato 0,3% come unica fonte di fosfato.

#### ***3.3.2. Saggio di Bae***

##### *Soluzione colorante*

Soluzione acquosa di Cobalto cloruro 2%

##### *Soluzione di contrasto*

Rapporto 1:1 (v/v) di una soluzione acquosa di ammonio molibdato 6,25% e di una soluzione acquosa di ammonio vanadato 0,42%, preparata al momento

Le colonie batteriche isolate e selezionate come descritto nella sezione 3.3.1. sono state fatte crescere in piastre di terreno minerale MPSM con fitato 0,3% come unica fonte di fosfato, per 4-5 giorni a 30°C, dopodichè sono state rimosse dalla superficie del terreno avvalendosi di un'ansa. La

piastra è stata quindi immersa nella *Soluzione colorante* lasciandola in agitazione per 5 minuti a temperatura ambiente. Il cobalto si complessa con il fitato presente nel terreno, facendo assumere alla piastra una colorazione rosa opaco, mentre le zone in cui il fitato è stato degradato dalle colonie batteriche rimangono incolori e visibili come un alone trasparente. Per evidenziare maggiormente il contrasto fra zone opache ed alone trasparente, la piastra è stata immersa per 5-10 minuti nella *Soluzione di contrasto*. La colorazione assunta dalle zone della piastra in cui il fitato non è stato degradato passa dal rosa opaco al giallo opaco, mentre le zone in cui il fitato è stato degradato rimangono visibili come un alone trasparente.

### **3.4. IDENTIFICAZIONE DEL CEPPLO 52**

#### ***3.4.1. Estrazione del DNA genomico e determinazione qualitativa e quantitativa del DNA estratto***

Il DNA genomico del ceppo 52 è stato estratto seguendo le istruzioni del kit di estrazione *FastDNA® SPIN Kit* ed utilizzando lo strumento *FastPrep® FP120* (Qbiogene, Inc., CA). La qualità e la quantità del DNA genomico estratto sono state determinate confrontando il DNA di interesse con i marcatori di peso molecolare a concentrazione nota  $\lambda$ /*HindIII* (Amersham-Pharmacia) e *1Kb Marker* (Amersham-Pharmacia), in seguito ad elettroforesi su gel di agarosio 0,8% (Sigma), preparato in tampone TAE 1X (TRIS-acetato 40 mM, EDTA 1 mM), con bromuro di etidio (0,5 µg/ml). L'elettroforesi su gel d'agarosio è stata condotta a 0,5-5 Volt/cm nel tampone TAE 1X per 45-60 min. La

visualizzazione e la quantificazione del DNA su gel è stata eseguita con lo strumento *UV Gel Doc 2000 Image Detector* ed il relativo Software di analisi *Quantity One<sup>TM</sup>* (Bio-Rad Laboratories Inc.). Una ulteriore determinazione quantitativa del DNA genomico estratto è stata effettuata misurando l'assorbanza a 260 nm attraverso lo spettrofotometro *Biophotometer* (Eppendorf).

#### **3.4.2. Amplificazione del rDNA 16S del ceppo 52 mediante PCR (“Polymerase Chain Reaction”)**

Il gene che codifica il rDNA 16S del ceppo 52 è stato amplificato mediante la tecnica PCR, avvalendosi della coppia di oligonucleotidi universali 27F e 1492R (tabella 2) e della *Taq* DNA polimerasi della casa Fisher Bioreagents\*.

<b>27F</b>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
<b>1492R</b>	ACGGCTACCTTGTTACGACTT

**Tabella 2: sequenza degli oligonucleotidi universali 27F e 1492R (Lane, 1991).**

La reazione di amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 50 µl, utilizzando 1-10 ng di DNA genomico, 2U di *Taq* DNA polimerasi, PCR Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, oligonucleotidi universali 0,8 µM.

L'amplificazione è stata condotta nel termociclatore *Genius* (Techne) seguendo il seguente protocollo:

96°C	5 minuti	1 ciclo
95°C	1 minuto	} 35 cicli
56°C	1 minuto	
72°C	1 minuto e 30 secondi	
72°C	8 minuti	1 ciclo
4°C	“hold”	

5 µl di ogni reazione di PCR sono stati controllati tramite elettroforesi su gel di agarosio (sezione 3.4.1.). Il prodotto di PCR (~1500 bp) è stato purificato seguendo le istruzioni del kit di purificazione *GFX<sup>TM</sup>* (Amersham Biosciences), adatto alla purificazione di prodotti di PCR e bande estratte da gel di agarosio. L'elettroforesi su gel di agarosio e la determinazione qualitativa e quantitativa del DNA purificato sono state eseguite come descritto nella sezione 3.4.1.

### ***3.4.3. Parziale sequenziamento del rDNA 16S ed identificazione del ceppo 52***

Il sequenziamento delle estremità 5' e 3' del rDNA 16S del ceppo 52, avvalendosi, rispettivamente, degli oligonucleotidi universali 27F e 1492R (tabella 2), è stato eseguito utilizzando il sistema *CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit* (Beckman Coulter).

La reazione di sequenziamento è stata preparata aggiungendo, nell'ordine in cui sono riportati, i seguenti reagenti: H<sub>2</sub>O a volume finale di 20 µl, 50 fmol di DNA da sequenziare (come indicato nel protocollo fornito da Beckman Coulter, sono stati aggiunti 49 ng di DNA purificato, essendo un frammento di DNA a doppio filamento di ~1500 bp), 2 µl dell'oligonucleotide universale utilizzato, 27F o 1492R, preparato alla

concentrazione di 1,6  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{l}$  di “DTCS Quick Start Master Mix”. La reazione è stata condotta nel termociclatore *Robocycler<sup>®</sup> Gradient 96 Thermal Cycler* (Stratagene) seguendo il seguente programma:

96°C	40 secondi	}	45 cicli
50°C	40 secondi		
60°C	4 minuti		
4°C	“hold”		

Successivamente, le reazioni di sequenzamento, sono state sottoposte ad una precipitazione con etanolo, aggiungendo ad ogni campione 4  $\mu\text{l}$  di “Stop Solution” (preparata al momento con uguali volumi di NaOAc 3 M e EDTA 100 mM), 1  $\mu\text{l}$  di glicogeno (20 mg/ml), 60  $\mu\text{l}$  di etanolo 100% freddo (-20°C). Dopo centrifugazione a 13000 rpm in centrifuga da banco per 15 minuti a 4°C, il surnatante è stato attentamente rimosso, e sono stati eseguiti due successivi lavaggi con 200  $\mu\text{l}$  di etanolo 70% freddo (-20°C), centrifugando, ogni volta, a 13000 rpm in centrifuga da banco per 2 minuti a 4°C, e rimuovendo con cura il surnatante tra un lavaggio ed il successivo. Il campione ottenuto è stato seccato a 37°C per 30 minuti e poi risospeso in 40  $\mu\text{l}$  di “Sample Loading Solution”. Sono stati poi usati 20  $\mu\text{l}$  per essere analizzati con il sequenziatore *CEQ<sup>TM</sup> 2000 XL Sequencer* (Beckman Coulter), utilizzando un programma specifico, ed il Software *Sequence Analysis* del *CEQ 2000 Analysis System*. Il programma BLAST-N (“**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool”, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) è stato utilizzato per rilevare similarità di sequenza con il “database” di sequenze di rDNA 16S disponibili in NCBI (“National Center for Biotechnology Information”, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 3.5. ANALISI COMPUTAZIONALE DEL GENE *swphy* DI *Sphingomonas wittichii* RW1

L'analisi del contesto genico del gene *swphy*, della sequenza nucleotidica e della sua sequenza aminoacidica dedotta, è stata eseguita servendosi dei seguenti programmi disponibili in rete:

- ✓ programma *BLAST-P* (“**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool”, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) per la ricerca di similarità di sequenza con il “database” di sequenze proteiche disponibile in NCBI
- ✓ programma *SignalP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Nielsen et al., 1997) per la predizione del sito di taglio di una sequenza segnale nella sequenza aminoacidica della proteina di interesse
- ✓ programma *PSORT* (“Prediction of Protein Sortine Signals and Localization Sites in Amino Acid Sequences”, <http://psort.nibb.ac.jp>) (Nakai and Horton, 1999) per la predizione della localizzazione sub-cellulare della proteina in esame, sulla base del riconoscimento di specifiche sequenze riconducibili a particolari localizzazioni cellulari
- ✓ programmi *BPROM* (“Prediction of bacterial promoters”) e *FINDTERM* (“Finding Terminators in bacterial genomes”), accessibili dal server **SOFTBERRY** (<http://www.softberry.com/berry.phtml>), per la ricerca di sequenze promotore e terminatore

- ✓ programma *CLUSTAL-W*  
(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) per  
l'allineamento di sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche
- ✓ server automatico *SWISS-MODEL*  
(<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>)  
(Schwede et al., 2003) accessibile via web dal server di Biologia  
molecolare ExPASy (<http://www.expasy.ch>), per costruire un  
modello tridimensionale, per omologia, della proteina in esame,  
che abbia una identità di sequenza con una proteina a struttura  
nota disponibile in PDB (“Protein Data Bank”), la quale funziona  
da template per la costruzione del modello (se una proteina a  
struttura non nota ha almeno il 30% di identità con una proteina a  
struttura nota, si può usare la seconda come template per generare  
un modello per omologia della prima).
- ✓ programma *Compute pI/Mw*, (Gasteiger et al., 2005) accessibile  
dal server di Biologia Molecolare Expasy per il calcolo della  
massa molecolare e del pI teorici della proteina in esame.

### **3.6. CARATTERIZZAZIONE PRELIMINARE DELL'ATTIVITÀ FITASICA DEL CEPP0 52 DI *Aeromonas* sp. E DI *Sphingomonas wittichii* RW1**

#### ***3.6.1. Lisi cellulare con “French Press”***

Questa tipologia di rottura cellulare è stata utilizzata per ottenere un estratto cellulare del ceppo 52, su cui eseguire il saggio di quantificazione dell'attività fitasica/fosfatasica a diversi valori di pH e di

temperatura. Il ceppo 52 è stato fatto crescere in circa 200 ml di terreno CM, in condizioni di aerazione a 30°C, fino al raggiungimento di una O.D<sub>600 nm</sub> (“Optical Density”) pari a 1.7-1.8. Dopo centrifugazione a 6000 x g per 15 minuti a 4°C, il surnatante è stato rimosso, e sulle cellule sono stati eseguiti due lavaggi successivi con 200 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%), centrifugando, ogni volta, a 6000 x g per 5 minuti a 4°C, e rimuovendo con cura il surnatante tra un lavaggio ed il successivo. Le cellule ottenute sono state risospese in circa 30 ml di un opportuno tampone ad un determinato valore di pH, quello scelto per poi saggiare l’attività fitasica/fosfatasica dell’estratto cellulare del ceppo 52 (sezione 3.6.5.), aliquotate in tubi tipo eppendorf da 2ml, e centrifugate a 8000 rpm a 4°C per 10 minuti in centrifuga da banco. Il surnatante è stato rimosso ed i pellet di cellule sono stati sottoposti a lisi cellulare con “French Press” o conservati a -20°C. Per la lisi cellulare, 2 pellet di cellule sono stati uniti e risospesi in 10-11 ml del tampone opportuno, e quindi lisate attraverso “French Press” a 2 KBar di pressione. L’estratto cellulare ottenuto è stato centrifugato a 6000 x g a 4°C per 15 minuti, al fine di rimuovere i detriti cellulari, ed utilizzato nel saggio di quantificazione dell’attività fitasica/fosfatasica (sezione 3.6.5.).

### ***3.6.2. Lisi cellulare con polvere di allumina, frazionamento dell’estratto cellulare con solfato di ammonio e successiva dialisi delle frazioni proteiche***

#### ***Lisi cellulare con polvere di allumina***

Questa tipologia di rottura cellulare è stata utilizzata per ottenere un estratto cellulare, di entrambi il ceppo 52 e *S. wittichii* RW1, da sottoporre a frazionamento con solfato di ammonio.



Le cellule sono state fatte crescere in 2 L di terreno massimo (CM per il ceppo 52 e M1 per *S. wittichii* RW1), per 16 ore, in condizioni di aerazione a 30°C. Dopo centrifugazione a 6000 x g a 4°C per 10 minuti, il surnatante è stato accuratamente rimosso e le cellule sono state sottoposte a 2 lavaggi con soluzione fisiologica (NaCl 0,9%), centrifugando a 6000 x g a 4°C per 10 minuti, e rimuovendo con cura il surnatante tra una lavaggio ed il successivo. Le cellule sono state sottoposte ad un ulteriore lavaggio con un opportuno tampone, al determinato valore di pH a cui si è deciso di eseguire il saggio di quantificazione dell'attività fitasica/fosfatasica (sezione 3.6.5.), e centrifugate nuovamente a 6000 x g a 4°C per 10 minuti in una provetta prepesata. Dopo aver rimosso il surnatante, il peso del pellet di cellule è stato determinato, e conservato a -20°C oppure sottoposto a lisi con polvere di allumina. È stata aggiunta una quantità di polvere di allumina pari al doppio del peso del pellet cellulare, e le cellule sono state rotte in mortaio con pestello, pestellando per circa 20 minuti e raffreddando con azoto liquido. La miscela di lisato cellulare e polvere di allumina è stata poi risospesa in un volume di circa 5-10 ml dell'opportuno tampone scelto, raccolta in un tubo da centrifuga, e centrifugata a 6000 x g a 4°C per 30 minuti, in modo da rimuovere i detriti cellulari e la polvere di allumina. Una aliquota del surnatante (1-2 ml), ovvero l'estratto cellulare, è stata prelevata per essere analizzata mediante SDS-PAGE e Zimogramma, e per essere utilizzata nel saggio di quantificazione dell'attività fitasica/fosfatasica. La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo di quantificazione Bradford (Bradford, 1976), come descritto nella sezione 3.6.3. Dell'estratto cellulare rimanente è

stato misurato il volume, dopodichè è stato sottoposto a frazionamento con ammonio solfato.

Frazionamento dell'estratto cellulare con solfato di ammonio e successiva dialisi delle frazioni proteiche

All'estratto cellulare ottenuto come descritto in sezione 3.6.2. è stata aggiunta una quantità di solfato di ammonio tale da raggiungere il 30% di saturazione, facendo riferimento alla tabella 3 per fare i calcoli.

	Concentrazione finale di solfato d'ammonio, % di saturazione																
	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
	Grammi di solfato d'ammonio solido da aggiungere a 1000 ml di soluzione																
0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
50										33	66	101	137	176	214	302	392
55											33	67	103	141	179	264	353
60												34	69	105	143	227	314
65													34	70	107	190	275
70														35	72	153	237
75															36	115	198
80																77	157
90																	79

Tabella 3: relazione tra grammi di solfato di ammonio aggiunti a una soluzione, e percentuale di saturazione a 25°C. Poiché la solubilità dell'ammonio solfato varia con la temperatura, se la procedura avviene a 0°C i valori calcolati con questa tabella devono essere moltiplicati per il valore 0,92.

La miscela ottenuta è stata agitata delicatamente fino al completo discioglimento del sale e mantenuta in ghiaccio. La soluzione, precedentemente limpida, è diventata torbida, dato che una frazione delle proteine è precipitata. Dopo centrifugazione a 9000 x g per 30 minuti a 4°C, il surnatante è stato trasferito in un tubo pulito, misurandone il volume, mentre il precipitato, che costituisce la frazione proteica denominata 0-30%, è stato risospeso in un piccolo volume di tampone opportuno (1-2 ml), al determinato valore di pH a cui si è deciso di eseguire il saggio di quantificazione dell'attività fitasica/fosfatasica (sezione 3.6.5.), e mantenuto in ghiaccio. Al surnatante recuperato è stata aggiunta una quantità di solfato di ammonio tale da raggiungere il 70% di saturazione, facendo sempre riferimento alla tabella 3 per fare i calcoli, e ricordando che la soluzione era già al 30% di saturazione. La miscela è stata agitata delicatamente fino al completo discioglimento del sale, e mantenuta in ghiaccio. Ancora una volta la soluzione è diventata torbida a causa della precipitazione di un'altra frazione di proteine. Dopo centrifugazione a 9000 x g per 30 minuti a 4°C, il surnatante, che rappresenta la frazione di proteine solubili in solfato di ammonio al 70% di saturazione, è stato trasferito ad un tubo pulito e mantenuta in ghiaccio. Questa frazione è stata denominata frazione >70%. Il precipitato, che costituisce la frazione di proteine solubili in solfato di ammonio al 30% ma non al 70%, è stato risospeso in 1-2 ml di tampone opportuno e mantenuta in ghiaccio. Questa frazione è stata denominata frazione 30-70%. Le tre frazioni proteiche così ottenute, frazione 0-30%, frazione 30-70%, frazione >70%, sono state dializzate in tubi da dialisi (Sigma, cutoff 12000 Da), in modo da rimuovere l'elevata concentrazione di solfato di ammonio utilizzato per i frazionamenti. Il

tampone utilizzato per la dialisi è lo stesso in cui sono state risospese le varie frazioni e possiede il valore di pH specifico a cui verrà successivamente eseguito il saggio di attività fitasica/fosfatasica (sezione 3.6.5.). Un tratto di ogni tubo da dialisi è stato chiuso ad un'estremità mediante un paio di nodi, e la soluzione proteica è stata trasferita nel sacchetto così ottenuto mediante una pipetta, e quindi chiuso con un paio di nodi. Ogni sacchetto è stato messo in 4 litri del tampone specifico a concentrazione 25mM, a 4°C per almeno 1,5 h, mantenendo il tampone in agitazione con l'aiuto di un magnete. Dopo questo periodo di tempo il tampone di dialisi è stato sostituito con un uguale volume dello stesso tampone e la dialisi è proceduta ancora, per almeno 1 ora e mezzo e sempre a 4°C. In questo modo i sali presenti nella soluzione proteica tendono ad uscire dal sacchetto fino a raggiungere l'equilibrio. Al termine di questo procedimento le frazioni proteiche dializzate sono state trasferite in tubi tipo eppendorf da 2ml, analizzate tramite SDS-PAGE e Zimogramma, ed utilizzate nei saggi di quantificazione dell'attività fitasica/fosfatasica (sezione 3.6.5.). La concentrazione delle proteine in ogni frazione è stata determinata con il metodo Bradford (Bradford, 1976), come descritto nella sezione 3.6.3.

### ***3.6.3. Determinazione della concentrazione proteica con il metodo Bradford (Bradford, 1976)***

La concentrazione proteica nei campioni in esame è stata determinata costruendo una curva standard utilizzando la proteina BSA ("Bovine Serum Albumin"). Partendo da uno "stock" di BSA alla concentrazione di 0,1 mg/ml sono state preparate 5 diluizioni, nell'intervallo di concentrazioni compreso fra 1,2 e 10 µg/ml, in un volume finale di 800

µl. Anche di ogni campione sono state eseguite opportune diluizioni in un volume finale di 800 µl, utilizzando un fattore di diluizione compreso nell'intervallo 10-3000X. Ogni soluzione proteica (standard e campioni) è stata saggiata in duplicato o in triplicato. Ad ogni campione sono stati aggiunti 200 µl della soluzione colorante "*Quick Start Bradford 1x Dye Reagent*" (Bio-rad Laboratories). Le reazioni sono state incubate a temperatura ambiente per 15-20 minuti ed è stata determinata l'assorbanza a 595 nm.

***3.6.4. Analisi degli estratti cellulari e delle frazioni proteiche mediante SDS-PAGE ("Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis") e saggio di attività fitasica direttamente nel gel (Zimogramma)***

*Analisi SDS-PAGE*

L'analisi SDS-PAGE degli estratti cellulari e delle frazioni proteiche, ottenuti come descritto nelle sezioni 3.6.1 e 3.6.2, è stata condotta secondo le istruzioni di Laemmli (1970), utilizzando il seguente materiale:

***Materiale utilizzato per la corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide:***

*2X Tris-Glycine SDS Sample buffer (componenti per 10 ml):*

✓ Tris-Cl pH6.8, 0.5M	2,5 ml
✓ Glicerolo	2 ml
✓ SDS 10 %	4 ml
✓ Bromophenol Blue 0,1%	0,5 ml
✓ 2-β- mercaptoetanolo*	0,5 ml
✓ H <sub>2</sub> O	A volume di 10 ml

\*il 2-β- mercaptoetanolo è stato aggiunto appena prima dell'uso

Tampone di corsa 1X Tris-Glycine SDS buffer, pH 8.3:

- ✓ Tris base 25 mM;
- ✓ Glycine 250 mM (electroforesis grade pH8.3);
- ✓ SDS 0,1%;

Componenti per 1ml di Stacking Gel 5%:

✓ H <sub>2</sub> O distillata	0,68 ml
✓ Acrylamide mix 30%* (w/v)	0,17 ml
✓ Tris base 1M, pH6.8	13 ml
✓ SDS 10%	0,01 ml
✓ Ammonio persolfato** (APS) 10%	0,01 ml
✓ TEMED	0,001 ml

Componenti per 10 ml di Running Gel 12%:

✓ H <sub>2</sub> O distillata	3,3 ml
✓ Acrylamide Mix 30%*	4 ml
✓ Tris base 1.5M, pH8.8	2,5 ml
✓ SDS 10%	0,1 ml
✓ APS 10%**	0,1 ml
✓ TEMED	0,004 ml

\* composta da Acrylamide 29%\* (w/v) e Bisacrylamide 1% (w/v) e preparata in H<sub>2</sub>O

\*\* l'APS 10% è stata preparata al momento dell'uso

***Materiale utilizzato per la visualizzazione delle bande proteiche:****Soluzione colorante (componenti per 100 ml)*

✓ Comassie R-250	0,25 g
✓ Soluzione di metanolo:acido acetico*	100 ml

\*composta da 10 ml di acido acetico, 45 ml di metanolo, 45 ml di H<sub>2</sub>O distillata

*Soluzione decolorante (componenti per 1L)*

✓ Metanolo	500 ml
✓ H <sub>2</sub> O distillata	400 ml
✓ Acido acetico	100 ml

Ogni campione da analizzare è stato unito, in rapporto 1:1 (v/v), al *2X Tris-Glycine SDS Sample buffer*, e mantenuto in ghiaccio fino al successivo riscaldamento per 5 minuti a 100°C, in modo da inattivare le proteasi e denaturare le proteine. Dopo questo trattamento i campioni sono stati conservati a -20°C o sottoposti ad elettroforesi, caricando 20 µl di ogni campione su gel di poliacrilamide composto da “running gel” 12% e “stacking gel 5%”. La corsa elettroforetica è stata eseguita ad un voltaggio costante fra 125-200 V, fino a quando il colorante blu di bromofenolo presente nel *Sample Buffer* è giunto al fondo del gel. Per la determinazione della dimensione delle bande proteiche sono stati utilizzati i seguenti marcatori di peso molecolare: *Plus Protein Precision Standard* (Bio-Rad Laboratories) e *Low Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis* (Pharmacia Biotech). Le bande proteiche sono state visualizzate immergendo il gel nella *Soluzione colorante*,

preriscaldata a 50°C, per 30 minuti, e successivamente nella *Soluzione decolorante* fino alla eliminazione del “background” blu del gel.

### Zimogramma

Il saggio di attività fitasica direttamente nel gel è stato eseguito seguendo le istruzioni di Bae e collaboratori (1999), ed utilizzando il seguente materiale:

### Soluzione di TritonX-100 1%

### Tamponi a diverso valore di pH

Tris-HCl 100mM pH7

Na-acetato 100mM pH6

### Soluzione colorante

Soluzione acquosa di cobalto cloruro 2%

### Soluzione di contrasto

Rapporto 1:1 (v/v) di una soluzione acquosa di ammonio molibdato 6,25% e di una soluzione acquosa di ammonio vanadato 0,42%, preparata al momento

I campioni sono stati uniti, in rapporto 1:1 (v/v), al *2X Tris-Glycine SDS Sample buffer*, senza aggiungere  $\beta$ -mercaptoetanololo e senza riscaldamento a 100°C, e mantenuti in ghiaccio fino alla successiva corsa elettroforetica, avvenuta come descritto nella *Analisi SDS-PAGE*. Dopo la corsa elettroforetica, il gel di poliacrilamide è stato immerso in una



soluzione di TritonX-100 1%, per 1 ora a temperatura ambiente, in modo da rimuovere il detergente SDS, e successivamente per 1 ora a 4°C nel tampone al pH specifico prescelto per saggiare l'attività fitasica. Dopo questo periodo di tempo il gel è stato immerso per 16 ore nel tampone specifico contenente Na-fitato 0,4%.

Le bande di attività fitasica sono state visualizzate immergendo il gel nella *Soluzione colorante* per 5 minuti a temperatura ambiente, e successivamente nella *Soluzione decolorante* per altri 5 minuti sempre a temperatura ambiente. Le zone in cui il fitato è stato degradato appaiono come aloni trasparenti su uno sfondo opaco.

#### ***3.6.5. Saggio di quantificazione dell'attività fitasica/fosfatasica***

Il saggio è stato eseguito facendo riferimento ad Han e collaboratori (1999) e Kim e Lei, (2005) utilizzando il seguente materiale:

##### *Tamponi a diverso valore di pH*

- ✓ Glicina-HCl 100 mM pH 3
- ✓ Na-Acetato 100 mM, pH 4, pH 5, pH 6
- ✓ Tris-HCl 100 mM pH 7 e pH 8

##### *Soluzione colorante*

- ✓ 3 parti di una soluzione Acido solforico 1M
- ✓ 1 parte di una soluzione acquosa di Ammonio molibdato 2,5% (conservata a 4°C per un tempo massimo di un mese);
- ✓ 1 parte di una soluzione acquosa di Acido ascorbico 10% (preparata al momento)

### Soluzioni standard di fosfato di potassio

Le soluzioni standard sono state preparate come riportato di seguito:

<b>Diluizione di uno "Stock" di <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> 9 mM</b>	<b>Concentrazione di fosfato (<math>\mu\text{M}</math>) nelle soluzioni diluite</b>
1:75	120
1:100	90
1:150	60
1:200	45
1:400	22,5
1:800	11,25
1:1600	5,62

Una soluzione di Na-fitato 4 mM è stata preparata utilizzando il tampone specifico al valore di pH a cui si è deciso di svolgere il saggio enzimatico, e preriscaldata per 5 minuti alla temperatura del saggio (39°C in condizioni standard, 30°C, 37°C, 39°, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C nel saggio eseguito a diverse temperature). Aliquote dei campioni (estratto cellulare grezzo o frazioni proteiche 0-30%, 30-70%, >70) sono stati uniti ad una uguale quantità di questa soluzione in modo da ottenere una concentrazione finale di Na-fitato pari a 2mM, e la miscela di reazione è stata incubata alla temperatura specifica effettuando prelievi di 300  $\mu\text{l}$  a intervalli di 15 minuti. Ai 300  $\mu\text{l}$  prelevati per ogni campione sono stati aggiunti 300  $\mu\text{l}$  di una soluzione di acido tricloroacetico 15%, al fine di bloccare la reazione enzimatica. Dopo centrifugazione a 2000 x g per 10 minuti a temperatura ambiente, in modo da rimuovere le proteine precipitate, sono stati prelevati 100  $\mu\text{l}$  del surnatante, trasferiti ad

un tubo di tipo eppendorf da 1,5 ml, ed uniti a 400  $\mu\text{l}$  del tampone specifico.

Per poter costruire una curva standard con cui quantificare il fosfato liberato durante le reazioni enzimatiche, sono state preparate soluzioni di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a concentrazione di fosfato (Pi) pari a 120  $\mu\text{M}$ , 90  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 45  $\mu\text{M}$ , 22,5  $\mu\text{M}$ , 11,25  $\mu\text{M}$ , 5,62  $\mu\text{M}$ , e 500  $\mu\text{l}$  di ciascuna soluzione standard sono stati aliquotati in tubi tipo eppendorf da 1,5 ml.

Dopo avere aggiunto 500  $\mu\text{l}$  di *Soluzione colorante*, ogni campione ed ogni soluzione standard sono stati incubati a 50°C per 15 minuti, lasciati raffreddare a temperatura ambiente, ed è stata misurata l'assorbanza a 820 nm con spettrofotometro *Beckman DU<sup>®</sup> 640*. L'attività fitasica rilevata è stata espressa in FTU, dove 1 Unità di attività fitasica catalizza il rilascio di 1nmole di Pi dal Na-fitato per minuto di reazione, nelle condizioni di pH e di temperatura a cui è stato svolto il saggio enzimatico. Per ogni campione sono state eseguite almeno due repliche, ed ogni esperimento è stato ripetuto due volte.

Nella messa a punto del saggio enzimatico, sono state utilizzate due tipologie di bianco. La prima è consistita nell'utilizzare il tempo di prelievo  $T_0$ , cioè il prelievo eseguito immediatamente dopo l'unione del campione alla soluzione substrato, quindi prima che iniziasse la reazione enzimatica. La seconda tipologia è consistita nell'incubare, alla temperatura del saggio, la medesima aliquota dei campioni nella soluzione di acido tricloroacetico 15%, ed eseguire i prelievi ad intervalli di 15 minuti, come nel caso dei campioni incubati con la soluzione substrato. Ad ogni prelievo è stata poi aggiunta la soluzione substrato in modo da avere lo stesso "background" dei campioni. Inoltre, per distinguere tra attività fitasica sul substrato Na-fitato ed attività

fosfatasica su composti fosforilati presenti negli estratti (quali granuli di polifosfato), la medesima aliquota dei campioni è stata incubata nella soluzione tampone in assenza del substrato Na-fitato, e trattata esattamente come i campioni, eseguendo prelievi regolari ogni 15 minuti. Durante la messa a punto del saggio enzimatico, è stata valutata anche la stabilità del Na-fitato alle temperature e nei tamponi utilizzati nel saggio, monitorando l'eventuale rilascio di fosfato da parte del substrato durante il periodo di incubazione.

### **3.7. CLONAGGIO DEL GENE *swphy* di *Sphingomonas wittichii* RW1**

#### **3.7.1. Vettori di espressione utilizzati**

*pET15b* (5708 bp) (Novagen): permette di clonare i geni di interesse in fusione con una sequenza che codifica un “tag” di istidina, in modo che la proteina di interesse sia espressa come fusione con il “tag” di istidina alla estremità N-terminale; conferisce resistenza all'antibiotico ampicillina; possiede il promotore *T7lac* inducibile con IPTG (0,05-2mM) (“Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside”)

*pET26b(+)* (5360 bp) (Novagen): permette di clonare i geni di interesse in fusione con una sequenza che codifica un “tag” di istidina in modo che la proteina di interesse sia espressa come fusione con il “tag” di istidina alla estremità C-terminale; possiede inoltre una sequenza segnale *pelB* N-terminale per una potenziale localizzazione periplasmatica della proteina espressa; conferisce resistenza

all'antibiotico kanamicina; possiede il promotore *T7lac* inducibile con IPTG (0,05-2mM) ("Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside").

### **3.7.2. Amplificazione del gene *swphy* mediante PCR ("Polymerase Chain Reaction")**

Il DNA genomico di *S. wittichii* RW1 è stato estratto ed analizzato tramite elettroforesi su gel di agarosio, determinato qualitativamente e quantitativamente come descritto nella sezione 3.4.1., ed utilizzato come template per l'amplificazione del gene *swphy* mediante la tecnica PCR. È stata utilizzata la DNA polimerasi ad alta fedeltà *Pfu Ultra II Fusion HS* della casa Stratagene, e per l'allestimento delle reazioni e per il programma di amplificazione sono state eseguite le indicazioni del protocollo fornito da Stratagene.

Nella tabella 4 sono riportate le sequenze degli oligonucleotidi specifici utilizzati per l'amplificazione del gene *swphy* nella sua totalità, ovvero con la sequenza seganale Ss (coppia A e coppia C), il cui prodotto di amplificazione è stato denominato *swphy*, ed il gene privo della sua sequenza Ss (coppia B e coppia D), il cui prodotto di amplificazione è stato denominato  $\Delta$ Ss-*swphy*.

Gli oligonucleotidi specifici sono stati disegnati sulla sequenza del gene *swphy* di *S. wittichii* RW1 (GeneID: 5200658) ed il programma "*Oligonucleotide Properties Calculator*", disponibile in internet al sito <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>, è stato utilizzato per determinarne le proprietà e per prevedere l'eventuale formazione di strutture secondarie indesiderate.

Nome		SeqER	Sequenza nucleotidica	Tm (°C)
Coppia A	A_F	<i>NdeI</i>	ggaatt <b>cat</b> ATGCGGCGGGTCCTGACGATC	72
	A_R	<i>XhoI</i>	cct <b>ctcgag</b> TTATCGCGGCAACCCCAGC	72
Coppia B	B_F	<i>NdeI</i>	ggaatt <b>catat</b> GGCGAAGGAGATGCCGGTC	71
	B_R	<i>XhoI</i>	cct <b>ctcgag</b> TTATCGCGGCAACCCCAGC	72
Coppia C	C_F	<i>NdeI</i>	ggaatt <b>cat</b> ATGCGGCGGGTCCTGACGATC	72
	C_R	<i>HindIII</i>	ccc <b>aagctt</b> TCGCGGCAACCCCAGCC	71
Coppia D	D_F	<i>BamHI</i>	cg <b>cgatcc</b> GGCGAAGGAGATGCCGGTC	75
	D_R	<i>HindIII</i>	ccc <b>aagctt</b> TCGCGGCAACCCCAGCC	71

**Tabella 4: coppie di oligonucleotidi specifici utilizzati nella amplificazione del gene *swphy* mediante PCR.** Le lettere minuscole in grassetto indicano le sequenze di riconoscimento degli enzimi di restrizione (SeqER) aggiunte all'estremità 5' dell'oligonucleotide specifico; le lettere minuscole non in grassetto indicano nucleotidi aggiunti per aumentare l'efficienza di taglio degli enzimi di restrizione (Dieffenbach and Dveksler, 1995); le lettere maiuscole indicano la sequenza nucleotidica complementare alla sequenza genica di interesse; F ("Forward") si riferisce all'oligonucleotide senso; R ("Reverse") si riferisce all'oligonucleotide antisenso.

I prodotti di PCR sono stati purificati seguendo le istruzioni del kit di purificazione *GFX<sup>TM</sup>* (Amersham Biosciences), adatto alla purificazione di prodotti di PCR e bande estratte da gel di agarosio. L'elettroforesi su gel di agarosio e la determinazione qualitativa e quantitativa del DNA amplificato sono state eseguite come descritto nella sezione 3.4.1.

### ***3.7.3. Preparazione dei vettori plasmidici e degli inserti da utilizzare nei clonaggi***

I prodotti di PCR purificati, *swphy* e  $\Delta$ Ss-*swphy*, ottenuti come descritto nella sezione 3.7.2., ed i vettori di espressione *pET15b* e *pET26b*, sono stati digeriti con le seguenti coppie di enzimi di restrizione (Promega):

- ✓ *NdeI* e *XhoI* per il clonaggio di *swphy* e  $\Delta$ Ss-*swphy* nel vettore *pET15b*
- ✓ *NdeI* e *HindIII* per il clonaggio di *swphy* nel vettore *pET26b*
- ✓ *BamHI* e *HindIII* per il clonaggio di  $\Delta$ Ss-*swphy* nel vettore *pET26b*

Le reazioni sono state allestite in un volume finale di 200  $\mu$ l utilizzando i seguenti componenti:

- ✓ 500-800 ng di DNA
- ✓ 10-20 U di ogni enzima di restrizione (Promega)
- ✓ Tampone specifico 1X
- ✓ H<sub>2</sub>O m $\Omega$  a volume di 200  $\mu$ l

Le reazioni sono state incubate a 37°C per 16 ore. Quando gli enzimi di restrizione utilizzati non avevano un tampone specifico compatibile, sono state eseguite due reazioni di restrizione successive, ed il recupero del DNA digerito nel primo passaggio di restrizione è avvenuto attraverso la purificazione da gel di agarosio utilizzando il kit di purificazione *GFX<sup>TM</sup>* (Amersham Biosciences), adatto alla purificazione di bande estratte da

gel. Il DNA recuperato è stato utilizzato nella seconda reazione di restrizione, che è stata allestita come sopra descritto.

Al termine della restrizione di entrambi i vettori *pET15b* e *pET26b* con la coppia specifica di enzimi, alla miscela di reazione è stata aggiunta una quantità di fosfatasi *SAP* (“*Shrimp Alkaline Phosphatase*”) (Promega) pari a 1U/μg di DNA plasmidico. La reazione è stata incubata per 1 ora a 37°C e successivamente per 15 minuti a 65°C in modo da disattivare l’enzima fosfatasi. Infine, tutti i vettori e gli inserti ottenuti, sono stati purificati da gel di agarosio utilizzando sempre il kit di purificazione *GFX<sup>TM</sup>* (Amersham Biosciences). L’elettroforesi su gel di agarosio e la determinazione qualitativa e quantitativa del DNA purificato sono avvenute come descritto nella sezione 3.4.1.

#### ***3.7.4. Reazione di ligazione e trasformazione delle cellule competenti di Escherichia coli***

##### *Ligazione*

Le reazioni di ligazione sono state eseguite considerando la relazione molare DNA inserto/ vettore plasmidico di 3/1 e la quantità di DNA inserto specifica per 50 ng di vettore è stata calcolata secondo la formula:

$$\frac{\text{ng vettore} \times \text{kb inserto}}{\text{kb vettore}} \times \frac{3}{1}$$

Le reazioni di ligazione sono state allestite in un volume finale di 10 μl utilizzando 0,2-0,4 U dell’enzima ligasi T4 (Amersham Biosciences), ed 1 μl del tampone specifico 10X. Le reazioni sono state incubate per 16 ore a 16°C. Per ogni ligazione è stata allestita anche una reazione di



controllo, in cui gli inserti non sono stati aggiunti alla mix di reazione, ma sono stati utilizzati solo i vettori. In questo modo è stato possibile verificare la percentuale dei cloni non ricombinanti in ogni trasformazione successivamente eseguita.

#### Trasformazione

Le reazioni di ligazione sono state poi utilizzate per trasformare cellule competenti “*JM109 High Efficiency Competent Cells*” (Promega). Dopo aver aggiunto le reazioni di ligazione a 50 µl di cellule competenti, queste sono state lasciate in ghiaccio per 20 minuti e successivamente sottoposte a shock termico, incubandole 50 secondi a 42°C e subito dopo in ghiaccio per 2 minuti. A questo punto sono stati aggiunti 940 µl di terreno liquido LB (volume finale di 1 ml), ed ogni campione è stato incubato a 37°C in condizioni di aerazione per 1 ora e 30 minuti. Le cellule così trasformate sono state concentrate centrifugandole a 1000 x g per 10 minuti, risospese in 100 µl di terreno liquido LB, e seminate su piastre di LB contenenti lo specifico antibiotico per la selezione, kanamicina (30 µg/ml) per il vettore *pET26b*, ampicillina (100 µg/ml) per il vettore *pET15b*. Le piastre sono state incubate a 37°C per 16 ore.

#### **3.7.5. PCR su colonia, estrazione e sequenziamento del DNA plasmidico**

Le colonie batteriche trasformate con le legazioni, sono state analizzate tramite PCR su colonia, per isolare i cloni pET-ricombinanti.

Le reazioni di PCR sono state eseguite utilizzando gli oligonucleotidi vettore-specifici “T<sub>7</sub> Promoter Primer” e “T<sub>7</sub> Terminator Primer” (tabella 5), ed utilizzando la *Taq* DNA polimerasi della casa Fisher Bioreagents\*.

<b>“T<sub>7</sub> Promoter Primer”</b>	5'-AATACGACTCACTATAGGG-3'
<b>“T<sub>7</sub> Terminator Primer”</b>	5'-TATGCTAGTTATTGCTCAG-3'

**Tabella 5:** sequenza degli oligonucleotidi “T<sub>7</sub> Promoter Primer” e “T<sub>7</sub> Terminator Primer” (Novagen).

Avvalendosi di uno stecchino sterile, una singola colonia è stata trasferita in un tubo tipo eppendorf da 0,5 ml, contenente 50 µl di H<sub>2</sub>O sterile, e le cellule sono state risospese mediante agitazione con vortex per 15-20 secondi.

Per mantenere una copia della colonia, prima di trasferirla, la punta dello stecchino è stata appoggiata su una piastra di LB contenente l'apposito antibiotico, ed è stata incubata a 37°C per 16 ore.

Le cellule sono state lisate tramite incubazione a 99°C per 5 minuti. Dopo centrifugazione a 12000 x g per 1 minuto, in modo da rimuovere i detriti cellulari, 5 µl del surnatante sono stati trasferiti alla mix di reazione di PCR contenente i seguenti componenti in un volume finale di 50 µl: 2U di *Taq* DNA polimerasi, PCR Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, oligonucleotidi vettore-specifici 0,8 µM. L'amplificazione è stata condotta nel termociclatore *Genius* (Techne) seguendo il seguente programma:

96°C	1 minuto	1 ciclo
94°C	50 secondi	} 35 cicli
55°C	50 secondi	
72°C	2 minuti	
72°C	8 minuti	1 ciclo
4°C	“hold”	

5 µl di ogni reazione di amplificazione sono stati controllati tramite elettroforesi su gel di agarosio condotta come descritto nella sezione 3.4.1.

Per ogni clonaggio eseguito (*pET15b-swphy*, *pET15b-ΔSs-swphy*, *pET26b-swphy*, *pET26b-ΔSs-swphy*), fra i vari cloni pET-ricombinanti che mostravano le bande di amplificazione desiderate (1062 bp per *swphy* e 1011 bp per *ΔSs-swphy*), ne sono stati scelti 2 da cui estrarre il DNA plasmidico, da sottoporre, poi, a sequenziamento per verificare la correttezza del clonaggio. Da questi cloni il DNA plasmidico è stato estratto seguendo le istruzioni del kit di purificazione *WIZARD® PLUS SV MINI-PREPS DNA PURIFICATION SYSTEM* (Promega).

La elettroforesi su gel di agarosio e la determinazione qualitativa e quantitativa del DNA plasmidico estratto sono state eseguite come descritto nella sezione 3.4.1.

Il sequenziamento di ogni costrutto molecolare è avvenuto utilizzando il sistema *CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit* (Beckman-Coulter), ed il procedimento seguito è quello descritto nella sezione 3.4.3. Gli oligonucleotidi utilizzati sono “T<sub>7</sub> Promoter Primer” e “T<sub>7</sub> Terminator Primer”, e la quantità in ng di DNA templatato da utilizzare in ogni reazione di sequenziamento per avere 50 fmoli dello

stesso, è stata calcolata utilizzando la tabella presente nel protocollo fornito da Beckman-Coulter.

### **3.8. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEL GENE *swphy* IN *Escherichia coli* BL21(DE3)**

#### ***3.8.1. Preparazione di cellule competenti di BL21(DE3) e successiva trasformazione con i vettori di espressione contenenti il gene *swphy* (*swphy* e $\Delta$ Ss-*swphy*)***

Le cellule competenti del ceppo BL21(DE3) di *E. coli* sono state preparate utilizzando il CaCl<sub>2</sub>. Una colonia di BL21(DE3) cresciuta per 16-20 ore a 37°C su una piastra di terreno LB, è stata inoculata in 100 ml dello stesso terreno fresco e la coltura è stata incubata a 37°C in condizioni di aerazione fino al raggiungimento di una OD<sub>600nm</sub> pari a ~0,4. Per assicurarsi che la coltura non crescesse ad un densità maggiore, il valore di OD<sub>600nm</sub> è stato misurato ogni 20 minuti. La coltura è stata quindi suddivisa in due provette sterili pre-raffreddate in ghiaccio, e le cellule sono state lasciate a 0°C per 10 minuti. Dopo centrifugazione a 2700 x g per 10 minuti a 4°C, il surnatante è stato accuratamente rimosso, e ciascun pellet di cellule è stato delicatamente risospeso in 30 ml di una soluzione fredda di MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> (80 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM CaCl<sub>2</sub>). Dopo centrifugazione a 2700 x g per 10 minuti a 4°C, il surnatante è stato accuratamente rimosso ed ogni pellet cellulare è stato risospeso in 2 ml di una soluzione di CaCl<sub>2</sub> 0,1 M. 100 µl della sospensione cellulare sono stati trasferiti in tubi tipo eppendorf da 1,5 ml sterili e pre-raffreddati in ghiaccio, utilizzando puntali freddi. Le aliquote di cellule competenti così

ottenute sono state conservate a  $-70^{\circ}\text{C}$  o utilizzate per la successiva trasformazione.

La trasformazione di 100  $\mu\text{l}$  delle cellule competenti del ceppo BL21(DE3) di *E. coli* con i costrutti molecolari *pET15b-swphy*, *pET15b- $\Delta\text{Ss-swphy}$* , *pET26b-swphy*, *pET26b- $\Delta\text{Ss-swphy}$*  (sezione 3.7.), è avvenuta utilizzando 50 ng del DNA plasmidico, seguendo la procedura descritta nella sezione 3.7.4., con l'eccezione che, le cellule trasformate, non sono state concentrate tramite centrifugazione, ma 100  $\mu\text{l}$  della trasformazione sono stati seminati direttamente su piastre di LB contenenti l'apposito antibiotico.

#### **3.8.2. Induzione dell'espressione del gene *swphy***

L'induzione dell'espressione del gene *swphy* è avvenuta facendo riferimento al "*pET System Manual*" fornito da Novagen.

Per ogni trasformazione eseguita, sono stati analizzati due cloni BL21-pET-ricombinanti. Per ciascuno di questi cloni è stata posta una precoltura in 2 ml di terreno LB contenente l'apposito antibiotico, facendola crescere a  $30^{\circ}\text{C}$ , in condizioni di aerazione, per 16 ore. 600  $\mu\text{l}$  di questa precoltura sono stati poi utilizzati per preparare colture in 60 ml di LB contenente l'apposito antibiotico (fattore di diluizione 100X). Ogni coltura è stata fatta crescere a  $37^{\circ}\text{C}$ , in condizioni di aerazione per 3-4 ore fino al raggiungimento di una  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  pari a 0.6-1. La  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  è stata monitorata durante tutto il periodo di crescita, prelevando aliquote delle colture in condizioni di sterilità. Prima di procedere all'induzione, ogni coltura è stata suddivisa in due, trasferendo 30 ml in una beuta sterile. 30 ml sono stati utilizzati come controllo non indotto, gli altri 30 ml sono invece stati sottoposti ad induzione mediante l'aggiunta di IPTG

("Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside") 0,5 mM. Tutte le colture, indotte e non indotte, sono state incubate a 25°C per 16 ore. Al termine dell'induzione, è stata nuovamente misurata la OD<sub>600nm</sub>, e le cellule sono state recuperate mediante centrifugazione a 10000 x g per 10 minuti . I pellet cellulari ottenuti sono stati conservati a -20°C o sottoposti a lisi cellulare mediante "Freeze and Thaw" (sezione 3.8.3.).

### ***3.8.3. Lisi cellulare mediante "Freeze and Thaw" ed ottenimento delle frazioni TCP ("Total Cell Protein") e delle frazioni citoplasmatiche solubili***

I pellet di cellule, ottenuti come descritto nella sezione 3.8.3., sono stati risospesi in tampone Tris-HCl 20 mM pH7.5, freddo, contenente PMSF 1 mM per l'inibizione delle proteasi, in una quantità tale da ottenere un fattore di concentrazione pari a 10x (pellet da 30 ml di coltura risospesi in 3 ml di tampone) e sottoposti a 6-8 cicli composti dai seguenti passaggi:

- ✓ Congelamento in azoto liquido
- ✓ Scongelo a 50°C
- ✓ Agitazione con vortex per 15-20 secondi

Dopo centrifugazione a 6000 x g, per 5 minuti a 4°C, in modo da rimuovere le cellule non rotte, il surnatante è stato trasferito in una provetta pulita e mantenuto in ghiaccio. Per analizzare tramite *SDS-PAGE* le proteine cellulari totali, una aliquota del surnatante, pari a 100  $\mu$ l, è stata trasferita in una nuova provetta, e denominata frazione TCP ("Total Cell Protein"). Il resto del surnatante è stato centrifugato a 20000

x g per 20 minuti in modo da separare la frazione citoplasmatica solubile dalla frazione insolubile. Il surnatante, che costituisce la frazione citoplasmatica solubile, è stato trasferito in una provetta pulita e conservato in ghiaccio per il successivo utilizzo, mentre il pellet, che costituisce la frazione insolubile, è stato conservato a 4°C.

L'analisi *SDS-PAGE* della frazione TCP e della frazione citoplasmatica solubile, e lo zimogramma della frazione citoplasmatica solubile, sono stati condotti come descritto nella sezione 3.6.4.

#### ***3.8.4. Purificazione della proteina ricombinante hSWPHY***

Per ottenere una elevata quantità della proteina ricombinante hSWPHY, da poter utilizzare nelle successive analisi delle proprietà catalitiche, le frazioni citoplasmatiche solubili da sottoporre a purificazione sono state ottenute in seguito alla lisi di pellet di cellule indotte (IPTG 0,5 mM) derivanti da 500 ml di colture in terreno LB con apposito antibiotico, come descritto nella sezione 3.8.3. La purificazione della proteina ricombinante hSWPHY è stata eseguita sfruttando la presenza del “tag” di istidina, e seguendo le istruzioni del kit di purificazione *HIS-SPIN PROTEIN MINIPREP* (Zymo Research). La quantificazione della proteina ricombinante purificata è stata eseguita con il metodo Bradford (1976) come descritto nella sezione 3.6.3. 2-5 µg del prodotto di purificazione sono stati analizzati tramite *SDS-PAGE* e *Zimogramma* come descritto nella sezione 3.6.4.

### 3.9. ANALISI DELLE PROPRIETÀ CATALITICHE DELLA FITASI RICOMBINANTE hSWPHY

#### 3.9.1. Saggio di quantificazione dell'attività fitasica di hSWPHY

Per analizzare le proprietà catalitiche della proteina hSWPHY è stato utilizzato il saggio di quantificazione dell'attività fitasica, facendo alcune modificazioni al metodo di Han e collaboratori (1999). Il saggio in condizioni standard è stato condotto alla temperatura di 39°C, nel tampone Na-acetato 100 mM pH6, valore di pH ottimale per l'attività della proteina hSWPHY, in presenza di Na-fitato e  $\text{Ca}^{2+}$  2mM. È stato utilizzato il materiale seguente, ed il protocollo di seguito descritto .

#### Soluzione colorante

- ✓ 3 parti di una soluzione Acido solforico 1M
- ✓ 1 parte di una soluzione acquosa di Ammonio molibdato 2,5% (conservata a 4°C per un tempo massimo di un mese);
- ✓ 1 parte di una soluzione acquosa di Acido ascorbico 10% (preparata al momento)

#### Soluzioni standard di fosfato di potassio

Le soluzioni standard sono state preparate come riportato di seguito:

Diluizione di uno "Stock" di $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 9 mM	Concentrazione di fosfato ( $\mu\text{M}$ ) nelle soluzioni diluite
1:75	120
1:100	90
1:150	60
1:200	45
1:400	22,5
1:800	11,25
1:1600	5,62



È stata preparata una soluzione substrato contenente Na-fitato 4 mM e  $\text{CaCl}_2$  4mM, utilizzando il tampone specifico impiegato nel saggio. 60  $\mu\text{l}$  di questa soluzione sono stati trasferiti ad un tubo tipo eppendorf da 1,5 ml, e preriscaldati per 5 minuti alla temperatura del saggio. 15-20  $\mu\text{l}$  della proteina purificata hSWPHY (sezione 3.8.4.) sono stati uniti a 45-40  $\mu\text{l}$  del tampone specifico utilizzato, in modo da avere un volume finale di 60  $\mu\text{l}$ , che sono stati aggiunti alla soluzione substrato preriscaldata alla temperatura del saggio. La concentrazione finale di Na-fitato e di  $\text{CaCl}_2$  nella miscela di reazione è stata quindi pari a 2mM. Immediatamente sono stati prelevati 50  $\mu\text{l}$  da aggiungere a 50  $\mu\text{l}$  di una soluzione di acido tricloroacetico 15%, in modo da bloccare l'avvio della reazione enzimatica. Questo tempo di prelievo, denominato  $T_0$ , è stato utilizzato come bianco di reazione. La miscela di reazione è stata incubata per 20 minuti alla temperatura specifica del saggio, dopodichè 50  $\mu\text{l}$  sono stati trasferiti a 50  $\mu\text{l}$  di una soluzione di acido tricloroacetico 15%, al fine di bloccare la reazione enzimatica. Questo tempo di prelievo è stato denominato  $T_1$ . Da entrambi i tempi  $T_0$  e  $T_1$  sono stati prelevati 50  $\mu\text{l}$  da trasferire ad un tubo di tipo eppendorf da 1,5 ml, contenente 200  $\mu\text{l}$  del tampone specifico.

Per poter costruire una curva standard con cui quantificare il fosfato liberato durante le reazioni enzimatiche, sono state preparate soluzioni di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a concentrazione di fosfato (Pi) pari a 120  $\mu\text{M}$ , 90  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 45  $\mu\text{M}$ , 22,5  $\mu\text{M}$ , 11,25  $\mu\text{M}$ , 5,62  $\mu\text{M}$ , e 250  $\mu\text{l}$  di ciascuna soluzione standard sono stati aliquotati in tubi tipo eppendorf da 1,5 ml.

Dopo avere aggiunto 250  $\mu\text{l}$  di Soluzione colorante ad ogni campione e ad ogni soluzione standard, tutti i campioni sono stati incubati a 50°C per

15 minuti, lasciati raffreddare a temperatura ambiente, ed è stata misurata l'assorbanza a 820 nm con spettrofotometro *Beckman DU<sup>®</sup> 640*.

L'attività fitasica rilevata è stata espressa in FTU, dove 1 Unità di attività fitasica catalizza il rilascio di 1nmole di Pi dal Na-fitato per minuto di reazione, nelle condizioni di pH e di temperatura a cui è stato svolto il saggio enzimatico. Per ogni campione sono state eseguite almeno tre repliche, ed ogni esperimento è stato ripetuto due volte.

In ogni saggio di attività enzimatica è stata anche valutata la stabilità del Na-fitato nel tampone specifico ed alla temperatura specifica utilizzati nel saggio, monitorando l'eventuale rilascio di fosfato da parte del substrato durante il periodo di incubazione.

### ***3.9.2. Effetto di ioni metallici sull'attività fitasica di hSWPHY***

Per valutare l'effetto di ioni metallici sull'attività fitasica della proteina ricombinante hSWPHY, la soluzione substrato del saggio di quantificazione dell'attività fitasica (3.9.1.) è stata preparata in tampone Na-acetato 100mM pH6 con Na-fitato (2mM) e con i seguenti ioni  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Li}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  alla concentrazione 1mM.

La concentrazione ottimale di  $\text{Ca}^{2+}$  per l'attività fitasica di hSWPHY è stata calcolata eseguendo il medesimo saggio, ed utilizzando nella soluzione substrato concentrazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  pari a 1mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM.

### ***3.9.3. Effetto del pH sull'attività e sulla stabilità della fitasi ricombinante hSWPHY***

Per valutare l'effetto del pH sull'attività fitasica della proteina ricombinante hSWPHY il saggio di quantificazione dell'attività fitasica è

stato condotto a 39°C, nei seguenti tamponi, in presenza di Na-fitato e  $\text{Ca}^{2+}$  2mM:

- ✓ Glicina-HCl 100 mM pH3
- ✓ Na-Acetato 100 mM, pH4, pH5, pH6
- ✓ Tris-HCl 100 mM pH6.5, pH7, pH7.5, pH8
- ✓ Glicina-NaOH pH9

La stabilità della proteina ricombinante hSWPHY è stata invece valutata nei seguenti tamponi:

- ✓ Glicina-HCl 100 mM pH1, pH2, pH3
- ✓ Na-Acetato 100 mM, pH4, pH5, pH6
- ✓ Tris-HCl 100 mM pH7, pH8
- ✓ Glicina-NaOH pH9

Allo scopo, aliquote dell'enzima sono state incubate per 1 ora a 39°C nei tamponi specifici e l'attività enzimatica residua è stata misurata con il saggio di attività enzimatica in condizioni standard (Na-fitato e  $\text{Ca}^{2+}$  2mM, pH6, 39°C, 20 minuti)

#### ***3.9.4 Effetto della temperatura sull'attività e sulla stabilità della fitasi ricombinante hSWPHY***

Per determinare il valore di temperatura ottimale per l'attività fitasica di hSWPHY, il saggio di quantificazione dell'attività fitasica è stato condotto in tampone a pH6, in presenza di NA-fitato e  $\text{Ca}^{2+}$  2mM, alle seguenti temperature: 20, 30, 39, 50, 55, 60, 65°C.

Per determinare la termostabilità di hSWPHY, aliquote dell'enzima sono state incubate per 10, 20, 30 e 45 minuti, a 80°C, raffreddate a 4°C, e l'attività fitasica residua è stata misurata con il saggio di attività enzimatica in condizioni standard (Na-fitato e Ca<sup>2+</sup> 2mM, pH6, 39°C, 20 minuti).

### ***3.9.5. Analisi della specificità di substrato della fitasi ricombinante hSWPHY***

Per analizzare la specificità di substrato della proteina hSWPHY, la soluzione substrato utilizzata nel saggio di quantificazione dell'attività fitasica (3.9.2.), è stata preparata in tampone a pH6 con Ca<sup>2+</sup> 2mM ed i seguenti composti fosforilati alla concentrazione di 2 mM:

- ✓ Na-fitato
- ✓ *p*-Nitrofenilfosfato
- ✓ AMP
- ✓ ADP
- ✓ ATP
- ✓ D-Glucosio 6-fosfato
- ✓ D-Fruuttosio 1,6-difosfato
- ✓ Na-pirofosfato
- ✓ Na-tripolifosfato

L'attività enzimatica di hSWPHY sui diversi composti fosforilati è stata misurata con il saggio di attività enzimatica condotto a 39°C.

**3.9.6. Analisi della resistenza alla proteolisi della fitasi ricombinante hSWPHY**

Pepsina 0,1 mg/ml in HCl 10 mM pH2

Tripsina 0,1 mg/ml in Ammonio bicarbonato 80 mM pH7.5

La resistenza della proteina ricombinante hSWPHY alla proteolisi da parte di pepsina e tripsina è stata misurata incubando aliquote dell'enzima, in rapporto 10:1, con ciascuna proteasi, a 37°C per 1 ora, in tampone a pH2 per pepsina, e pH7.5 per tripsina. La reazione è stata bloccata riponendola in ghiaccio, e l'attività fitasica residua è stata misurata con il saggio di quantificazione dell'attività fitasica condotto in condizioni standard (Na-fitato e  $\text{Ca}^{2+}$  2mM, pH6, 39°C, 20 minuti).

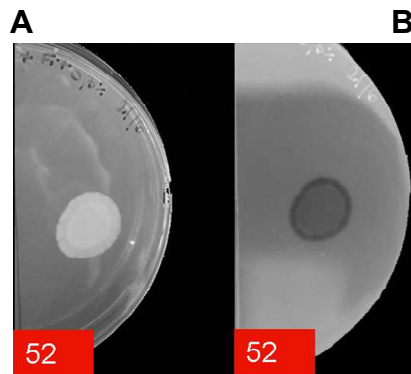
## **4. RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **4.1. Isolamento di batteri produttori di fitasi: approccio classico**

Allo scopo di isolare batteri produttori di fitasi con caratteristiche differenti e migliori rispetto a quelle fino ad oggi caratterizzate, sono stati eseguiti alcuni campionamenti nelle vasche di ossidazione del depuratore a fanghi attivi di Roncoesi (Reggio Emilia), che riceve gli scarichi di numerosi allevamenti suinicoli, quindi si presuppone sia ricco di fitato e di batteri in grado di degradarlo. Dai vari campioni sono state isolate numerose colonie batteriche, in seguito a semina su piastre di terreno massimo PCA, e crescita a 30°C per 16 ore; ciascuna di queste colonie è stata poi saggiata per la capacità di crescere in terreno minimo MPSM con fitato 0,3% come unica fonte di fosfato. Le colonie così selezionate sono state saggiate mediante il test di Bae (Bae et al., 1999), descritto in Materiali e Metodi, per verificare la loro effettiva capacità di degradare il fitato. Questo test è molto utile per selezionare rapidamente, tra un vasto numero di isolati microbici, quelli in grado di degradare il Na-fitato, permettendo di identificare visivamente e direttamente in piastra Petri l'attività di degradazione del fitato.

Le diverse colonie selezionate sono state seminate in piastre Petri di terreno minimo MPSM + Na-fitato 0,3% come unica fonte di fosfato, e dopo un periodo di incubazione di 4-5 gg a 30°C è stato eseguito il saggio di Bae (Bae et al., 1999). Fra tutti i batteri selezionati, in particolare un ceppo, denominato ceppo 52, ha mostrato una buona

crescita in piastra ed un marcato alone di degradazione del Na-fitato (figura 4).



**Figura 4: selezione di batteri produttori di fitasi:** **A)** ceppo 52 cresciuto per 4-5 gg a 30°C in terreno minimo MPSM + Na-fitato 0,3% come unica fonte di fosfato (sezione 3.3.); **B)** alone di degradazione del Na-fitato evidenziato con il test di Bae (Bae et al., 1999).

L'identificazione del ceppo 52 è avvenuta mediante il sequenziamento delle estremità 5' e 3' del 16S rDNA, e l'utilizzo dell'analisi BLAST-N per la ricerca di similarità con le sequenze di 16S rDNA depositate nel "database" di NCBI ("National Center for Biotechnology Information"). Il 16S rDNA è stato amplificato, a partire dal DNA genomico estratto dal ceppo 52, servendosi degli oligonucleotidi universali 27F e 1492R (sezione 3.4.).

Questa molecola è stata ampiamente utilizzata per tracciare le relazioni filogenetiche tra batteri, e per identificare batteri sia ambientali che di importanza clinica. La sequenza 16S rDNA ha regioni ipervariabili specie-specifiche, spesso fiancheggiate da regioni altamente conservate, e gli oligonucleotidi universali sono disegnati in modo da legarsi alle regioni conservate ed amplificare le regioni variabili. La sequenza del 16S rDNA è stata determinata per un elevato numero di specie batteriche, e sono disponibili in internet attraverso NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ed il RDP ("Ribosomal Database Project", [www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html](http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html)).

Da queste analisi è emerso che il ceppo 52 appartiene al genere *Aeromonas*, e non essendo presente in letteratura alcun riferimento a ceppi produttori di fitasi appartenenti a questo genere di  $\gamma$ -proteobatteri, si è proceduto alla caratterizzazione preliminare dell'attività fitasica del ceppo 52, in termini di pH e temperatura ottimale, utilizzando il saggio di quantificazione dell'attività fitasica/fosfatasica ed eseguendo uno zimogramma, come descritto in Materiali e Metodi, sia sugli estratti cellulari grezzi, sia sulle frazioni proteiche ottenute mediante precipitazione con solfato di ammonio e successiva dialisi.

## **4.2. Caratterizzazione preliminare dell'attività fitasica/fosfatasica del ceppo 52 di *Aeromonas* sp.**

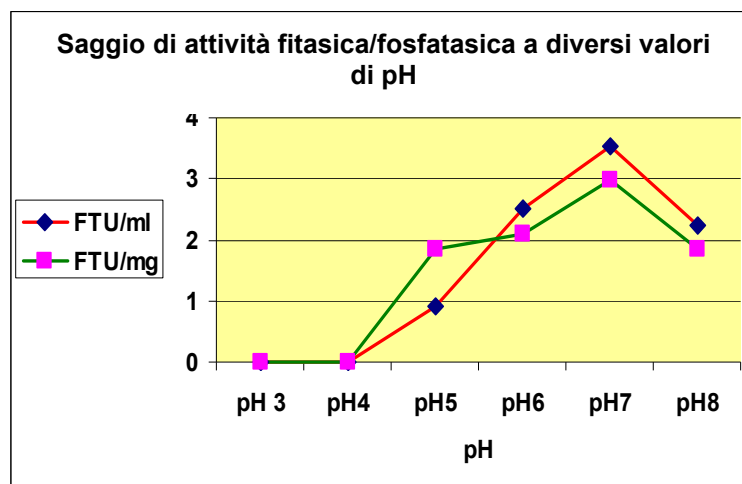
Le cellule del ceppo 52 di *Aeromonas* sp., cresciute in terreno massimo CM, sono state lisate mediante rottura con "French Press" a pressione di 2 KBar, e l'estratto cellulare ottenuto è stato testato per la capacità di liberare fosfato dal substrato Na-fitato attraverso il saggio di quantificazione dell'attività fitasica/fosfatasica, condotto in diverse condizioni di pH e di temperatura, come descritto in Materiali e Metodi.

### **4.2.1. Effetto del pH sull'attività fitasica/fosfatasica del ceppo 52 di *Aeromonas* sp.**

Per valutare l'effetto del pH sull'attività enzimatica del ceppo 52, il saggio di quantificazione dell'attività fitasica/fosfatasica è stato condotto



sull'estratto cellulare grezzo, utilizzando una gamma di tamponi a diversi pH, nell'intervallo tra pH3 e pH8, a 39°C ed in presenza di Na-fitato. Il periodo complessivo di incubazione a 39°C è stato di 60 minuti, con prelievi a intervalli regolari di 15 minuti. Durante il saggio è stato anche valutato il “background” di fosfato presente nell'estratto cellulare, per discriminare tra questo ed il fosfato liberato durante il saggio di attività fitasica/fosfataseica. I risultati ottenuti sono riportati in figura 5.



	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
FTU/ml	0	0	0,90	2,52	3,53	2,24
FTU/mg	0	0	1,86	2,10	2,99	1,86

**Figura 5: influenza del pH sull'attività fitasica/fosfataseica del ceppo 52 di *Aeromonas* sp.** Il saggio di quantificazione dell'attività fitasica/fosfataseica è stato condotto sull'estratto cellulare, in tamponi a diversi pH (sezione 3.6.5) ed in presenza di Na-fitato (2mM). Sono riportati i valori massimi di attività enzimatica registrati in ogni condizione di pH, e sono espressi in FTU/ml di coltura e FTU/mg di proteine totali. FTU: unità di attività fitasica (sezione 3.6.5). La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo Bradford (sezione 3.6.3)

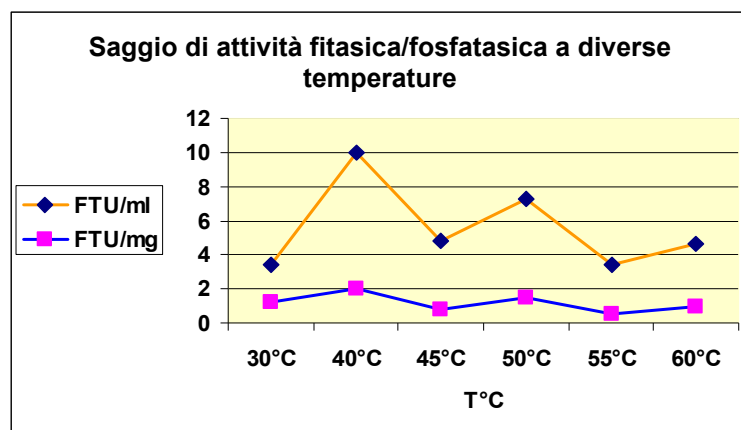
Come si vede dal grafico (figura 5), l'attività enzimatica è stata rilevata nell'intervallo di valori compresi tra pH5 e pH8, con attività ottimale a pH7 (3,53 FTU/ml e 2,99 FTU/mg), mentre a valori di pH inferiori a pH5 non è stata rilevata alcuna attività enzimatica.

Il valore massimo di attività enzimatica registrato nei saggi a differenti pH è stato rilevato dopo 45 minuti di incubazione sia per il tampone a pH5 che per quello a pH6, e dopo 30 minuti di incubazione per i tamponi a pH7 e pH8, dopodichè è stato registrato un leggero calo nell'attività enzimatica rilevata.

#### **4.2.2. Effetto della temperatura sull'attività fitasica/fosfatasica del ceppo 52 di *Aeromonas* sp.**

Il saggio di quantificazione dell'attività fitasica/fosfatasica è stato condotto sull'estratto cellulare grezzo nell' intervallo di temperature compreso tra 30°C e 60°C in tampone a pH7, il valore di pH risultato ottimale per l'attività enzimatica del ceppo 52, ed in presenza del substrato Na-fitato. Il tempo complessivo di incubazione alle diverse temperature è stato di 45 minuti, con prelievi a intervalli regolari di 15 minuti. Anche in questo caso è stato valutato il "background" di fosfato presente nell'estratto, per distinguere tra questo ed il fosfato liberato durante il saggio. I risultati ottenuti sono riportati nella figura 6.

Il valore ottimale di temperatura per l'attività enzimatica del ceppo 52 di *Aeromonas* sp. corrisponde a 40°C, ed il valore massimo di attività, pari a 10 FTU/ml di coltura e 2,02 FTU/mg di proteine totali, è stato raggiunto dopo 15 minuti di incubazione.



	30°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C
FTU/ml	3,42	10	4,86	7,27	3,39	4,60
FTU/mg	1,26	2,02	0,76	1,46	0,53	0,92

**Figura 6: influenza della temperatura sull'attività fitasica/fosfatasica del ceppo 52 di *Aeromonas* sp.** Il saggio di quantificazione dell'attività enzimatica è stato condotto sull'estratto cellulare, in tampone Tris-HCl 100mM pH7 in presenza di Na-fitato (2mM). Sono riportati i massimi valori di attività enzimatica registrati per ciascuna temperatura, e sono espressi in FTU/ml di coltura e FTU/mg di proteine totali. FTU: unità di attività fitasica. La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo Bradford (sezione 3.6.3).

L'attività enzimatica rilevata nell'estratto cellulare, potrebbe essere attribuita non solo ad attività idrolitica sul fitato ad opera della fitasi, ma anche ad attività fosfatasica su composti fosforilati presenti nell'estratto, quali ad esempio granuli di polifosfato (poliP). Si è proceduto, quindi, ad una parziale purificazione dell'estratto cellulare del ceppo 52, mediante precipitazione con solfato d'ammonio e dialisi delle frazioni ottenute, in

modo da eliminare i granuli di poliP. Sulle frazioni proteiche ottenute è stato poi eseguito nuovamente il saggio di quantificazione dell'attività fitasica/fofatasica.

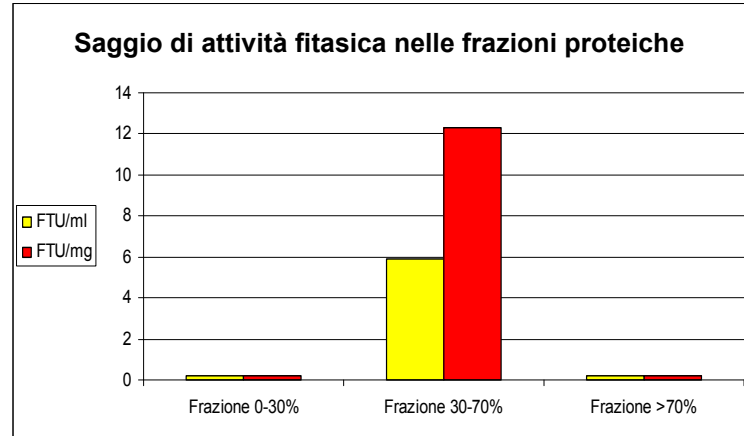
#### **4.2.3. Analisi dell'attività fitasica/fofatasica nelle frazioni proteiche ottenute mediante frazionamento dell'estratto cellulare con solfato di ammonio.**

L'estratto cellulare ottenuto in seguito a lisi delle cellule del ceppo 52 di *Aeromonas* sp. cresciute in terreno massimo CM, è stato sottoposto a frazionamento mediante precipitazione delle proteine con solfato di ammonio a concentrazioni crescenti (sezione 3.6.2), e le frazioni proteiche ottenute, denominate frazione 0-30%, frazione 30-70%, frazione >70%, sono state dializzate e saggate per la capacità di liberare il fosfato dal substrato Na-fitato in tampone a pH7 e a 39°C. La miscela di reazione è stata incubata per un periodo di 30 minuti ed i risultati ottenuti sono riportati in figura 7.

Per accertarsi che l'attività enzimatica rilevata fosse attività fitasica, e non una eventuale attività fofatasica residua nelle frazioni proteiche, ad opera di fofatasi che agiscono su composti fosforilati presenti nelle frazioni, il medesimo saggio è stato condotto sia in presenza che in assenza di Na-fitato.

Come si vede dal grafico (figura 7), nelle frazioni 0-30% e >70% non è stata rilevata alcuna attività fitasica, mentre nella frazione 30-70% è stato raggiunto un massimo di attività enzimatica (5,88 FTU/ml e 12,33 FTU/mg) dopo 30 minuti di incubazione a 39°C.

In mancanza del substrato, in nessuna delle frazioni proteiche, è stata rilevata alcuna attività enzimatica, pertanto, quella rilevata in presenza del substrato, è stata attribuita ad attività fitasica.

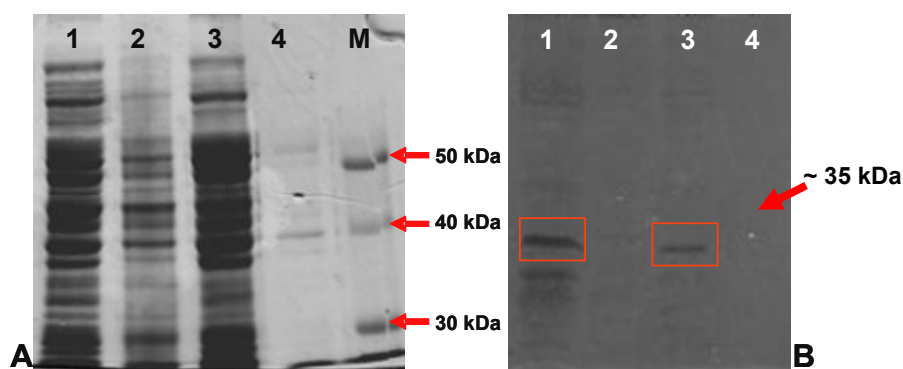


	Frazione 0-30%	Frazione 30-70%	Frazione >70%
<b>FTU/ml</b>	<b>0</b>	<b>5,88</b>	<b>0</b>
<b>FTU/mg</b>	<b>0</b>	<b>12,33</b>	<b>0</b>

**Figura 7: analisi dell'attività fitasica nelle frazioni proteiche ottenute mediante precipitazione con solfato di ammonio e dialisi.** Il saggio di quantificazione dell'attività fitasica è stato condotto in tampone Tris-HCl 100mM pH7, in presenza di Na-fitato (2mM). Sono riportati i massimi valori di attività fitasica registrati, espressi in FTU/ml di coltura e FTU/mg di proteine totali. FTU: unità di attività fitasica (sezione 3.6.5). La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo Bradford (sezione 3.6.3).

#### 4.2.4. Analisi dell'estratto cellulare del ceppo 52 di *Aeromonas* sp. e delle frazioni proteiche mediante SDS-page e Zimogramma

L'estratto cellulare del ceppo 52 di *Aeromonas* sp. e le frazioni proteiche, ottenute mediante precipitazione con solfato di ammonio e successiva dialisi, sono stati esaminati mediante l'analisi SDS-PAGE ed il saggio di attività enzimatica direttamente su gel, come descritto in Materiali e Metodi. I risultati sono riportati in figura 8.



**Figura 8: analisi dell' estratto cellulare e delle frazioni proteiche mediante SDS-PAGE e Zimogramma. A) SDS-PAGE:** gel 12% colorato con “blue coomassie R-250” per evidenziare le bande proteiche (sezione 3.6.4); **B) Zimogramma:** gel colorato per evidenziare gli aloni di degradazione del Na-fitato (sezione 3.6.4); lo zimogramma è stato condotto a 37°C in tampone Tris-HCl 100mM pH7, in presenza di Na-fitato 0,4%. **Corsia 1:** estratto cellulare; **corsia 2:** frazione 0-30%; **corsia 3:** frazione 30-70%; **corsia 4:** frazione >70%; **corsia M:** marcatore di pesi molecolari “Plus Protein Precision Standard” (Bio-Rad).

Come si vede nella figura 8, nell'estratto cellulare (corsia 1B) e nella frazione 30-70% (corsia 3B), è stata evidenziata una banda di attività in

corrispondenza di circa 35kDa, mentre nelle frazioni 0-30% e >70% (corsie 2B e 4B) non è presente nessun alone di degradazione del Na-fitato, confermando, così, i dati ottenuti con il saggio di quantificazione dell'attività fitasica eseguito nelle stesse condizioni di pH, sull'estratto cellulare e sulle frazioni proteiche.

I risultati ottenuti, sia con gli estratti cellulari grezzi che con le frazioni proteiche, indicano che la fitasi del ceppo 52 di *Aeromonas* sp. potrebbe appartenere al gruppo di fitasi definite neutro-alcaline, infatti mostra attività nell'intervallo di pH compreso tra pH5 e pH8 con attività ottimale a pH7. Il valore di temperatura ottimale di 40°C potrebbe essere un dato interessante da un punto di vista applicativo di questa fitasi come additivo nei mangimi per animali monogastrici, poiché si tratterebbe di una fitasi con attività ottimale a temperatura fisiologica, e meriterebbe un'indagine più approfondita sulle sue proprietà catalitiche.

Quelle condotte fino ad ora sono solo indagini preliminari, indicative dell'isolamento di un nuovo batterio produttore di fitasi appartenente al genere *Aeromonas*.

### **4.3. Isolamento di batteri produttori di fitasi: approccio computazionale**

Recentemente, Lim e collaboratori (2007), attraverso una analisi bioinformatica del “database” di genomi microbici sequenziati disponibili in NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) e CAMERA (“Community Cyberinfrastructure for Advanced Marine

Microbial Ecology Research and Analysis”) hanno determinato la distribuzione nel mondo microbico di 3 delle 4 principali classi di fitasi ad oggi caratterizzate, ossia “Histidine acid phosphatase phytase” (HAP), “ $\beta$  Propeller phytase” (BPP) e “Cysteine phosphatase phytase” (CPhy). Da questa analisi è emerso che, mentre sequenze “HAP-like” e “CPhy-like” si ritrovano solamente nei genomi sequenziati appartenenti a batteri del suolo ed associati alle piante, le sequenze “BPP-like” sono, invece, numerosissime e si ritrovano sia in batteri che popolano l’ambiente acquatico, sia nei batteri del suolo e in quelli associati alle piante; se tali geni putativi codifichino o meno fitasi funzionali rimane una questione ancora da chiarire.

Nonostante la presenza di un vasto numero di sequenze “BPP-like”, le fitasi “ $\beta$ -Propeller” fino ad oggi caratterizzate appartengono quasi esclusivamente al genere *Bacillus* (Kerovuo et al., 1998; Kim et al., 1998; Tye et al., 2002; Gulati et al., 2007), e solo recentemente è stata isolata la fitasi BPP PhyS appartenente al batterio gram negativo *Shewanella oneidensis* MR-1 (Cheng and Lim, 2006).

In questo lavoro di tesi, in seguito all’analisi del “database” di genomi microbici sequenziati disponibile in NCBI, alla ricerca di geni codificanti ipotetiche fitasi, è stato individuato il gene “BPP-like” appartenente al batterio gram negativo *Sphingomonas wittichii* RW1.

Questo batterio è un membro del genere *Sphingomonas*, che, filogeneticamente, forma un ristretto gruppo nella classe degli  $\alpha$ -proteobatteri, ed include batteri gram negativi strettamente aerobi che popolano una varietà di habitat quali suolo, sedimenti, oceani, laghi (Leys et al., 2004). *S. wittichii* RW1 è stato isolato circa 20 anni fa dal fiume Elba (Germania) per la sua capacità di mineralizzare

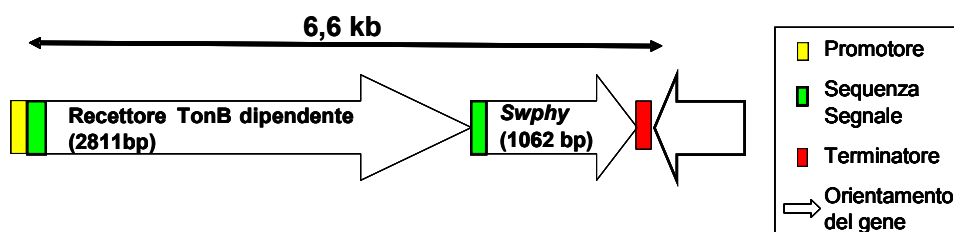


completamente lo scheletro organico sia della dibenzo-*p*-diossina che del dibenzofurano (Wittich et al., 1992), composti estremamente tossici per l'uomo e per gli animali, e di co-metabolizzare congeneri mono-e diclorurati (Megharaj et al., 1997; Wilkes et al., 1996).

Queste capacità metaboliche di *S. wittichii* RW1 sono molto rare e potenzialmente benefiche, ed hanno attirato l'attenzione degli studiosi alla ricerca di un metodo economico per la biorimediazione di suoli ed acque contaminati. Vista l'importanza rivestita da *S. wittichii* RW1 dal punto di vista del ripristino ambientale, lo stesso batterio è stato scelto, in questo lavoro di tesi, per studiarne la capacità di degradare l'acido fitico, un composto a cui sono legati problemi ambientali e nutrizionali.

In questo lavoro di tesi, il gene codificante la fitasi putativa di *S. wittichii* RW1 (GeneID: 5200658) è stato denominato *swphy*; la sua sequenza nucleotidica è di 1062 bp e la sequenza aminoacidica dedotta è di 353 aa. L'analisi della sequenza aminoacidica ha evidenziato un probabile peptide segnale nei primi 17 aa (figura 10) ed una massa molecolare della fitasi putativa matura, ossia priva del peptide segnale, pari a 34,33 kDa, mentre la massa molecolare della fitasi putativa precursore, quindi comprensiva del peptide segnale, è risultata pari a 36,06 kDa.

Il contesto genico di *swphy* è stato valutato analizzando una porzione del genoma di *S. wittichii* RW1 di circa 6,6 kb (Gi: 148553454 - 148553457) contenente il gene *swphy* ed i geni ad esso fiancheggiati, avvalendosi di diversi programmi per la predizione delle sequenze promotore e terminatore, e per la presenza di un eventuale operone (figura 9).



**Figura 9:** rappresentazione di una porzione di circa 6,6 kb del genoma di *S. wittichii* RW1 contenente il gene *swphy* ed i geni ad esso fiancheggiati.

In seguito a queste analisi, è emerso che *swphy* non possiede una sequenza promotore ma solo un terminatore; l'orientamento del gene immediatamente a valle di *swphy* è, rispetto a quest'ultimo, opposto, mentre il gene a monte di *swphy*, situato a 46 bp di distanza, ha il medesimo orientamento di *swphy*, codifica un recettore TonB dipendente (GeneID: 5200659), e possiede una sequenza promotore e non un terminatore. La prossimità di entrambi questi geni è significativa per il fatto che probabilmente sono cotrascritti come un operone con un promotore comune a monte del gene codificante il recettore TonB dipendente. Anche nel batterio gram negativo *S. oneidensis* MR-1, la cui attività fitasica come fitasi BPP è stata recentemente identificata, esiste questa associazione tra il gene codificante la fitasi PhyS ed un gene codificante un recettore TonB dipendente, il quale è situato a monte di *phyS* e a distanza di 27 bp (Lim et al., 2007).

Questo tipo di recettori sono proteine della membrana esterna dei batteri e sono coinvolti nell'“uptake”, nel periplasma, di cofattori organometallici o di “carriers” quali ferrosiderofori, porfirine, cobalamine (Ferguson and Deisenhofer, 2004). Essi legano questi substrati in modo molto specifico e realizzano un trasporto attivo attraverso la membrana esterna. L'energia necessaria per questo tipo di

trasporto è fornita dal complesso TonB-ExbBD, formato dalle proteine di membrana citoplasmatica TonB, ExbB e ExbD. L'unione della forza protonica attraverso la membrana citoplasmatica con cambiamenti conformazionali della proteina TonB fornisce la forza motrice per l'importo del carico attraverso il recettore TonB dipendente (Koebnik, 2005).

In base alla predizione del programma PSORT (Nakai and Horton, 1999), la fitasi putativa di *S. wittichii* RW1 dovrebbe avere una localizzazione periplasmatica, pertanto, molto probabilmente, il fitato viene importato nel periplasma attraverso un processo energetico che coinvolge un sistema TonB, e viene poi degradato dalla fitasi ivi presente.

In un ceppo di *Pseudomonas aeruginosa* è stato indicato che il fitato svolgerebbe una funzione di sideroforo, in quanto l'“uptake” del ferro avviene sostanzialmente nella forma di Fe-fitato (Smith et al., 1994); Hirst e collaboratori (1999) hanno poi dimostrato che anche mio-inositolo tri- e tetra-fosfato sono in grado di facilitare il trasporto del ferro in *P. aeruginosa*. Ciò implica, quindi, che il fitato possa essere utile ai microrganismi come fonte non solo di fosfato, ma anche di ferro.

Attraverso l'analisi BLAST-P (sezione 3.5), la sequenza aminoacidica della fitasi putativa di *S. wittichii* RW1, dedotta da quella nucleotidica del gene *swphy*, è stata confrontata con il “database” di sequenze proteiche disponibile in NCBI. Da questa analisi è emersa una similarità pari a 37% con le fitasi BPP PhyC di *B. subtilis* e PhyL di *B. licheniformis*, ed una similarità del 38% con le fitasi BPP Ts-phy di *B. amyiloliquefaciens* e 168PhyA di *B. subtilis* 168.



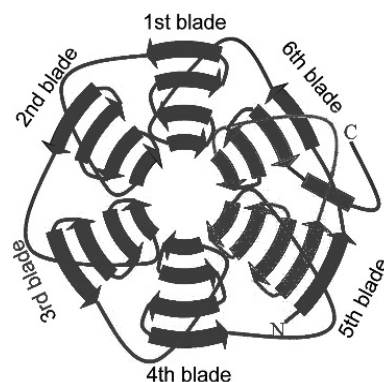
fitasi BPP ad oggi caratterizzate, sono conservati anche nella fitasi putativa di *S. wittichii* RW1. Inoltre, come è stato rilevato nella fitasi PhyS di *S. oneidensis* MR-1, anche la sequenza aminoacidica della fitasi putativa di *S. wittichii* RW1 presenta due residui di cisteina, rispettivamente alla posizione 158 e 206 della sequenza aminoacidica, che potrebbero formare un ponte disolfuro tale da stabilizzare la proteina nel compartimento periplasmatico (Cheng et al., 2007). Diversamente, le fitasi BPP di *Bacillus* sp. ad oggi caratterizzate, non hanno ponti disolfuro; la mancanza dello spazio periplasmatico in questi batteri gram positivi, ed il fatto che le fitasi BPP appartenenti a questa specie sono extracellulari, potrebbero rendere ponti disolfuro non necessari (Cheng et al., 2007).

Il programma SWISS MODEL ha generato un modello tridimensionale, per omologia, del dominio di SWPHY, utilizzando la fitasi Ts-phy di *B. amyloliquefaciens* come modello (“Protein Data Bank” ID, 1POO), e la struttura predetta è stata quella di tipo “ $\beta$ -propeller” a 6 pale. La conformazione “ $\beta$ -propeller” si ritrova non solo nelle fitasi, ma anche in numerose proteine con diversa funzionalità; è una struttura simmetrica costituita da 4 a 8 pale (“blade”) ripetute, ognuna delle quali è composta da un motivo foglietto  $\beta$  a 4-5 filamenti antiparalleli (Fülöp and Jones, 1999).

La figura 11 mostra un esempio di struttura “ $\beta$ -propeller” a 6 pale.

In base ai dati ottenuti in seguito ad analisi computazionale delle sequenze nucleotidica di *swphy* e della sua sequenza aminoacidica dedotta, è stato dunque ipotizzato che la proteina “BPP-like” codificata dal gene *swphy* di *S. wittichii* RW1 avesse attività fitasica. Si è proceduto, quindi, alla sua caratterizzazione preliminare, eseguendo il

saggio di quantificazione dell'attività fitasica dapprima sugli estratti cellulari grezzi, e successivamente sulle frazioni proteiche ottenute mediante frazionamento dell'estratto cellulare con solfato di ammonio.



**Figura 11: esempio di struttura  $\beta$ -propeller a 6 pale (“Blade”).** Ogni pala (“blade”) è costituita da un motivo foglietto  $\beta$  a 4-5 filamenti antiparalleli.

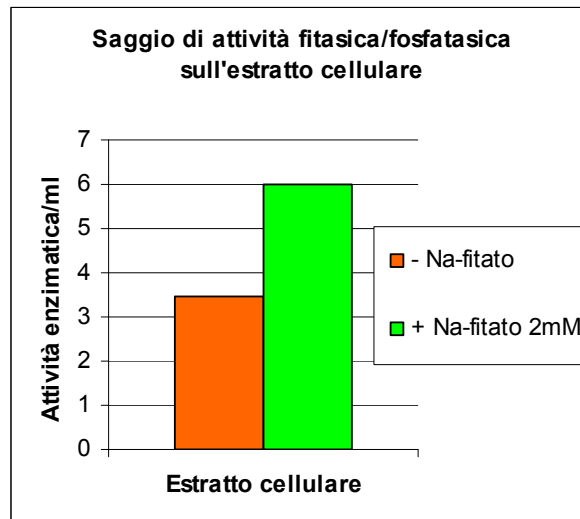
#### **4.4. Caratterizzazione preliminare dell'attività fitasica/fosfatasica di *Sphingomonas wittichii* RW1**

L'incapacità di *S. wittichii* RW1 di crescere in terreno minimo MPSM non ha permesso di eseguire il test di Bae (Bae et al., 1999) per evidenziarne direttamente e visivamente su piastra Petri la sua capacità di degradare il Na-fitato. La presenza di attività fitasica è stata quindi valutata direttamente attraverso il saggio di quantificazione dell'attività enzimatica, eseguito sull'estratto cellulare e sulle frazioni proteiche, e mediante Zimogramma (sezione 3.6.4) eseguito sull'estratto cellulare.

#### **4.4.1. Saggio di quantificazione dell'attività fitasica/fofatasica presente nell'estratto cellulare di *S. wittichii* RW1**

Le cellule di *S. wittichii* RW1, cresciute in terreno massimo M1, sono state lisate mediante rottura in mortaio con polvere di allumina, e l'estratto cellulare ottenuto è stato saggiato per la capacità di liberare il fosfato dal Na-fitato. L'attività fitasica è stata misurata dopo 30 minuti di incubazione a 39°C in tampone a pH6, in presenza del substrato Na-fitato. Il medesimo saggio è stato condotto anche incubando l'estratto cellulare nel tampone a pH6 in assenza del substrato Na-fitato, per rilevare una eventuale attività fosfatasica su composti fosforilati presenti nell'estratto cellulare quali, ad esempio, granuli di polifosfato. I risultati ottenuti sono riportati in figura 12.

Come evidenziato nel grafico (figura 12), l'attività enzimatica rilevata in assenza del substrato Na-fitato, pari a 3,47 nmoli Pi/min/ml, è stata considerata come attività fosfatasica ad opera delle fosfatasi presenti nell'estratto cellulare. La maggiore attività enzimatica rilevata in presenza del substrato Na-fitato, rispetto a quella rilevata in assenza del substrato, è stata attribuita ad un sinergismo dell'attività fitasica ad opera della fitasi di *S. wittichii* RW1 e dell'attività fosfatasica ad opera delle fosfatasi presenti nell'estratto cellulare. Ad ulteriore conferma della presenza di attività fitasica nell'estratto cellulare di *S. wittichii* RW1 è stato eseguito il saggio di attività fitasica direttamente nel gel (zimogramma) (sezione 3.6.4.)



	+ Na-fitato (2mM)	- Na-fitato
pH6	6,02 FTU/ml	3,47 nmoli Pi/min/ml

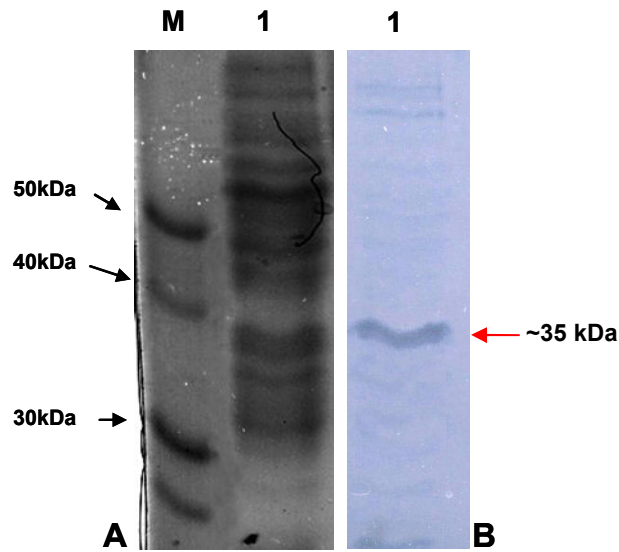
**Figura 12: saggio di attività fitasica/fosfatasica dell'estratto cellulare di *S. wittichii* RW1.** Il saggio di quantificazione dell'attività fitasica è stato condotto in tampone Na-acetato 100mM pH6, in presenza e in assenza del substrato Na-fitato. L'attività enzimatica rilevata in presenza di Na-fitato (2mM) è espressa in FTU/ml di coltura (FTU: unità di attività fitasica (sezione 3.6.5.)). L'attività enzimatica rilevata in assenza del substrato Na-fitato è attività fosfatasica e non fitasica, ed è espressa in nmoli di fosfato (Pi) liberati per minuto per ml di coltura.

#### **4.4.2. Analisi dell'estratto cellulare di *S. wittichii* RW1 mediante SDS-PAGE e Zimogramma**

L'estratto cellulare di *S. wittichii* RW1 è stato quindi esaminato mediante l'analisi SDS-PAGE ed il saggio di attività enzimatica eseguito



direttamente nel gel (zimogramma) condotto in tampone a pH6. I risultati sono riportati in figura 13.



**Figura 13: analisi dell’estratto cellulare mediante SDS-PAGE e Zimogramma. A)** SDS-PAGE: gel 12% colorato con “blue coomassie R-250” per evidenziare le bande proteiche (sezione 3.6.4.); **B)** Zimogramma: gel colorato per evidenziare l’alone di degradazione del Na-fitato (sezione 3.6.4.); lo zimogramma è stato condotto a 37°C in tampone Na-acetato 100mM pH6, in presenza di Na-fitato 0,4%. **Corsia 1:** estratto cellulare; **corsia M:** marcatore di pesi molecolari “Plus Protein Precision Standard” (Bio-Rad).

Come mostrato in figura 13B, è stata evidenziata una banda di attività (corsia 1B) corrispondente a circa 35 kDa, che si avvicina alle dimensioni attese della fitasi putativa di *S. wittichii* RW1 in base all’analisi della sequenza aminoacidica dedotta, confermando così i dati ottenuti con il saggio di quantificazione dell’attività fitasica condotto nelle stesse condizioni di pH (sezione 4.4.1). È stata quindi eseguita una

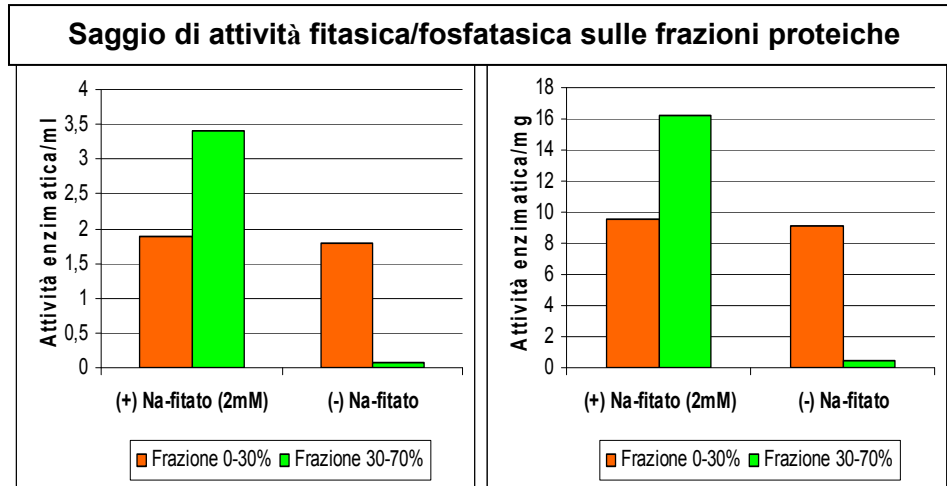
parziale purificazione dell'estratto cellulare mediante frazionamento con solfato di ammonio, e sulle frazioni proteiche ottenute è stato eseguito il saggio di attività fitasica/fofosfatasica.

#### **4.4.3. Analisi dell'attività fitasica/fofosfatasica delle frazioni proteiche ottenute mediante frazionamento dell'estratto cellulare con solfato di ammonio.**

L'estratto cellulare di *S. wittichii* RW1 è stato sottoposto a precipitazione frazionata con solfato di ammonio, con l'intenzione di eliminare i granuli di polifosfato probabilmente presenti nell'estratto. Essi, infatti, rappresentando un substrato per le fosfatasi, potrebbero confondere i risultati del saggio di attività enzimatica. Le frazioni proteiche ottenute (frazione 0-30%, frazione 30-70%) sono state dializzate per eliminare il sale, ed è stato eseguito nuovamente il saggio di quantificazione dell'attività fitasica. Il saggio è stato condotto in tampone a pH6, in presenza ed in assenza del substrato Na-fitato, incubando a 39°C per un periodo complessivo di 30 minuti, e prelevando ad intervalli regolari di 15 minuti. I risultati ottenuti sono rappresentati in figura 14. In essa vengono rappresentati i massimi valori di attività enzimatica, registrati dopo 15 minuti di incubazione.

Come evidenziato nel grafico (figura 14), nella frazione proteica 0-30% la massima attività enzimatica, rilevata dopo 15 minuti di incubazione a 39°C, pari a 1,89 FTU/ml e 9,57 FTU/mg, è equiparabile a quella rilevata in assenza di substrato, pari a 1,80 nmoli Pi/min/ml e 9,10 nmoli Pi/min/mg, ed è stata attribuita ad attività fosfatasica ad opera di fosfatasi che agiscono su composti fosforilati presenti nella frazione, e non ad

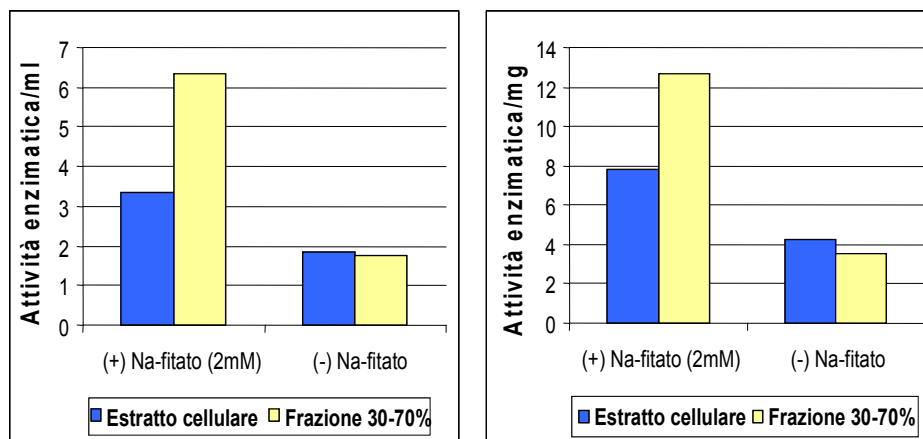
attività fitasica. Nella frazione proteica 30-70%, la massima attività enzimatica rilevata dopo 15' di incubazione a 39°C in presenza del substrato Na-fitato, pari a 3,41 FTU/ml e 16,19 FTU/mg, è stata attribuita, invece, ad attività fitasica e non fosfatasica, non essendo stata rilevata alcuna attività enzimatica in assenza del substrato Na-fitato. In questa frazione era quindi presente la fitasi di *S. wittichii* RW1.



	Frazione 0-30%	Frazione 30-70%
<b>(+) Na-fitato (2mM)</b>	1,89 FTU/ml 9,57 FTU/mg	3,41 FTU/ml 16,19 FTU/mg
<b>(-) Na-fitato</b>	1,80 nmoli Pi/min/ml 9,10 nmoli Pi/min/mg	0

**Figura 14: saggio di attività fitasica/fosfatasica sulle frazioni proteiche.** Il saggio è stato condotto sulle frazioni proteiche 0-30% e 30-70% in tampone Na-acetato 100mM pH6, in presenza e in assenza del substrato Na-fitato. La massima attività enzimatica è stata rilevata dopo 15 minuti di incubazione a 39°C, in presenza di Na-fitato (2mM), ed è espressa in FTU/ml di coltura e FTU/mg di proteine totali (FTU: unità di attività fitasica (sezione 3.6.5.)); quella rilevata in assenza del substrato Na-fitato è considerata attività fosfatasica e non fitasica, ed è espressa in nmoli di fosfato (Pi) liberati per minuto, per ml di coltura. La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo Bradford (sezione 3.6.3.).

Il medesimo saggio è stato poi condotto in tampone a pH8, sia sull'estratto cellulare di *S. wittichii* RW1 che sulla frazione proteica 30-70% ottenuta in seguito a precipitazione dell'estratto grezzo con solfato di ammonio e dialisi delle frazioni. I risultati ottenuti sono riportati in figura 15.



	Estratto cellulare	Frazione 30-70%
<b>(+) Na-fitato (2mM)</b>	3,35 FTU/ml 7,76 FTU/mg	6,32 FTU/ml 12,64 FTU/mg
<b>(-) Na-fitato</b>	1,84 nmoli Pi/min/ml 4,28 nmoli Pi/min/mg	1,78 nmoli Pi/min/ml 3,56 nmoli Pi/min/mg

**Figura 15: saggio di attività fitasica/fofatasica sull estratto cellulare e sulla frazione proteica 30-70%.** Il saggio è stato condotto tampone Tris-HCl 100mM pH8, in presenza e in assenza del substrato Na-fitato. La massima attività enzimatica, rilevata dopo 15 minuti di incubazione a 39°C, in presenza di Na-fitato (2mM) è espressa in FTU/ml di coltura e FTU/mg di proteine totali (FTU: unità di attività fitasica (sezione 3.6.5)); quella rilevata in assenza del substrato Na-fitato è attività fofatasica e non fitasica, ed è espressa in nmoli di fosfato (Pi) liberati per minuto per ml di coltura. La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo Bradford (sezione 3.6.3.).

L'attività enzimatica rilevata in assenza di Na-fitato, sia nell'estratto cellulare che nella frazione proteica 30-70%, è equiparabile, ed è stata considerata come attività fosfatasica ad opera di fosfatasi presenti nell'uno e nell'altra. La maggiore attività enzimatica rilevata in entrambi i casi in presenza del substrato Na-fitato, rispetto a quella rilevata in assenza del substrato, è stata attribuita, invece, ad un sinergismo dell'attività fitasica, ad opera della fitasi di *S. wittichii* RW1, e dell'attività fosfatasica ad opera delle fosfatasi presenti. Diversamente, nel primo saggio eseguito a pH6, non è stata rilevata alcuna attività enzimatica nella frazione 30-70% in assenza del substrato (figura 14). Una spiegazione possibile può consistere nel fatto che, trattandosi di frazioni proteiche derivate dal frazionamento di due estratti cellulari ottenuti in due esperimenti indipendenti, nel secondo caso, a causa di un errore nel processo di purificazione, non sono stati eliminati completamente i granuli di poliP, quindi nella frazione 30-70% sono state rilevate entrambe le attività enzimatiche.

### **4.5. Clonaggio del gene *swphy***

Le indagini preliminari eseguite sugli estratti cellulari di *S. wittichii* RW1 e sulle frazioni proteiche ottenute mediante il processo di purificazione con solfato di ammonio e dialisi delle frazioni, hanno evidenziato che il batterio *S. wittichii* RW1 possiede attività fitasica.

Al fine di verificare che il gene *swphy* codificasse una proteina con attività fitasica, si è proceduto al suo clonaggio nei vettori di espressione pET15b e pET26b, che permettono di ottenere la proteina di interesse in

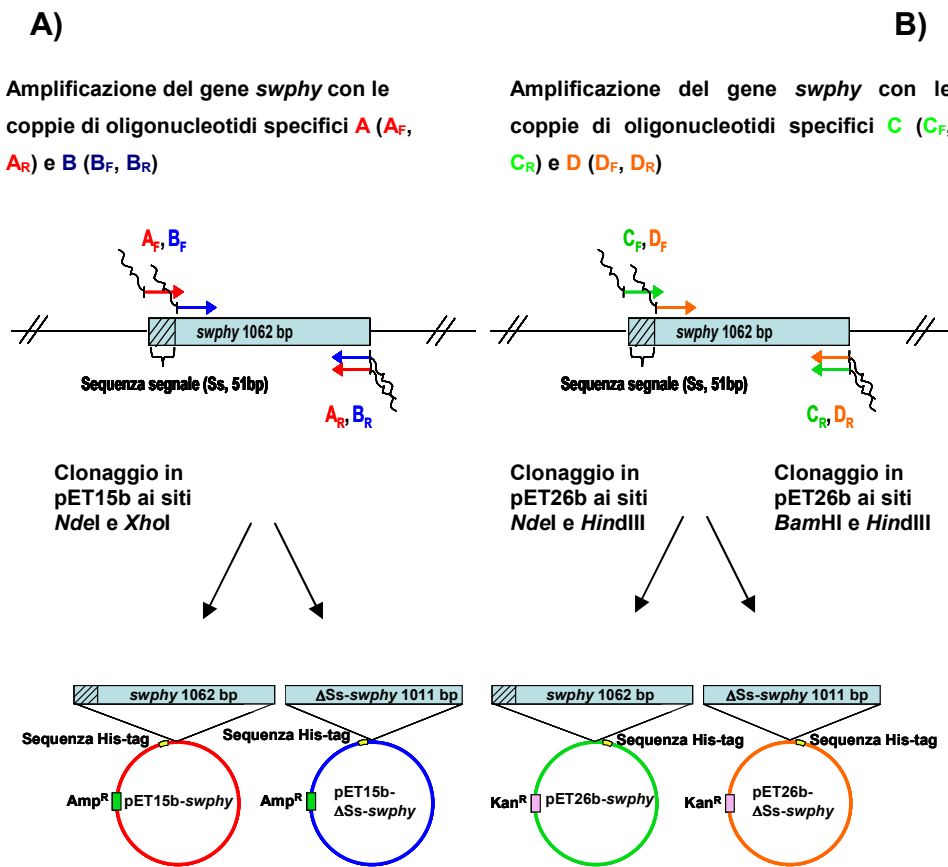
fusione, rispettivamente, con un His-tag N-terminale e con un His-tag C-terminale. Non sapendo se la presenza dell'His-tag ad una delle estremità della proteina ricombinante potesse creare interferenze con il corretto “folding” e/o con l'attività enzimatica, sono state testate entrambe le possibilità di fusione con l'His-tag, N-terminale e C-terminale. Il ceppo JM109 di *E. coli* è stato utilizzato come ospite per il clonaggio. Le fasi del clonaggio sono rappresentate in figura 16 e descritte nella sezione 4.5.

In entrambi i vettori di espressione utilizzati, è stato clonato il gene *swphy* nella sua totalità, quindi comprensivo di sequenza segnale (Ss), che codifica il peptide segnale, ed il gene privato della stessa.

Il clonaggio in pET15b (figura 16A) ha previsto l'amplificazione del gene *swphy*, a partire dal DNA genomico di *S. wittichii* RW1, utilizzando due coppie di oligonucleotidi specifici A ( $A_F+A_R$ ) e B ( $B_F+B_R$ ), mentre per il clonaggio in pET26b (figura 16B) sono state utilizzate le coppie di oligonucleotidi specifici C ( $C_F+C_R$ ) e D ( $D_F+D_R$ ). Le coppie A e C, hanno amplificato il gene *swphy* nella sua totalità, portando ad un prodotto di amplificazione di 1062 bp, comprendente la sequenza segnale (Ss) di 51 bp; le coppie B e D hanno amplificato il gene *swphy* escludendo la Ss, portando ad un prodotto di amplificazione di 1011 bp, denominato  $\Delta Ss$ -*swphy*.

I costrutti molecolari ottenuti (pET15b-*swphy*, pET15b- $\Delta Ss$ -*swphy*, pET26b-*swphy*, pET26b- $\Delta Ss$ -*swphy*) (figura 16) sono stati sottoposti a sequenziamento utilizzando gli oligonucleotidi vettore-specifici “T<sub>7</sub> promoter primer” e “T<sub>7</sub> terminator primer”, per verificare la correttezza del clonaggio, e sono stati poi utilizzati per trasformare il ceppo

BL21(DE3) di *E. coli*, utilizzato come ospite per l'espressione dei geni di interesse.



**Figura 16: clonaggio del gene *swphy*.** **A)** clonaggio nel vettore di espressione pET15b in fusione con la sequenza His-tag-codificante all'estremità 5'; **B)** clonaggio nel vettore di espressione pET26b in fusione con la sequenza His-tag-codificante all'estremità 3'. Le coppie **A** e **C** di oligonucleotidi specifici (sezione 3.7.2.) amplificano il gene *swphy* nella sua totalità (*swphy*, 1061 bp); le coppie **B** e **D** di oligonucleotidi specifici (sezione 3.7.2.) amplificano il gene *swphy* escludendo la sequenza segnale Ss ( $\Delta Ss-swphy$ , 1011 bp). F ("Forward") indica l'oligonucleotide senso; R ("Reverse") indica l'oligonucleotide antisense.

## 4.6. Espressione del gene *swphy* in *Escherichia coli*

Le cellule di *E. coli* BL21(DE3) trasformate con i costrutti molecolari pET15b-*swphy*, pET15b- $\Delta$ Ss-*swphy*, pET26b-*swphy*, pET26b- $\Delta$ Ss-*swphy*, sono state fatte crescere fino al raggiungimento di una OD<sub>600nm</sub> = 0.6, e l'induzione dell'espressione del gene *swphy*, con e senza sequenza segnale (indicato come *swphy* e  $\Delta$ Ss-*swphy*, rispettivamente), è avvenuta come descritto nella sezione 3.8.2. Le colture cellulari indotte, ed i controlli non indotti, sono stati poi sottoposti a lisi cellulare, e le proteine cellulari totali, indicate come frazione TCP ("Total Cell Protein"), e le frazioni citoplasmatiche solubili, ottenute come descritto in Materiali e Metodi, sono state esaminate mediante l'analisi SDS-PAGE, per verificare il livello di espressione del gene *swphy*.

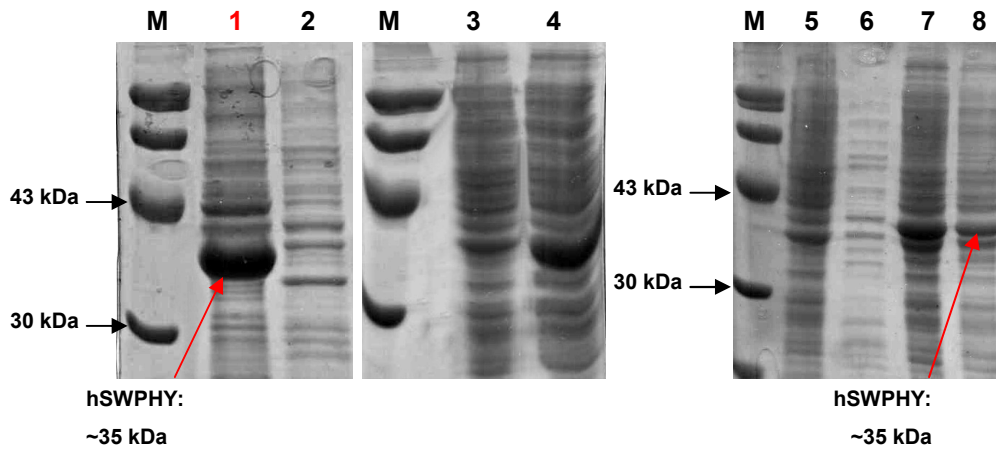
La fitasi comprensiva del peptide segnale, espressa come fusione tra la proteina stessa ed il "tag" di istidina codificato dal vettore, è stata denominata hpSWPHY, e le sue dimensioni attese erano pari a 36,88 kDa, la fitasi matura, ossia senza il peptide segnale, sempre espressa come fusione con il "tag" di istidina, è stata denominata hSWPHY, e le sue dimensioni attese erano pari a 35,15 kDa. I risultati ottenuti sono mostrati nelle figure 17 e 18.

In condizioni di induzione la frazione citoplasmatica solubile derivante da colture di BL21(DE3) contenenti il gene *swphy* privo della sequenza segnale Ss ( $\Delta$ Ss-*swphy*) e clonato in pET15b (figura 17, corsia 1), ha mostrato una banda di espressione di circa 35 kDa, dimensioni attese della fitasi ricombinante hSWPHY.

Anche nel caso di  $\Delta$ Ss-*swphy* clonato in pET26b, è stata rilevata la proteina hSWPHY nella frazione citoplasmatica solubile (figura 17,



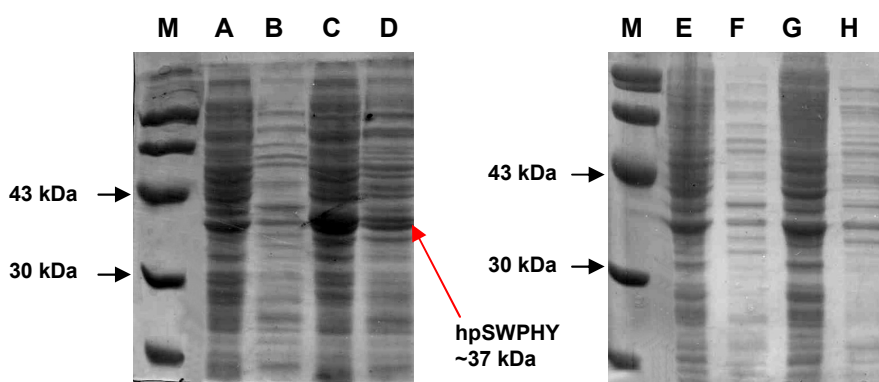
corsia 8), tuttavia la banda di espressione rilevata in questa frazione, rispetto a quella evidenziata nella frazione citoplasmatica solubile derivante da  $\Delta Ss-swphy$  clonato in pET15b (figura 17, corsia 1), a parità di condizioni sperimentali, era meno intensa.



**Figura 17: analisi dell'espressione di  $\Delta Ss-swphy$  mediante SDS-PAGE.** Gel 12% colorato con "blue coomassie R-250" per evidenziare le bande proteiche (sezione 3.6.4.). **Corsia 1:** frazione citoplasmatica solubile pET15b- $\Delta Ss-swphy$  Indotto; **corsia 2:** frazione citoplasmatica solubile pET15b- $\Delta Ss-swphy$  Non Indotto; **corsia 3:** frazione TCP pET15b- $\Delta Ss-swphy$  non Indotto; **corsia 4:** frazione TCP pET15b- $\Delta Ss-swphy$  Indotto; **corsia 5:** frazione TCP pET26b- $\Delta Ss-swphy$  Non Indotto; **corsia 6:** frazione citoplasmatica solubile pET26b- $\Delta Ss-swphy$  Non Indotto; **corsia 7:** frazione TCP pET26b- $\Delta Ss-swphy$  Indotto; **corsia 8:** frazione citoplasmatica solubile pET26b- $\Delta Ss-swphy$  Indotto; **corsia M:** marcatore di pesi molecolari "Low Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis" (Pharmacia Biotech).

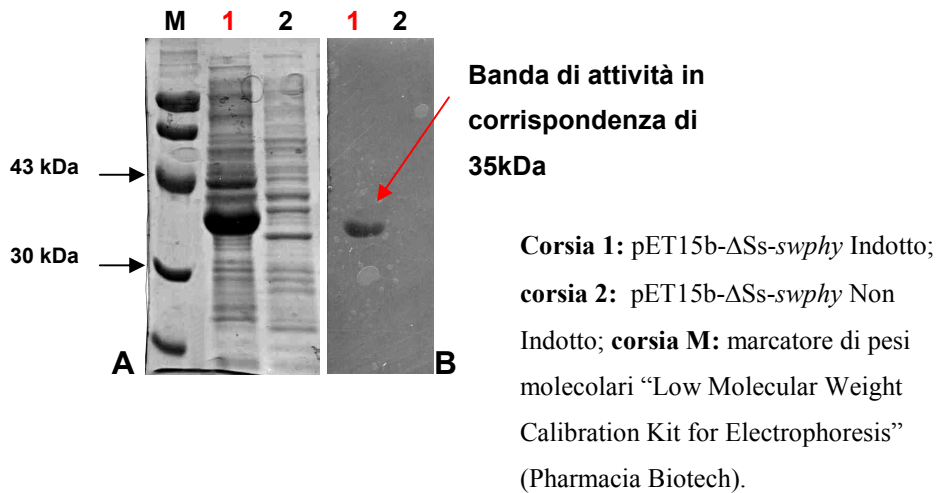
Per ciò che riguarda il gene *swphy* comprensivo della sua sequenza segnale, clonato sia in pET15b che in pET26b, non sono state evidenziate

bande di espressione significative (figura 18): nel caso del clonaggio in pET26b, non vi è stata differenza tra condizione non indotta e condizione indotta, sia nella frazione TCP che nella frazione citoplasmatica solubile; nel caso del clonaggio in pET15b, una banda di espressione è stata rilevata in condizioni di induzione nella frazione TCP (figura 18, corsia C), tuttavia, la banda di espressione presente nella frazione citoplasmatica solubile (figura 18, corsia D), era molto lieve, indicando che probabilmente la presenza del peptide segnale ha interferito con il corretto “folding” della proteina hpSWPHY, ed ha portato alla formazione di corpi di inclusione.



**Figura 18: analisi dell’espressione di *swphy* (con sequenza segnale) mediante SDS-PAGE.** Gel 12% colorato con “blue coomassie R-250” per evidenziare le bande proteiche (sezione 3.6.4.). **Corsia A:** frazione TCP pET15b-*swphy* Non Indotto; **corsia B:** frazione citoplasmatica solubile pET15b-*swphy* Non Indotto; **corsia C:** frazione TCP pET15b-*swphy* Indotto; **corsia D:** frazione citoplasmatica solubile pET15b-*swphy* Indotto; **corsia E:** frazione TCP pET26b-*swphy* Non Indotto; **corsia F:** frazione citoplasmatica solubile pET26b-*swphy* Non Indotto; **corsia G:** frazione TCP pET26b-*swphy* Indotto; **corsia H:** frazione citoplasmatica solubile pET26b-*swphy* Indotto; **corsia M:** marcatore di pesi molecolari “Low Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis” (Pharmacia Biotech).

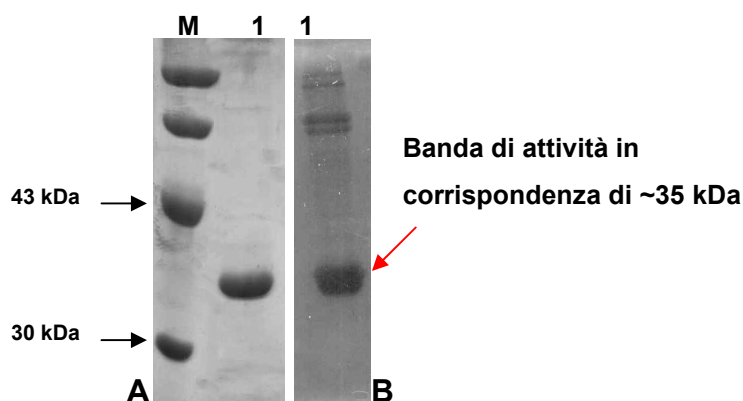
Sulla frazione citoplasmatica solubile contenente la proteina ricombinante hSWPHY derivante da  $\Delta Ss$ -*swphy* clonato in pET15b (figura 17, corsia 1) e su quella derivante dalla medesima coltura di BL21(DE3) pET-ricombinante non sottoposta ad induzione, è stato eseguito il saggio di attività enzimatica direttamente su gel (sezione 3.6.4), per verificare che la proteina ricombinante fosse prodotta in forma attiva. Lo zimogramma è stato condotto a pH6, condizione di pH a cui sono stati eseguiti il saggio di quantificazione dell'attività fitasica e lo zimogramma sull'estratto cellulare (sezione 4.4). I risultati ottenuti sono mostrati in figura 19.



**Figura 19: analisi dell'attività fitasica della proteina ricombinante hSWPHY.**

**A)** Analisi SDS-PAGE: gel 12% colorato con “blue coomassie R-250” per evidenziare le bande proteiche (sezione 3.6.4.); **B)** Zimogramma: gel colorato per evidenziare gli aloni di degradazione del Na-fitato (sezione 3.6.4.); lo zimogramma è stato condotto a 37°C in tampone Na-acetato 100mM pH6, in presenza di Na-fitato 0,4%. La corsia 1 evidenzia una banda di attività in corrispondenza di circa 35kDa.

Lo zimogramma (figura 19B) ha rilevato nella frazione citoplasmatica solubile derivante dalla coltura sottoposta ad induzione (corsia 1B), una banda di attività in corrispondenza di circa 35 kDa, che è stata, quindi, attribuita alla banda proteica evidenziata nella stessa frazione mediante l'analisi SDS-PAGE (figura 19A, corsia 1). L'espressione del gene  $\Delta Ss\text{-}swphy$ , clonato nel vettore di espressione pET15b, in seguito ad induzione, ha portato, quindi, alla produzione in forma attiva della fitasi ricombinante hSWPHY. Grazie alla presenza del "tag" di istidina N-terminale, è stato possibile purificare la proteina hSWPHY. Il prodotto della purificazione è stato poi analizzato mediante l'analisi SDS-PAGE e ne è stato verificato il mantenimento dell'attività enzimatica attraverso zimogramma (sezione 3.6.4) condotto a pH6. La figura 20 mostra i risultati ottenuti.



**Figura 20: analisi della proteina purificata hSWPHY mediante SDS-PAGE e Zimogramma.** **A)** Analisi SDS PAGE: gel 12% colorato con "blue coomassie R-250" per evidenziare le bande proteiche (sezione 3.6.4.); **B)** Zimogramma: gel colorato per evidenziare gli aloni di degradazione del Na-fitato (sezione 3.6.4.); lo zimogramma è stato condotto a 37°C in tampone Na-acetato 100mM pH6, in presenza di Na-fitato 0,4%. **Corsia 1:** proteina hSWPHY ottenuta in seguito a purificazione (sezione 3.8.4.); **corsia M:** marcatore di pesi molecolari "Low Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis" (Pharmacia Biotech).

Come mostrato nella figura 20B, è stata rilevata una banda di attività in corrispondenza di 35 kDa, confermando così l'attività fitasica della proteina purificata hSWPHY.

#### **4.7. Analisi delle proprietà catalitiche della fitasi ricombinante hSWPHY**

Le proprietà catalitiche della proteina purificata hSWPHY (sezione 3.8.4), quali dipendenza dell'attività enzimatica dalla presenza di ioni metallici, pH ottimale di attività e stabilità dell'enzima a differenti valori di pH, temperatura ottimale di attività e termostabilità, specificità di substrato, resistenza alla proteolisi, sono state analizzate mediante il saggio di quantificazione dell'attività fitasica (sezione 3.9.).

##### **4.7.1. Effetto di ioni metallici sull'attività fitasica della fitasi ricombinante hSWPHY**

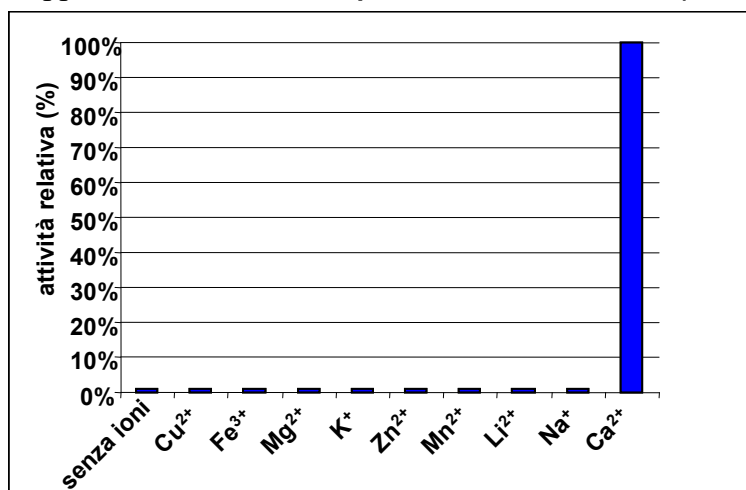
La caratteristica distintiva delle fitasi “ $\beta$ -propeller” è la dipendenza dell'attività catalitica e della stabilità enzimatica dalla presenza degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$ . Ha e collaboratori (2000) hanno determinato la struttura cristallina della fitasi TS-phy di *B. amyloliquefaciens* ed i residui aminoacidici coinvolti nel legame con il calcio e con il fosfato (figura 10).

Dall'analisi computazionale della sequenza aminoacidica della fitasi SWPHY è emerso che si tratta di una sequenza “BPP-like”, e che la

struttura tridimensionale è di tipo “ $\beta$ -propeller” a sei pale, pertanto è stata valutata l’influenza sull’attività enzimatica della fitasi ricombinante hSWPHY degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  ed anche di diversi ioni metallici riconosciuti come modulatori dell’attività delle fitasi, ed i risultati sono rappresentati nella figura 21.

L’attività fitasica di hSWPHY è stata misurata dopo 20 minuti di incubazione a  $39^\circ\text{C}$  in tampone a pH6, in presenza del substrato Na-fitato e degli ioni metallici  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Li}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  (1mM). L’attività enzimatica è stata anche valutata in assenza di ioni metallici.

**Saggio di attività fitasica in presenza di ioni metallici (1mM)**



**Figura 21: effetto di ioni metallici sull’attività fitasica di hSWPHY.** Il saggio di quantificazione dell’attività fitasica è stato condotto in tampone Na-acetato 100mM pH6, in presenza del substrato Na-fitato (2mM) ed in assenza e presenza degli ioni metallici  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Li}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  alla concentrazione di 1mM (sezione 3.9.2). L’attività fitasica, misurata dopo 20 minuti di incubazione a  $39^\circ\text{C}$ , è espressa come attività relativa (%), considerando 100% l’attività massima misurata.

Da questa analisi è emerso che la capacità della proteina ricombinante hSWPHY di degradare il fitato è fortemente dipendente dalla presenza di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  nella miscela di reazione, ed è invece nulla sia in assenza di ioni metallici, sia in presenza di ioni metallici diversi dagli ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , confermando così l'appartenenza di SWPHY alla classe di fitasi "β-propeller".

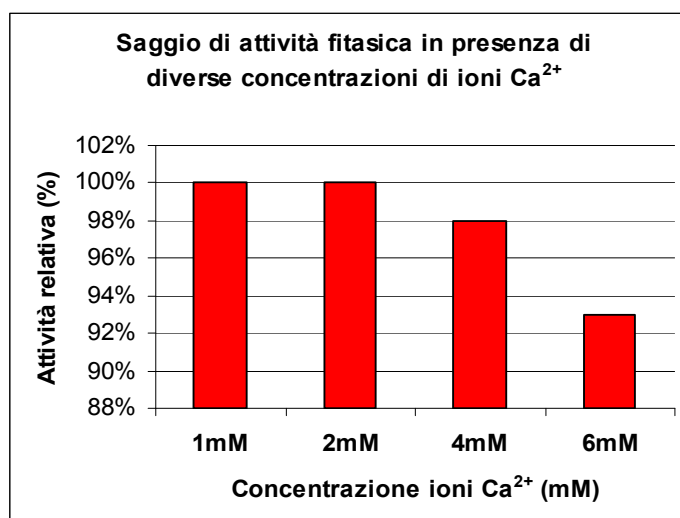
Gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  non solo agiscono come attivatori e stabilizzatori delle fitasi BPP, legandosi ai siti specifici di legame per il calcio, ma sono anche richiesti per formare il complesso Ca-fitato, che è stato dimostrato essere il substrato per l'azione idrolitica delle fitasi BPP (Oh et al., 2001). La concentrazione degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  è, quindi, un fattore cruciale per l'attività delle fitasi BPP (Oh et al., 2001; Cheng and Lim, 2006). Concentrazioni troppo elevate di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  possono portare ad una inibizione dell'attività enzimatica, poiché il calcio in eccesso rispetto al fitato che può complessare, può occupare il sito attivo dell'enzima, impedendo così il legame del complesso Ca-fitato; allo stesso modo concentrazioni troppo basse di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  rispetto al fitato, fanno sì che il fitato non complessato con il calcio agisca esso stesso come inibitore competitivo, occupando il sito catalitico dell'enzima (Oh et al., 2001).

È stato dimostrato che la concentrazione ottimale per l'attività delle fitasi BPP di *Bacillus*, in presenza di Na-fitato 2mM, è pari a 1-2 mM, mentre la concentrazione ottimale per l'attività di PhyS di *S. oneidensis* è pari a 4mM.

Per valutare quale fosse la concentrazione di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  ottimale per l'attività enzimatica della fitasi hSWPHY, il medesimo saggio di attività eseguito per valutare l'effetto degli ioni minerali, è stato condotto

utilizzando diverse concentrazioni di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  (1mM, 2mM, 4mM, 6mM) nella miscela di reazione.

I risultati ottenuti sono mostrati in figura 22.



**Figura 22: effetto di diverse concentrazioni di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  sull'attività fitasica di hSWPHY.** Il saggio è stato condotto in tampone Na-acetato 100mM pH6, in presenza del substrato Na-fitato (2mM) e di diverse concentrazioni di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  (1mM, 2mM, 4mM, 6mM). L'attività fitasica, misurata dopo 20 minuti di incubazione a 39°C, è espressa come attività relativa (%), considerando 100% l'attività massima misurata.

La massima attività enzimatica (100%) è stata rilevata a concentrazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  pari a 1mM e 2mM, mentre a concentrazioni superiori, pari a 4mM e 6mM, si è avvertito un lieve calo nell'attività fitasica misurata, corrispondente, rispettivamente, al 98% e 93% dell'attività massima. Questo calo di attività fitasica, registrato con l'aumentare della concentrazione degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , ha portato a concludere che, probabilmente, anche nel caso della fitasi BPP di *S. wittichii* RW1, gli



ioni  $\text{Ca}^{2+}$  sono necessari non solo per l'attività catalitica dell'enzima, legandosi ai siti di legame specifici per il calcio, ma anche come parte del substrato, formando il complesso Ca-fitato.

La concentrazione di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  pari a 2mM, è stata impiegata nelle miscele di reazione utilizzate nelle successive analisi.

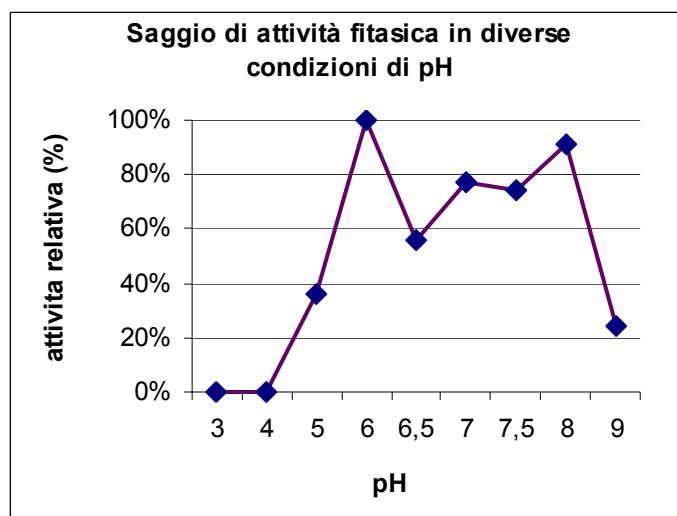
#### **4.7.2. Effetto del pH sull'attività e sulla stabilità della fitasi ricombinante hSWPHY**

Le fitasi BPP, diversamente dalle fitasi HAP, PAP, CPhy, hanno attività ottimale nell'intervallo di pH neutro-alcalino compreso tra pH6 e pH8.

Per identificare il valore di pH ottimale per l'attività della proteina ricombinante hSWPHY, il saggio di quantificazione dell'attività fitasica è stato condotto tra pH3 e pH9, utilizzando una serie di tamponi descritti in sezione 3.9.3. L'attività fitasica è stata misurata dopo 20 minuti di incubazione a 39°C nei differenti tamponi, ed in presenza del substrato Na-fitato e dell'effettore  $\text{Ca}^{2+}$ . I risultati ottenuti sono mostrati in figura 23.

La proteina ricombinante hSWPHY ha mostrato attività ottimale a pH6, ed una buona attività nell'intervallo tra pH6 e pH8, mantenendo, a pH7 e a pH8 rispettivamente, il 77% ed il 91% dell'attività massima rilevata al valore ottimale di pH. A valori di pH acido l'attività fitasica è diminuita rapidamente, mostrando, a pH5, il 36% dell'attività massima rilevata a pH6, ed azzerandosi a pH3 e a pH4. Questi risultati concordano con il fatto che a bassi valori di pH il fitato non è in grado di legarsi agli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  formando il complesso Ca-fitato, pertanto l'idrolisi del fitato non

può procedere, essendo esso il substrato riconosciuto dalle fitasi BPP (Martin and Evans, 1986; Oh et al., 2001).



**Figura 23: effetto del pH sull'attività fitasica di hSWPHY.** Il saggio di quantificazione dell'attività fitasica è stato condotto in tamponi a diversi pH (sezione 3.9.3.) in presenza del substrato Na-fitato (2mM) e di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  (2mM). L'attività fitasica è espressa come attività relativa (%), considerando 100% la massima attività misurata a pH6.

Da un punto di vista applicativo, il valore ottimale di pH per l'attività delle fitasi è molto importante, poiché definisce il possibile "target" di applicazione della fitasi in questione.

Le fitasi BPP sono ottime candidate sia per studi di piante transgeniche, sia per l'applicazione come additivo nei mangimi di polli, maiali, e pesci. Al valore di pH neutro delle cellule vegetali queste fitasi sono attive, pertanto la loro espressione permetterebbe di metabolizzare il fosfato

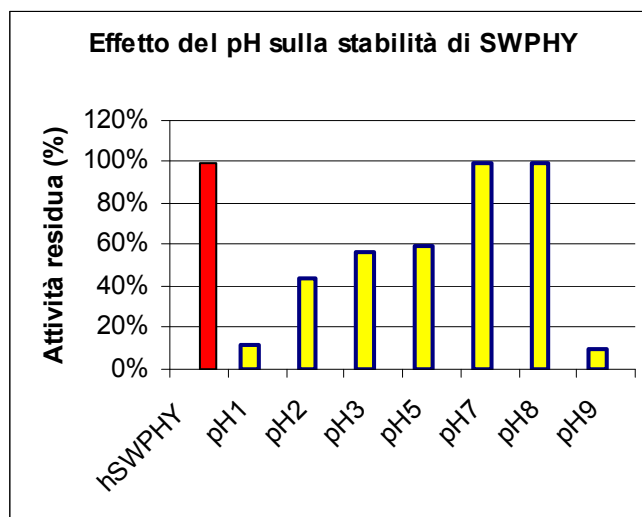
inorganico del fitato aumentando la quantità di fosforo disponibile per la crescita della pianta (Tye et al., 2002).

Nei mangimi a base di granaglie l'acido fitico dei semi si trova principalmente complessato con cationi divalenti, in particolare con il  $\text{Ca}^{2+}$ , ed il Ca-fitato è il substrato per le fitasi BPP; inoltre l'intestino tenue (pH6.5-7.5), le ghiandole salivari (pH5-7), il gozzo dei polli (pH5-6.5), il tratto digestivo di trote e ciprinidi, possiedono condizioni di pH in cui le fitasi BPP possiedono una attività ottimale. È stato inoltre dimostrato che anche una combinazione di fitasi acide e fitasi neutro-alcaline può portare ad una migliore degradazione del fitato lungo l'intero tratto digestivo degli animali monogastrici (Park et al., 1999).

Sempre dal punto di vista dell'applicazione delle fitasi come additivo nei mangimi, vista la variabilità delle condizioni di pH del tratto digestivo, è molto importante che la fitasi in questione sia stabile a diversi valori di pH, per poter funzionare al meglio nel sito specifico di azione. L'effetto del pH sulla stabilità dell'enzima ricombinante hSWPHY è stato saggiato nell'intervallo tra pH1 e pH9 alla temperatura di 39°C, valore che si avvicina al valore di temperatura fisiologica. Dopo 1 ora di incubazione a 39°C nei tamponi a diversi pH, l'attività enzimatica residua di hSWPHY è stata misurata attraverso il saggio di quantificazione dell'attività fitasica condotto a pH6. L'attività enzimatica di hSWPHY, misurata nel medesimo saggio di attività senza previa incubazione della proteina a 39°C nei diversi tamponi, è stata considerata come attività fitasica originale. La figura 24 mostra i risultati ottenuti.

Da questa analisi è emerso che la proteina ricombinante hSWPHY è abbastanza stabile nell'intervallo di pH compreso tra pH5 e pH8, mantenendo a pH5 il 60% dell'attività originale, e a pH7 e a pH8 circa il

100% dell'attività. A pH9 l'attività residua è diminuita fortemente portandosi a circa il 10% dell'attività originale; da pH3 a pH1 l'attività residua è diminuita progressivamente passando da circa il 57% dell'attività originale a pH3, al 44% ed al 12% dell'attività originale rispettivamente a pH2 ed a pH1.



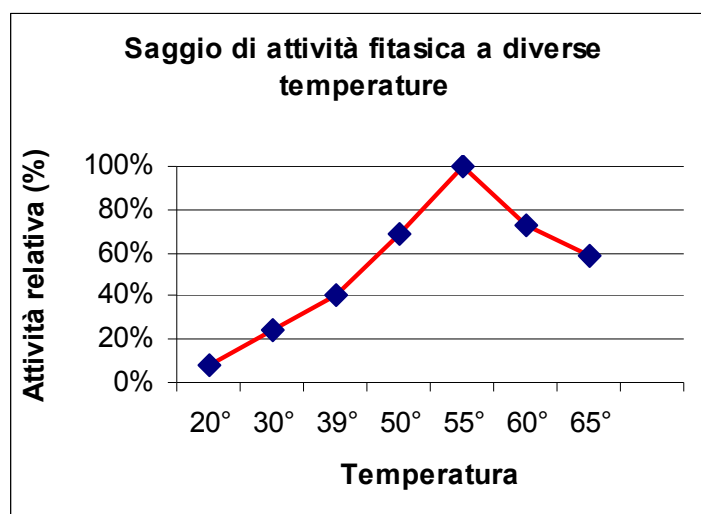
**Figura 24: effetto del pH sulla stabilità di hSWPHY.** L'attività fitasica residua, espressa come % dell'attività enzimatica originale (hSWPHY, in rosso), è stata misurata, dopo 1 ora di incubazione a 37°C nei tamponi a diversi pH (sezione 3.9.3.), con il saggio di quantificazione dell'attività fitasica condotto a 39°C in tampone Na-acetato 100mM pH6 ed in presenza del substrato Na-fitato (2mM) e di ioni Ca<sup>2+</sup> (2mM).

#### **4.7.3. Effetto della temperatura sull'attività e sulla stabilità della fitasi ricombinante hSWPHY**

Il valore di temperatura ottimale per l'attività delle fitasi BPP ad oggi caratterizzate varia da 37°C per la fitasi PhyS di *S. oneidensis*, a 50-70

per le fitasi di *Bacillus* (Cheng and Lim, 2006; Kerovuo et al., 1998; Kim et al., 1998; Gulati et al., 2007).

Per identificare il valore di temperatura ottimale per l'attività della proteina ricombinante hSWPHY, il saggio di quantificazione dell'attività fitasica è stato condotto nell'intervallo di temperature compreso tra 20°C e 65°C e nella condizione ottimale di pH6. L'attività fitasica è stata misurata dopo 20 minuti di incubazione della miscela di reazione alle diverse temperature. I risultati ottenuti sono mostrati in figura 25.



**Figura 25: effetto della Temperatura sull'attività fitasica di hSWPHY.** Il saggio di quantificazione dell'attività fitasica è stato condotto in tampone Na-acetato 100mM pH6 a diverse temperature in presenza del substrato Na-fitato (2mM) e di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  (sezione 3.9.4.). L'attività fitasica è espressa come attività relativa (%), considerando 100% la massima attività misurata a 55°C.

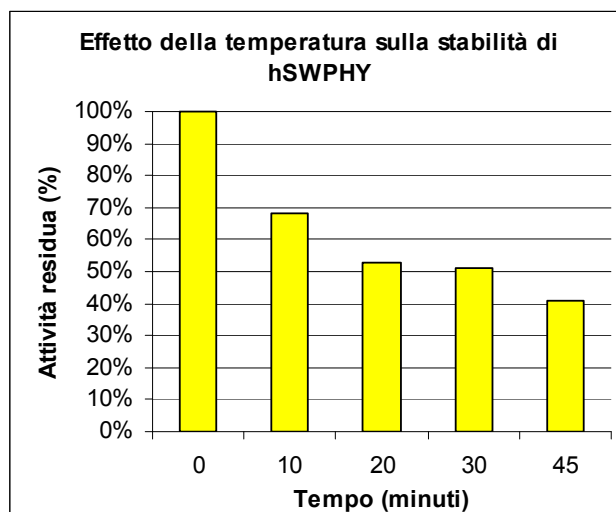
La temperatura ottimale per l'attività di hSWPHY è risultata essere di 55°C, inoltre la proteina ha mostrato un ampio intervallo di attività compreso tra 40°C e 65°C, mantenendo il 40%, il 69%, il 73% ed il 59%

dell'attività massima, rilevata a 55°C, rispettivamente a 40°C, 50°C, 60°C e 65°C.

La termostabilità è una caratteristica molto importante per un enzima con potenziale applicativo come additivo nei mangimi, poiché le temperature raggiunte durante il processo di pellettizzazione dei mangimi sono molto elevate (65-95°C), con tempi di esposizione che variano da pochi secondi ad alcuni minuti (Bedford et al., 2001), pertanto, per evitare una sostanziale perdita di attività enzimatica durante questo processo, gli enzimi aggiunti ai mangimi devono essere stabili al calore.

Le fitasi BPP di *Bacillus* sono fitasi piuttosto termostabili, e questa resistenza all'inattivazione ad opera del calore è fortemente dipendente dalla presenza di ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , che si legano ai siti di legame specifici per il calcio e stabilizzano l'enzima (Ha et al., 2000). Una eccezione è rappresentata invece dalla fitasi di *B. laevolacticus*, la cui elevata termostabilità (100% di attività dopo 30 minuti a 80°C) non dipende dalla presenza di  $\text{Ca}^{2+}$ . La fitasi di *S. oneidensis*, al contrario, non è termostabile, perdendo circa l'80% della sua attività in seguito ad incubazione per 10 minuti a temperature superiori a 60°C (Cheng and Lim, 2006).

Al fine di verificare la termostabilità di hSWPHY, l'enzima purificato è stato incubato a 80°C per 10, 20, 30 e 45 minuti, raffreddato a 4°C e saggiato per valutarne l'attività fitasica residua attraverso il saggio di quantificazione dell'attività fitasica condotto a pH6. L'attività fitasica di hSWPHY, misurata nel medesimo saggio di attività, senza previa incubazione della proteina a 80°C, è stata considerata come attività fitasica originale. I risultati ottenuti sono riportati in figura 26.



**Figura 26: effetto della temperatura sulla stabilità di hSWPHY.** L'attività fitasica residua, espressa come % dell'attività enzimatica originale (tempo 0), è stata misurata dopo 0, 10, 20, 30 e 45 minuti di incubazione a 80°C, attraverso il saggio di quantificazione dell'attività fitasica condotto a 39°C in tampone Na-acetato 100mM pH6 ed in presenza del substrato Na-fitato (2mM) e di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  (2mM) (sezione 3.9.4).

La proteina ricombinante hSWPHY si è dimostrata piuttosto termostabile, infatti l'attività residua misurata dopo 10 minuti di incubazione a 80°C è stata pari a circa il 68% dell'attività originale; con l'aumentare del tempo di incubazione l'attività fitasica residua è diminuita gradualmente fino a raggiungere il 41% dell'attività originale dopo 45 minuti di incubazione a 80°C. Diversamente da quanto è stato dimostrato per le fitasi BPP di *Bacillus* sp., la termostabilità di hSWPHY non si è dimostrata Ca-dipendente. Il medesimo saggio è stato eseguito pre-incubando l'enzima a 80°C in tampone contenente  $\text{Ca}^{2+}$ , e non è stata

riscontrata una differenza significativa nell'attività residua rispetto a quella misurata per l'enzima incubato nello stesso tampone in assenza di  $\text{Ca}^{2+}$ . Probabilmente i residui di cisteina Cys158 e Cys206 presenti nella sequenza aminoacidica di SWPHY (figura 10), portano alla formazione di un ponte disolfuro che contribuisce al mantenimento della stabilità dell'enzima.

#### **4.7.4. Analisi della specificità di substrato della fitasi ricombinante hSWPHY**

Tra le varie fitasi microbiche studiate e caratterizzate, le fitasi BPP insieme alla fitasi HAP AppA di *E. coli*, sono quelle che mostrano la più elevata affinità per il fitato (Ha et al., 2000; Kerovuo et al., 1998). Diversamente, la specificità di substrato di parecchie fitasi fungine è molto ampia, includendo metaboliti quali glucosio-6-fosfato, fruttosio 1,6-difosfato, *p*-nitrofenilfosfato ecc...(Wyss et al., 1999a,b).

Al fine di determinare la specificità di substrato della proteina ricombinante hSWPHY, diversi composti fosforilati, oltre al Na-fitato, sono stati utilizzati come substrato nel saggio di quantificazione dell'attività fitasica (sezione 3.9.1.). L'attività enzimatica è stata misurata dopo 20 minuti di incubazione a 39°C in tampone a pH6 in presenza del substrato fosforilato e dell'effettore  $\text{Ca}^{2+}$ . L'attività enzimatica misurata nel medesimo saggio in presenza del substrato Na-fitato è stata considerata come attività massima (100%) della proteina hSWPHY. I risultati ottenuti sono mostrati nella tabella 6.



Substrato (2mM)	Attività relativa (%)
Na-fitato	100
<i>p</i> -Nitrofenilfosfato	0
AMP	0
ADP	0
ATP	51
D-Glucosio 6-fosfato	0
D-Fruuttosio 1,6-difosfato	0
Na-pirofosfato	5
Na-tripolifosfato	26

**Tabella 6: specificità di substrato della fitasi ricombinante hSWPHY.** Il saggio di quantificazione dell'attività enzimatica è stato condotto in tampone Na-acetato 100mM pH6 a 39°C in presenza dei vari substrati fosforilati (2mM) e di ioni Ca<sup>2+</sup> (2mM). L'attività fitasica è espressa come attività relativa (%), considerando 100% l'attività misurata in presenza del substrato Na-fitato (2mM) (sezione 3.9.5.).

La fitasi ricombinante hSWPHY, in accordo con il profilo di specificità di substrato delle altre fitasi BPP ad oggi caratterizzate, si è dimostrata piuttosto specifica per il Na-fitato, non mostrando attività verso la maggior parte dei substrati fosforilati testati, ad eccezione di ATP, Na-pirofosfato e Na-tripolifosfato, verso i quali l'attività rilevata è stata pari, rispettivamente, al 51%, 5% e 26% dell'attività misurata in presenza di Na-fitato.

Da un punto di vista applicativo delle fitasi BPP in studi di piante transgeniche, l'elevata specificità di substrato è una caratteristica molto

importante; la fitasi introdotta nelle piante non deve, infatti, interferire con le vie metaboliche cellulari, idrolizzando i vari composti fosforilati presenti nelle cellule vegetali, ma deve agire in modo piuttosto specifico sul fitato..

L'attività specifica di hSWPHY per il Na-fitato, determinata in condizioni ottimali di pH è di concentrazione di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  a 39°C, valore di temperatura fisiologica, è stata di 14 FTU/mg di proteina purifica.

#### **4.7.5. Analisi della resistenza alla proteolisi della fitasi ricombinante hSWPHY**

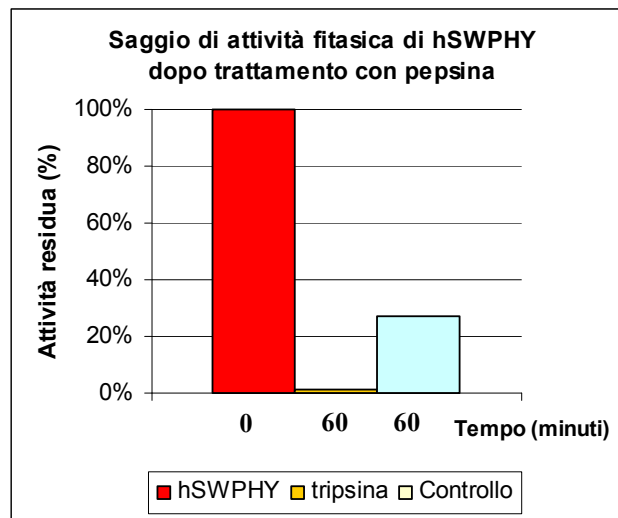
Da un punto di vista applicativo come additivi nei mangimi, le fitasi BPP, con attività ottimale nell'intervallo di pH neutro-alcalino, è importante che mostrino resistenza all'attacco proteolitico sia da parte di pepsina, per poter resistere al passaggio attraverso lo stomaco, sia da parte delle proteasi pancreatiche, quali tripsina, pancreatina e papaina, per poter funzionare correttamente ai valori di pH neutro dell'intestino tenue.

In generale è stato dimostrato che le fitasi di *Bacillus* sp. sono fortemente resistenti all'attacco delle proteasi pancreatiche, ma sono molto suscettibili all'attacco della pepsina (Kerovuo et al., 2000a).

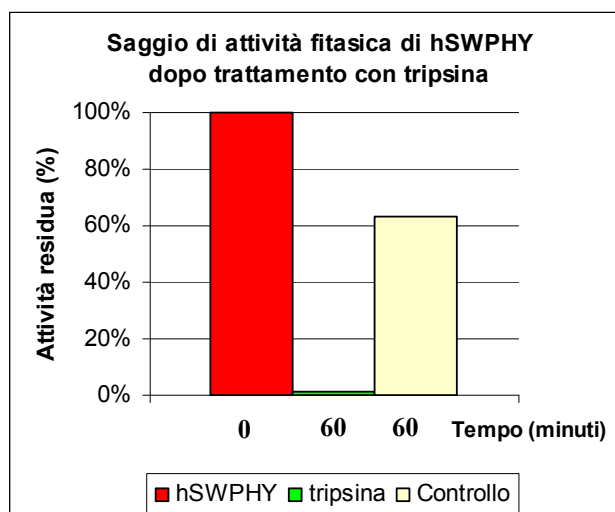
Per determinare la resistenza alla proteolisi della fitasi ricombinante hSWPHY, l'enzima purificato è stato incubato, in rapporto 10:1 w/w, per 1 ora a 37°C con pepsina e tripsina, in tamponi specifici per l'azione proteolitica delle proteasi (sezione 3.9.6.). L'attività fitasica residua è stata successivamente rilevata attraverso il saggio di quantificazione dell'attività fitasica condotto a pH6. L'attività fitasica di hSWPHY,

misurata nel medesimo saggio di attività senza previa incubazione della proteina a 37°C con le proteasi testate, è stata considerata come attività fitasica originale. Inoltre, per verificare che la eventuale perdita di attività enzimatica rilevata fosse dovuta precisamente all'azione proteolitica da parte delle proteasi, e non ad una naturale perdita di attività dell'enzima nei tamponi specifici per l'azione proteolitica, la medesima quantità di enzima hSWPHY è stata preincubata nei medesimi tamponi specifici per l'attività proteolitica, in assenza, però, delle proteasi.

I risultati ottenuti sono riportati nelle figure 27 e 28.



**Figura 27: analisi della resistenza di hSWPHY alla proteolisi da parte di pepsina.** L'attività fitasica residua, espressa come % dell'attività enzimatica originale (hSWPHY, in rosso), è stata misurata, dopo 1 ora di incubazione a 37°C di hSWPHY con pepsina (rapporto 10:1 w/w) (sezione 3.9.6.), attraverso il saggio di quantificazione dell'attività fitasica, condotto a 39°C in tampone Na-acetato 100mM pH6, ed in presenza del substrato Na-fitato (2mM) e di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  (2mM) (sezione 3.9.4). Il Controllo è rappresentato dall'enzima hSWPHY incubato per 1 ora a 37°C nel tampone specifico per l'attività proteolitica (sezione 3.9.6.), in assenza, però, di pepsina.



**Figura 28: analisi della resistenza di hSWPHY alla proteolisi da parte di tripsina.**

L'attività fitasica residua, espressa come % dell'attività enzimatica originale (hSWPHY, in rosso), è stata misurata, dopo 1 ora di incubazione a 37°C di hSWPHY con tripsina (rapporto 10:1 w/w) (sezione 3.9.6.), attraverso il saggio di quantificazione dell'attività fitasica, condotto a 39°C in tampone Na-acetato 100mM pH6, ed in presenza del substrato Na-fitato (2mM) e di ioni  $Ca^{2+}$  (2mM) (sezione 3.9.4). Il Controllo è rappresentato dall'enzima hSWPHY incubato per 1 ora a 37°C nel tampone specifico per l'attività proteolitica (sezione 3.9.6.), in assenza, però, di tripsina.

Come mostrato nelle figura 27 e 28, la proteina ricombinante hSWPHY non è resistente all'attività proteolitica di tripsina, né di pepsina, essendo nulla l'attività fitasica rilevata dopo 1h di incubazione a 37°C in presenza di ciascuna delle due proteasi.

## 5. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono stati isolati due nuovi ceppi batterici produttori di fitasi e ne è stata caratterizzata, in via preliminare, l'attività fitasica.

Il ceppo 52, appartenente al genere *Aeromonas*, è stato isolato da un campione ambientale, prelevato dalle vasche di ossidazione del depuratore a fanghi attivi di Roncoesi (Reggio Emilia) e, attraverso il metodo di Bae (Bae et al., 1999), è stato successivamente selezionato come fitasi-produttore.

Il ceppo *Sphingomonas wittichii* RW1 è stato scelto come potenziale batterio produttore di fitasi in seguito all'analisi del "database" di genomi microbici sequenziati disponibili in NCBI ("National Center for Biotechnology Information"), alla ricerca di geni codificanti putative fitasi, così annotati solo in base ad omologia di sequenza con altre fitasi conosciute, ma non ancora caratterizzati. Vista l'importanza rivestita da *S. wittichii* RW1 nel campo della biorimediazione di suoli ed acque contaminate da xenobiotici, lo stesso batterio è stato scelto, in questo lavoro di tesi, per studiarne la capacità di degradare l'acido fitico, un composto a cui sono legati problemi sia ambientali che nutrizionali.

Dai dati ottenuti in seguito alla caratterizzazione preliminare dell'attività fitasica/fosfatasica del ceppo 52 di *Aeromonas* sp., è emerso che la fitasi di questo ceppo mostra una buona attività nell'intervallo di pH 5-8. La fitasi in questione rientrerebbe, quindi, nel gruppo di fitasi cosiddette neutro-alcaline, a cui appartiene la classe di fitasi "β-propeller" (BPP). Inoltre, il valore ottimale di temperatura calcolato per l'attività

enzimatica è pari a 40°C, il che significa che, da un punto di vista applicativo di questo enzima come additivo nei mangimi destinati agli animali monogastrici, si tratterebbe di una fitasi con attività ottimale a valori di temperatura fisiologica (37-40°C).

La caratterizzazione effettiva delle proprietà catalitiche della fitasi del ceppo 52 di *Aeromonas* sp., e quindi la conferma della sua appartenenza alla classe di fitasi BPP, necessita, comunque, di tecniche di purificazione più accurate rispetto al frazionamento preliminare con solfato di ammonio (quali ad esempio tecniche cromatografiche), in modo da ottenere preparazioni “pure” dell’enzima da utilizzare nei saggi di attività enzimatica. Ad ogni modo, quelle condotte fino ad ora, sono solo indagini preliminari, indicative, comunque, dell’isolamento di un nuovo batterio produttore di fitasi appartenente al genere *Aeromonas*.

Per ciò che concerne il ceppo di *S. wittichii* RW1, in questo lavoro di tesi è stato clonato un nuovo gene codificante l’enzima fitasi, denominato *swphy*. Come anticipato dalle analisi computazionali eseguite sulla sua sequenza nucleotidica e sulla sequenza aminoacidica dedotta, e confermato successivamente dall’analisi delle proprietà catalitiche dell’enzima ricombinante hSWPHY espresso in *Escherichia coli*, si tratta di una nuova fitasi appartenente alla classe di fitasi “β-propeller” che, ad oggi, include quasi esclusivamente fitasi appartenenti ai batteri gram positivi del genere *Bacillus* e la fitasi PhyS recentemente isolata dal batterio gram negativo *Shewanella oneidensis* (Cheng and Lim, 2006). In questo lavoro di tesi è stato, infatti, dimostrato che la fitasi di *S. wittichii* RW1 possiede alcune caratteristiche distintive di questa classe di fitasi, quali richiesta di ioni  $Ca^{2+}$  per l’attività catalitica e come parte del

substrato, attività ottimale nell'intervallo di pH neutro-alcino 6-8, specificità di substrato piuttosto elevata.

Dall'analisi del contesto genico del gene *swphy*, è emersa una stretta associazione con un gene codificante un recettore TonB dipendente; molto probabilmente, entrambi i geni, sono cotrascritti come un operone, con un promotore comune a monte del gene codificante il recettore TonB dipendente. Ciò implica che il fitato, complessato con ioni metallici quali, ad esempio, il ferro, sia importato nel periplasma attraverso questo tipo di recettore, e idrolizzato dalla fitasi di *S. wittichii* RW1 ivi presente, mettendo così a disposizione del batterio carbonio, fosfato e ioni minerali.

Per valutare i possibili "target di applicazione della fitasi di *S. wittichii* RW1, sono state analizzate le proprietà catalitiche della fitasi ricombinante hSWPHY. Mostrando attività ottimale nell'intervallo di pH neutro-alcino, questa fitasi potrebbe essere adatta all'applicazione come additivo nei mangimi per quegli animali con un tratto digestivo neutro, quale quello di trote e ciprinidi, oppure in studi di piante transgeniche, essendo attive al valore di pH neutro delle cellule vegetali. Anche la specificità di substrato piuttosto elevata mostrata da hSWPHY, potrebbe essere ottimale per il suo impiego in studi di piante transgeniche, poiché se la fitasi introdotta nella pianta non agisce in modo specifico sul fitato, potrebbe interferire con le altre vie metaboliche delle cellule vegetali idrolizzando altri composti fosforilati. Da un punto di vista applicativo come additivo nei mangimi, la fitasi ricombinante mostra, inoltre, una caratteristica molto importante, ovvero la termostabilità. Infatti, dopo 10 minuti di esposizione a 80°C, mantiene circa il 68% dell'attività originale, ed il 41% dopo 45 minuti di esposizione alla stessa

temperatura. Il valore di temperatura ottimale (55°C), ed il profilo di stabilità dell'enzima a differenti valori di pH sono invece paragonabili a quelli di molte delle fitasi fino ad oggi caratterizzate.

A discapito della termostabilità piuttosto elevata mostrata da questa proteina, è stata rilevata la mancanza di resistenza all'attacco proteolitico da parte di pepsina e tripsina, altra caratteristica molto importante da un punto di vista applicativo delle fitasi come additivo nei mangimi destinati agli animali monogastrici. È stato comunque ampiamente dimostrato che, attraverso le tecniche di ingegneria genetica, è possibile migliorare le proprietà catalitiche delle fitasi, quali appunto la resistenza alla proteolisi (Garrett et al., 2004).

I risultati ottenuti fino ad ora forniscono, comunque, spunti interessanti per avviare uno studio più approfondito sulla fitasi di *S. wittichii* RW1. Il passo successivo potrebbe essere l'espressione in un ospite per l'espressione eterologa quale ad esempio il lievito *Pichia pastoris*, molto adatto per ottenere elevati livelli di espressione di proteine eterologhe, e la successiva valutazione delle proprietà della proteina ricombinante.



## 6. BIBLIOGRAFIA

- **Abelson, P. H.** 1999. A potential phosphate crisis. *Science* **283**:2015.
- **Adeola, O.** 1999. Effect of supplemental phytase on trace mineral availability for swine. In: Coelho MB, Kornegay ET (eds) Phytase in animal nutrition and waste management, 2nd rev. edn. BASF, Mexico, pp 465–480.
- **Applegate, T. J., D. M. Webel, and X. G. Lei.** 2003. Efficacy of a phytase derived from *Escherichia coli* and expressed in yeast on phosphorus utilization and bone mineralization in turkey poults. *Poult Sci* **82**:1726-32.
- **Augsburger, N. I., D. M. Webel, X. G. Lei, and D. H. Baker.** 2003. Efficacy of an *E. coli* phytase expressed in yeast for releasing phytate-bound phosphorus in young chicks and pigs. *J Anim Sci* **81**:474-83.
- **Augsburger, N. R., D. M. Webel, and D. H. Baker.** 2007. An *Escherichia coli* phytase expressed in yeast effectively replaces inorganic phosphorus for finishing pigs and laying hens. *J Anim Sci* **85**:1192-8.
- **Bae, H. D., L. J. Yanke, K. J. Cheng, and L. B. Selinger.** 1999. A novel staining method for detecting phytase activity. *J Microbiol Methods* **39**:17-22.
- **Baldi, B.G., J. J. Scott, J. D. Everard, F. A. Loewus.** 1988. Localization of constitutive phytases in lily pollen and properties of the pH 8 form. *Plant Sci.* **56**:137–147.
- **Bedford, M. R., F. G. Silversides, W. D. Cowan.** 2001. Process stability and methods of detection of feed enzymes in complete diets. In: Bedford, M. R., Partridge, G. G. (Eds.), *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 377-388
- **Berka, R. M., M. W. Rey, K. M. Brown, T. Byun, and A. V. Klotz.** 1998. Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Appl Environ Microbiol* **64**:4423-7.
- **Bitar, K., and J. G. Reinhold.** 1972. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf, and man. *Biochim Biophys Acta* **268**:442-52.

- **Boiling, S. D., M. W. Douglas, R. B. Shirley, C. M. Parsons, and K. W. Koelkebeck.** 2000. The effects of various dietary levels of phytase and available phosphorus on performance of laying hens. *Poult. Sci.* **79**:535-538.
- **Bradford, M. M.** 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248–254.
- **Braña, D. V., M. Ellis, E. O. Castaneda, J. S. Sands, and D. H. Baker.** 2006. Effect of a novel phytase on growth performance, bone ash, and mineral digestibility in nursery and grower-finisher pigs. *J Anim Sci* **84**:1839-49.
- **Brinch-Pedersen, H., A. Olesen, S. K. Rasmussen, P. B. Holm.** 2000. Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L) for constitutive accumulation of an *Aspergillus* phytase. *Mol Breed* **6**:195–206.
- **Brinch-Pedersen, H., L. D. Sørensen, and P. B. Holm.** 2002. Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *Trends in Plant Science* **7**:118-125.
- **Brink, E. J., P.R. Dekker, E. C. H. van Beresteijn, A. C. Beynen.** 1991. Inhibitory effect of dietary soybean protein vs. casein on magnesium absorption in rats. *J Nutr* **121**:1374–138.
- **Chan, W. L., S. C. Lung, and B. L. Lim.** 2006. Properties of beta-propeller phytase expressed in transgenic tobacco. *Protein Expr Purif* **46**:100-6.
- **Chen J. C.,** 1998. Novel screening method for extracellular phytase-producing microorganisms. *Biotechnology Techniques* **12**:759–761.
- **Chen, R., G. Xue, P. Chen, B. Yao, W. Yang, Q. Ma, Y. Fan, Z. Zhao, M. C. Tarczynski, and J. Shi.** 2007. Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gene. *Transgenic Res.* Ahead of print
- **Cheng, C., and B. L. Lim.** 2006. Beta-propeller phytases in the aquatic environment. *Arch Microbiol* **185**:1-13.
- **Cheng, C., K. B. Wong, and B. L. Lim.** 2007. The effect of disulfide bond on the conformational stability and catalytic activity of beta-propeller phytase. *Protein Pept Lett* **14**:175-83.
- **Cho, J. S., C. W. Lee, S. H. Kang, J. C. Lee, J. D. Bok, Y. S. Moon, H. G. Lee, S. C. Kim, and Y. J. Choi.** 2003. Purification and characterization of a phytase from *Pseudomonas syringae* MOK1. *Curr Microbiol* **47**:290-4.

- **Cho, J., K. Choi, T. Darden, P. R. Reynolds, J. N. Petite, and S. B. Shears.** 2006. Avian multiple inositol polyphosphate phosphatase is an active phytase that can be engineered to help ameliorate the planet's "phosphate crisis". *J Biotechnol* **126**:248-59.
- **Choi, Y. M., H. J. Suh, and J. M. Kim.** 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *J Protein Chem* **20**:287-92.
- **Chu, H. M., R. T. Guo, T. W. Lin, C. C. Chou, H. L. Shr, H. L. Lai, T. Y. Tang, K. J. Cheng, B. L. Selinger, and A. H. Wang.** 2004. Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. *Structure* **12**:2015-2024.
- **Coello, P., J. P. Maughan, A. Mendoza, R. Philip, D. W. Bollinger, T. L. Veum, L. O. Vodkin, J. C. Polacco.** 2001. Generation of low phytic acid *Arabidopsis* seeds expressing an *E. coli* phytase during embryo development. *Seed Sci Res* **11**:285–291.
- **Cosgrove, D. J.** 1969. Ion-exchange chromatography of inositol polyphosphates. *Ann N Y Acad Sci* **165**:677-86.
- **Cosgrove, D. J.** 1980. Inositolhexakisphosphates. In: D.J. Cosgrove, Editor, Inositol phosphates. Their Chemistry, Biochemistry and Physiology, Elsevier Scientific Publishing Company, Netherlands.26-43.
- **Cowieson, A. J., T. Acamovic, and M. R. Bedford.** 2006a. Phytic acid and phytase: implications for protein utilization by poultry. *Poult Sci* **85**:878-85.
- **Cowieson, A. J., T. Acamovic, and M. R. Bedford.** 2006b. Supplementation of corn-soy-based diets with an *Eschericia coli*-derived phytase: effects on broiler chick performance and the digestibility of amino acids and metabolizability of minerals and energy. *Poult Sci* **85**:1389-97.
- **Dasgupta, S., D. Dasgupta, M. Sen, S. Biswas, B. B. Biswas.** 1996. Interaction of myoinositol trisphosphate–phytase complex with the receptor for intercellular Ca<sup>2+</sup> mobilization in plants. *Biochem* **35**(15):4994–5001.
- **De Angelis, M., G. Gallo, M. R. Corbo, P. L. H. McSweeney, M. Faccia, M. Giovine, M. Gobbetti.** 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Food Microbiol.* **87**:259-270.

- **Denbow, D. M., E. A. Grabau, G. H. Lacy, E. T. Kornegay, D. R. Russell, and P. F. Umbeck.** 1998. Soybeans transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers. *Poult Sci* **77**:878-81.
- **Dieffenbach, C. W., and G. S. Dveksler.** 1995. PCR primer: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York, USA.
- **Dvorakova, J.** 1998. Phytase: sources, preparation and exploitation. *Folia Microbiol (Praha)* **43**:323-38.
- **Dvorakova, J., J. Kopecky, V. Havlicek, and V. Kren.** 2000. Formation of myo-inositol phosphates by *Aspergillus niger* 3-phytase. *Folia Microbiol (Praha)* **45**:128-32.
- **Ehrlich, K. C., B. G. Montalbano, E. J. Mullaney, H. C. Dischinger, Jr., and A. H. Ullah.** 1993. Identification and cloning of a second phytase gene (*phyB*) from *Aspergillus niger (ficcum)*. *Biochem Biophys Res Commun* **195**:53-7.
- **Ertl, D. S., K. A. Young, V. Raboy.** 1998. Plant genetic approaches to phosphorus management in agricultural production. *J Environ Qual* **27**:299–304.
- **Ferguson A. D., J. Deisenhofer.** 2004. Metal Import through Microbial Membranes. *Cell* **116**, 15-24.
- **Fülöp V. and D.T. Jones** 1999.  $\beta$  propellers: structural rigidity and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**: 715–721.
- **Gabriel, U. U., O. A. Akinrotimi, P. E. Anyanwu, D. O. Bekibele, and D. N. Onunkwo.** 2007. The role of dietary phytase in formulation of least cost and less polluting fish feed for sustainable aquaculture development in Nigeria. *African Journal of Agricultural Research* **2(7)**:279-286.
- **Garrett, J. B., K. A. Kretz, E. O'Donoghue, J. Kerovuo, W. Kim, N. R. Barton, G. P. Hazlewood, J. M. Short, D. E. Robertson, and K. A. Gray.** 2004. Enhancing the thermal tolerance and gastric performance of a microbial phytase for use as a phosphate-mobilizing monogastric-feed supplement. *Appl Environ Microbiol* **70**:3041-6.

- **Gasteiger E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, A. Bairoch.** 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press.
- **George, T. S., R. J. Simpson, P. A. Hadobas, A. E. Richardson.** 2005. Expression of a fungal phytase gene in *Nicotiana tabacum* improves phosphorus nutrition of plants grown in amended soils. *Plant Biotechnol. J.* **3**:129–140.
- **Golovan, S. P., R. G. Meidinger, A. Ajakaiye, M. Cottrill, M. Z. Wiederkehr, D. J. Barney, C. Plante, J. W. Pollard, M. Z. Fan, M. A. Hayes, J. Laursen, J. P. Hjorth, R. R. Hacker, J. P. Phillips, and C. W. Forsberg.** 2001. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat Biotechnol* **19**:741-5.
- **Golovan, S., G. Wang, J. Zhang, and C. W. Forsberg.** 2000. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Can J Microbiol* **46**:59-71.
- **Graf, E., K. L. Epton, and J. W. Eaton.** 1987. Phytic acid: a natural antioxidant. *J. Biol. Chem.* **262** 11647-11650.
- **Greiner R. and U. Konietzny.** 2006. Phytase for Food Application, *Food Technol. Biotechnol.* **44**(2):125–140.
- **Greiner, R.** 2002. Purification and characterization of three phytases from germinated lupine seeds (*Lupinus albus* var. *Amiga*). *J. Agric. Food Chem.* **50**:6858-6864.
- **Greiner, R., and M. Larsson Alminger.** 1999. Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated oat (*Avena sativa*). *J. Sci. Food Agric.* **79**:1453-1460.
- **Greiner, R., and U. Konietzny.** 1996. Construction of a bioreactor to produce special breakdown products of phytate. *J Biotechnol* **48**:153-9.
- **Greiner, R., E. Haller, U. Konietzny, and K. D. Jany.** 1997. Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Arch Biochem Biophys* **341**:201-6.

- **Greiner, R., K.-D. Jany, and M. Larsson Alminger.** 2000b. Identification and properties of myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases (phytases) from Barley (*Hordeum vulgare*). *J. Cer. Sci.* **31**:127-139.
- **Greiner, R., N. Carlsson, and M. Larsson Alminger.** 2000a. Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **84**:53-62.
- **Greiner, R., U. Konietzny, and K. Jany.** 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**:107-113.
- **Greiner, R., U. Konietzny, and K.-D. Jany.** 1998. Purification and properties of a phytase from rye. *J. Food Biochem.* **22**:143-161.
- **Guimaraes, L. H., H. F. Terenzi, J. A. Jorge, F. A. Leone, and L. Polizeli Mde.** 2004. Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. *Biotechnol Appl Biochem* **40**:201-7.
- **Gulati, H. K., B. S. Chadha, and H. S. Saini.** 2007. Production and characterization of thermostable alkaline phytase from *Bacillus laevolacticus* isolated from rhizosphere soil. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**:91-8.
- **Ha, N. C., B. C. Oh, S. Shin, H. J. Kim, T. K. Oh, Y. O. Kim, K. Y. Choi, and B. H. Oh.** 2000. Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. *Nat Struct Biol* **7**:147-53.
- **Haefner, S., A. Knietzsch, E. Scholten, J. Braun, M. Lohscheidt, and O. Zelder.** 2005. Biotechnological production and applications of phytases. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**:588-97.
- **Halden, R. U., B. G. Halden, and D. F. Dwyer.** 1999. Removal of dibenzofuran, dibenzo-p-dioxin, and 2-chlorodibenzo-p-dioxin from soils inoculated with *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2246-2249.
- **Hamada, A., K. Yamaguchi, M. Harada, K. Horiguchi, T. Takahashi, and H. Honda.** 2006. Recombinant, rice-produced yeast phytase shows the ability to hydrolyze phytate derived from seed-based feed, and extreme stability during ensilage treatment. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**:1524-7.

- **Han Y., D. B. Wilson, X. G. Lei.** 1999. Expression of an *Aspergillus niger* Phytase Gene (*phyA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1915-1918.
- **Han, Y. M., K. R. Roneker, W. G. Pond, and X. G. Lei.** 1998. Adding wheat middlings, microbial phytase, and citric acid to corn-soybean meal diets for growing pigs may replace inorganic phosphorus supplementation. *J Anim Sci* **76**:2649-56.
- **Han, Y., and X. G. Lei.** 1999. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys* **364**:83-90.
- **Han, Y., D. B. Wilson, and X. G. Lei.** 1999. Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (*phyA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **65**:1915-8.
- **Hanakahi, L. A., and S. C. West.** 2002. Specific interaction of IP6 with human Ku70/80, the DNA-binding subunit of DNA-PK *EMBO J.* **21**:2038-2044.
- **Hara, A.; Ebina, S.; Kondo, A.; Funaguma, T.** 1985. A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. *Agric. Biol. Chem.*, **49**:3539-3544.
- **Harland, B. F., and D. Oberleas.** 1999. Phytic acid complex in feed ingredients. Pages 69–75 in *Phytase in animal nutrition and waste management*. M. B. Coelho and E. T. Kornegay, ed. BASF, Mount Olive, NJ.
- **Harland, B. F., and E. R. Morris.** 1995. Phytate: a good or a bad food component? . *Nutr. Res.* **15**:733-754.
- **Harland, B. F., and G. Narula.** 1999. Food phytate and its hydrolysis products. *Nutr. Res.* **19**:947-961.
- **Haros, M., C. M. Rosell, and C. Benedito.** 2001. Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread. *J Agric Food Chem* **49**:5450-4.
- **Harper, A. F., E. T. Kornegay, and T. C. Schell.** 1997. Phytase supplementation of low-phosphorus growing-finishing pig diets improves performance, phosphorus digestibility, and bone mineralization and reduces phosphorus excretion. *J Anim Sci* **75**:3174-86.

- **Hegeman, C. E., and E. A. Grabau.** 2001. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. *Plant Physiol* **126**:1598-608.
- **Hirst P. H, Riley A. M., Mills S. J., Spiers I. D., Poyner D. R., Freeman S., Potter B. V., Smith A. W.** 1999. Inositol polyphosphate-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol.* **86**(3):537-43.
- **Hitz, W. D., Carlson, T.J., Kerr, P.S. & Sebastian, S.A. .** 2002. Biochemical and Molecular Characterization of a Mutation That Confers a Decreased Raffinosaccharide and Phytic Acid Phenotype on Soybean Seeds. *Plant Physiol.* **128**:650-660.
- **Holford I. C. R.** 1997. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Aust J Soil Res* **35**:227–239.
- **Holker, U., M. Hofer, and J. Lenz.** 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**:175-86.
- **Hong, C. Y., K. J. Cheng, T. H. Tseng, C. S. Wang, L. F. Liu, and S. M. Yu.** 2004. Production of two highly active bacterial phytases with broad pH optima in germinated transgenic rice seeds. *Transgenic Res* **13**:29-39.
- **Hong, H. B., Y. S. Chang, I. H. Nam, P. Fortnagel, and S. Schmidt.** 2002. Biotransformation of 2,7-dichloro- and 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas wittichii* RW1. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2584-2588.
- **Honke J, K. H., Vidal-Valverde C, Frias J, Górecky R** 1998. Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **206**:279-283.
- **Huang, H., H. Luo, P. Yang, K. Meng, Y. Wang, T. Yuan, Y. Bai, and B. Yao.** 2006. A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. *Biochem Biophys Res Commun* **350**:884-9.
- **Hubel, F., and E. Beck.** 1996. Maize Root Phytase (Purification, Characterization, and Localization of Enzyme Activity and Its Putative Substrate). *Plant Physiol* **112**:1429-1436.
- **Hurrell, R. F., M. B. Reddy, M. A. Juillerat, and J. D. Cook.** 2003. Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. *Am J Clin Nutr* **77**:1213-9.



- **Igbasan, F. A., K. Manner, G. Miksch, R. Borriss, A. Farouk, and O. Simon.** 2000. Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins. *Arch Tierernahr* **53**:353-73.
- **Jareonkitmongkol S., M. Ohya, R. Watanabe, H. Takagi, S. Nakamori.** 1997. "Partial purification of phytase from a soil isolate bacterium, *Klebsiella oxytoca* MO3". *J. Ferment. Bioeng.* **83**:393-394.
- **Jendza, J. A., R. N. Dilger, S. A. Adedokun, J. S. Sands, and O. Adeola.** 2005. *Escherichia coli* phytase improves growth performance of starter, grower, and finisher pigs fed phosphorus-deficient diets. *J Anim Sci* **83**:1882-9.
- **Jermutus, L., M. Tessier, L. Pasamontes, A. P. van Loon, and M. Lehmann.** 2001. Structure-based chimeric enzymes as an alternative to directed enzyme evolution: phytase as a test case. *J Biotechnol* **85**:15-24.
- **Johnson, L. F., M. E. Tate.** 1969. "The structure of myo-inositol pentaphosphates". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **165**:526-32.
- **Kaur, P., G. Kunze, and T. Satyanarayana.** 2007. Yeast phytases: present scenario and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol* **27**:93-109.
- **Kemme, P. A., A. W. Jongbloed, Z. Mroz, and A. C. Beynen.** 1997a. The efficacy of *Aspergillus niger* phytase in rendering phytate phosphorus available for absorption in pigs is influenced by pig physiological status. *J Anim Sci* **75**:2129-38.
- **Kemme, P. A., J. S. Radcliffe, A. W. Jongbloed, and Z. Mroz.** 1997b. Factors affecting phosphorus and calcium digestibility in diets for growing-finishing pigs. *J Anim Sci* **75**:2139-46.
- **Kerovuo, J., I. Lappalainen, and T. Reinikainen.** 2000a. The metal dependence of *Bacillus subtilis* phytase. *Biochem Biophys Res Commun* **268**:365-9.
- **Kerovuo, J., J. Rouvinen, and F. Hatzack.** 2000b. Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism. *Biochem J* **352 Pt 3**:623-8.
- **Kerovuo, J., M. Lauraeus, P. Nurminen, N. Kalkkinen, and J. Apajalahti.** 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **64**:2079-85.

- **Kies, A. K., L. H. De Jonge, P. A. Kemme, and A. W. Jongbloed.** 2006. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. In vitro studies. *J Agric Food Chem* **54**:1753-8.
- **Kim T.W., Lei X.G.** 2005. An improved method for a rapid determination of phytase activity in animal feed. *J. Anim. Sci.* **83**:1062-1067.
- **Kim, H. W., Y. O. Kim, J. H. Lee, K. K. Kim, and Y. J. Kim.** 2003. Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. *Biotechnol Lett* **25**:1231-4.
- **Kim, T., E. J. Mullaney, J. M. Porres, K. R. Roneker, S. Crowe, S. Rice, T. Ko, A. H. Ullah, C. B. Daly, R. Welch, and X. G. Lei.** 2006a. Shifting the pH profile of *Aspergillus niger* PhyA phytase to match the stomach pH enhances its effectiveness as an animal feed additive. *Appl Environ Microbiol* **72**:4397-403.
- **Kim, Y. O., H. W. Kim, J. H. Lee, K. K. Kim, and S. J. Lee.** 2006b. Molecular cloning of the phytase gene from *Citrobacter braakii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* **28**:33-8.
- **Kim, Y. O., J. K. Lee, H. K. Kim, J. H. Yu, and T. K. Oh.** 1998. Cloning of the thermostable phytase gene (*phy*) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **162**:185-91.
- **Klabunde, T., B. Stahl, H. Suerbaum, S. Hahner, M. Karas, F. Hillenkamp, B. Krebs, and H. Witzel.** 1994. The amino acid sequence of the red kidney bean Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase. Determination of the amino acid sequence by a combination of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and automated Edman sequencing. *Eur J Biochem* **226**:369-75.
- **Klabunde, T., N. Strater, R. Frohlich, H. Witzel, and B. Krebs.** 1996. Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures. *J Mol Biol* **259**:737-48.
- **Koebnik R.** 2005. TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *Trends Microbiol.* **13**:343–347.
- **Konietzny, U., R. Greiner, and K.-D. Jany.** 1995. Purification and characterization of phytase from spelt. *Journal of Food Biochemistry* **18**:165–183.

- **Konietzny, U.; R. Greiner.** 2002. Molecular and catalytic properties of phytase-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci. Technol.* **37**:791-812.
- **Kostrewa, D., F. Gruninger-Leitch, A. D'Arcy, C. Broger, D. Mitchell, and A. P. van Loon.** 1997. Crystal structure of phytase from *Aspergillus ficuum* at 2.5 Å resolution. *Nat Struct Biol* **4**:185-90.
- **Kretz, K. A., T. H. Richardson, K. A. Gray, D. Robertson, X. Tan, and J. M. Short.** 2004. Gene site saturation mutagenesis: a comprehensive mutagenesis approach. *Methods Enzymol.* **388**:3-11.
- **Laboure, A. M., J. Gagnon, and A. M. Lescure.** 1993. Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. *Biochem J* **295 ( Pt 2)**:413-9.
- **Laemmli U.,** 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* **227**:680-685.
- **Lamosa, P., A. Burke, R. Peist, R. Huber, M. Y. Liu, G. Silva, C. Rodrigues-Pousada, J. LeGall, C. Maycock, and H. Santos.** 2000. Thermostabilization of proteins by diglycerol phosphate, a new compatible solute from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl Environ Microbiol* **66**:1974-9.
- **Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, United Kingdom. pp. 115-175.
- **Lassen, S. F., J. Breinholt, P. R. Ostergaard, R. Brugger, A. Bischoff, M. Wyss, and C. C. Fuglsang.** 2001. Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Appl Environ Microbiol* **67**:4701-7.
- **Lee, S., T. Kim, C. H. Stahl, and X. G. Lei.** 2005. Expression of *Escherichia coli* AppA2 phytase in four yeast systems. *Biotechnol Lett* **27**:327-34.
- **Lehmann, M., D. Kostrewa, M. Wyss, R. Brugger, A. D'Arcy, L. Pasamontes, and A. P. van Loon.** 2000b. From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. *Protein Eng* **13**:49-57.

- **Lehmann, M., L. Pasamontes, S. F. Lassen, and M. Wyss.** 2000a. The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochim Biophys Acta* **1543**:408-415.
- **Lehmann, M., R. Lopez-Ulibarri, C. Loch, C. Viarouge, M. Wyss, and A. P. van Loon.** 2000c. Exchanging the active site between phytases for altering the functional properties of the enzyme. *Protein Sci* **9**:1866-72.
- **Lei, X. G., and C. H. Stahl.** 2001. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**:474-81.
- **Lei, X. G., and J. M. Porres.** 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnol Lett* **25**:1787-94.
- **Lei, X. G., P. K. Ku, E. R. Miller, and M. T. Yokoyama.** 1993. Supplementing corn-soybean meal diets with microbial phytase linearly improves phytate phosphorus utilization by weanling pigs. *J Anim Sci* **71**:3359-67.
- **Leys N. M, A. Ryngaert, L. Bastiaens, W. Verstraete, E. M. Top, D. Springael.** 2004. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol.* **70**(4):1944-55.
- **Li, D., H. Zhu, K. Liu, X. Liu, G. Leggewie, M. Udvardi, D. Wang.** 2002. Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *Journal of Biological Chemistry* **277**:27772–27781.
- **Li, J., C. E. Hegeman, R. W. Hanlon, G. H. Lacy, M. D. Denbow, and E. A. Grabau.** 1997. Secretion of active recombinant phytase from soybean cell-suspension cultures. *Plant Physiol* **114**:1103-11.
- **Lim, B. L., P. Yeung, C. Cheng, and J. E. Hill.** 2007. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *ISME J* **1**:321-30.
- **Lim, D., S. Golovan, C. W. Forsberg, and Z. Jia.** 2000. Crystal structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. *Nat Struct Biol* **7**:108-13.
- **Liu, B. L., A. Rafiq, Y. M. Tzeng, and A. Rob.** 1998. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme Microb. Technol.* **22**:415–424.

- **Liu, J., D. W. Bollinger, D. R. Ledoux, M. R. Ellersieck, and T. L. Veum.** 1997. Soaking increases the efficacy of supplemental microbial phytase in a low-phosphorus corn-soybean meal diet for growing pigs. *J Anim Sci* **75**:1292-8.
- **Loewus, F. A., and P. P. N. Murthy.** 2000. Myoinositol metabolism in plants. *Plant Sci.* **150**:1-19.
- **Lott, J. N. A.** 1984. Accumulation of seed reserves of phosphorus and other minerals. *Seed Physiology* (Murray, D.R., ed.):139-166.
- **Lucca, P., R. Hurrell, I. Potrykus.** 2001a. Approaches to improving the bioavailability and level of iron in rice seeds. *J Sci Food Agric* **81**:828–834.
- **Lucca, P., R. Hurrell, I. Potrykus.** 2001b. Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theor Appl Genet* **102**:392–397.
- **Lung, S. C., A. Leung, R. Kuang, Y. Wang, P. Leung, and B. L. Lim.** 2007. Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase. *Phytochemistry*. In press.
- **Lung, S., W. Chan, W. Yip, L. Wang, E. C. Yeung, B. L. Lim.** 2005. Secretion of beta-propeller phytase from tobacco and *Arabidopsis* roots enhances phosphorus utilization. *Plant Sci.* **169**:341–349.
- **Luo, H. R., A. Saiardi, H. Yu, E. Nagata, K. Ye, and S. H. Snyder.** 2002. Inositol pyrophosphates are required for DNA hyperrecombination in protein kinase C1 mutant yeast. *Biochem.* **41**:2509-2515.
- **Luo, H., H. Huang, P. Yang, Y. Wang, T. Yuan, N. Wu, B. Yao, and Y. Fan.** 2007. A novel phytase appA from *Citrobacter amalonaticus* CGMCC 1696: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. *Curr Microbiol* **55**:185-92.
- **Maenz, D. D., & H. L. Classen.** 1998. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poult Sci* **77**:557-63.
- **Mallin, M. A.** 2000. Impacts of industrial-scale swine and poultry production on rivers and estuaries. *American Scientist* **88**:26-37.
- **Manary, M.J., C. Hotz, N.F. Krebs, R.S. Gibson, J.E. Westcott, R.L. Broadhead, & K.M.Hambidge.** 2002a. Zinc homeostasis in Malawian children consuming a high-phytate, maize-based diet. *Am J Clin Nutr* **75**:1057-61.

- **Manary, M. J., N. F. Krebs, R. S. Gibson, R. L. Broadhead, and K. M. Hambidge.** 2002b. Community-based dietary phytate reduction and its effect on iron status in Malawian children. *Ann Trop Paediatr* **22**:133-6.
- **Martin, C. J, W. J. Evans.** 1986. Phytic acid-metal ion interactions. II. The effect of pH on Ca(II) binding. *J Inorg Biochem* **27**:17–30
- **Megharaj, M., Wittich, R.-M., Blasco, R., Pieper, D. H. & Timmis, K. N.** 1997. Superior survival and degradation of dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran in soil by soil-adapted *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl Microbiol Biotechnol* **48**, 109-114.
- **Mendoza, C., F. E. Viteri, B. Lonnerdal, K. A. Young, V. Raboy, and K. H. Brown.** 1998. Effect of genetically modified, low-phytic acid maize on absorption of iron from tortillas. *Am J Clin Nutr* **68**:1123-7.
- **Miksch, G., S. Kleist, K. Friehs, and E. Flaschel.** 2002. Overexpression of the phytase from *Escherichia coli* and its extracellular production in bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**:685-694.
- **Misset, O.** 2003. Phytase. *Food Sci Technol* **122**:687-706.
- **Mudge, S. R., F. W. Smith, A. E. Richardson.** 2003. Root-specific and phosphate-regulated expression of phytase under the control of a phosphate transporter promoter enables *Arabidopsis* to grow on phytate as a sole P source. *Plant Sci* **165**:871–878.
- **Mullaney, E. J., and A. H. Ullah.** 2003. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312** 179-184.
- **Mullaney, E. J., and A. H. Ullah.** 2005. Conservation of cysteine residues in fungal histidine acid phytases. *Biochem Biophys Res Commun* **328**:404-8.
- **Mullaney, E. J., C. B. Daly, and A. H. Ullah.** 2000b. Advances in phytase research. *Adv Appl Microbiol* **47**:157-99.
- **Mullaney, E. J., C. B. Daly, K. Sethumadhavan, E. Rodriguez, X. G. Lei, and A. H. Ullah.** 2000a. Phytase activity in *Aspergillus fumigatus* isolates. *Biochem Biophys Res Commun* **275**:759-63.
- **Mullaney, E. J., C. B. Daly, T. Kim, J. M. Porres, X. G. Lei, K. Sethumadhavan, and A. H. Ullah.** 2002. Site-directed mutagenesis of *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase at residue 300 to enhance catalysis at pH 4.0. *Biochem Biophys Res Commun* **297**:1016-20.

- **Nakai K, P. Horton.** 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci.* **24**(1):34-6.
- **Nakamura, Y., H. Fukuhara, and K. Sano.** 2000. Secreted phytase activities of yeasts. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**:841-844.
- **Nakano, T., T. Joh, K. Narita, and T. Hayakawa.** 2000. The pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytases from wheat bran of *Triticum aestivum* L. cv. Nourin #61. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**:995-1003.
- **Nakashima, B. A., T. A. McAllister, R. Sharma, and L. B. Selinger.** 2006. Diversity of Phytases in the Rumen *Microbial Ecology* **53**:82-88.
- **Nam, H.J., F. Poy, N. X. Krueger, H. Saito, and C. A. Frederick.** 1999. Crystal structure of the tandem phosphatase domains of RPTP LAR. *Cell* **97**:449–457.
- **Nelson, T. S., T. R. Shieh, R. J. Wodzinski, and J. H. Ware.** 1971. Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. *J Nutr* **101**:1289-93.
- **Nielsen H., J. Engelbrecht, S. Brunak & G. von Heijne.** 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein En*, **10**:1-6.
- **Nyannor, E. K., P. Williams, M. R. Bedford, and O. Adeola.** 2007. Corn expressing an *Escherichia coli*-derived phytase gene: a proof-of-concept nutritional study in pigs. *J Anim Sci* **85**:1946-52.
- **O'Dell, B.L., A. R. Boland, S. R. Koirtyohann.** 1972. Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* **20**:718–721.
- **O'Dell, B.L., A. R. Boland, S. R. Koirtyohann.** 1972. Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* **20**:718–721.
- **Ofojekwu, P. C., A. A. Kigbu.** 2002. Effects of Substituting Fish meal with sesame (*Sesamum Indicum*) cake on growth and food utilization of the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* *J. of Aquatic Sciences* **17**(1):45-49.

- **Oh, B. C., B. S. Chang, K. H. Park, N. C. Ha, H. K. Kim, B. H. Oh, and T. K. Oh.** 2001. Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *Biochemistry* **40**:9669-76.
- **Oh, B. C., M. H. Kim, B. S. Yun, W. C. Choi, S. C. Park, S. C. Bae, and T. K. Oh.** 2006. Ca(2+)-inositol phosphate chelation mediates the substrate specificity of beta-propeller phytase. *Biochemistry* **45**:9531-9.
- **Ohkawa, T., S. Ebisuno, M. Kitagawa, S. Morimoto, Y. Miyazaki, and S. Yasukawa.** 1984. Rice bran treatment for patients with hypercalciuric stones: experimental and clinical studies. *J Urol* **132**:1140-5.
- **Onyango, E. M., M. R. Bedford, and O. Adeola.** 2005. Efficacy of an evolved *Escherichia coli* phytase in diets of broiler chicks. *Poult Sci* **84**:248-55.
- **Pagano, A. R., K. Yasuda, K. R. Roneker, T. D. Crenshaw, and X. G. Lei.** 2007. Supplemental *Escherichia coli* phytase and strontium enhance bone strength of young pigs fed a phosphorus-adequate diet. *J Nutr* **137**:1795-801.
- **Pallauf, J., D. Hoehler, and G. Rimbach.** 1992. Effect of microbial phytase supplementation to a maize-soya diet on the apparent absorption of Mg, Fe, Cu, Mn and Zn and parameters of Zn status in piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr* **68**:1-9
- **Pallauf, J., S. Pippig, E. Most, and G. Rimbach.** 1999. Supplemental sodium phytate and microbial phytase influence iron availability in growing rats. *J Trace Elem Med Biol* **13**:134-40.
- **Park, S. C., Y. W. Choi, and T. K. Oh.** 1999. Comparative enzymatic hydrolysis of phytate in various animal feedstuff with two different phytases. *J Vet Med Sci* **61**:1257-9.
- **Pasamontes, L., M. Haiker, M. Henriquez-Huecas, D. B. Mitchell, and A. P. van Loon.** 1997b. Cloning of the phytases from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Biochim Biophys Acta* **1353**:217-23.
- **Pasamontes, L., M. Haiker, M. Wyss, M. Tessier, and A. P. van Loon.** 1997a. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* **63**:1696-700.



- **Pen, J., T. C. Verwoerd, P. A. van Paridon, R. F. Beudeker, P. J. M. van den Elzen, K. Geerse, J. D. van der Klis, H. A. J. Versteegh, A. J. J. van Ooyen, and A. Hoekema.** 1993. Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *BioTechnology* **11**:811-814.
- **Phillippy, B. Q.** 1999. Susceptibility of wheat and *Aspergillus niger* phytases to inactivation by gastrointestinal enzymes. *J Agric Food Chem* **47**:1385-8.
- **Phillippy, B. Q., and E. J. Mullaney.** 1997. Expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem* **45**:3337-3342
- **Piddington, C. S., C. S. Houston, M. Paloheimo, M. Cantrell, A. Miettinen-Oinonen, H. Nevalainen, and J. Rambosek.** 1993. The cloning and sequencing of the genes encoding phytase (phy) and pH 2.5-optimum acid phosphatase (aph) from *Aspergillus niger* var. *awamori*. *Gene* **133**:55-62.
- **Pilu, R., D. Panzeri, G. Gavazzi, S. K. Rasmussen, G. Consonni, and E. Nielsen.** 2003. Phenotypic, genetic and molecular characterization of a maize low phytic acid mutant (*lpa241*). *Theor Appl Genet* **107**:980-7.
- **Ponstein, A. S., J. B. Bade, T. C. Verwoerd, L. Molendijk, J. Storms, R. F. Beudeker, and J. Pen.** 2002. Stable expression of Phytase (phyA) in canola (*Brassica napus*) seeds: towards a commercial product. *Molecular Breeding* **10**:31-44
- **Posternak** 1903. Compt. Rend. 137, 202. Phytase. In: *Advances in Applied Microbiology*. 1996. 42: 263-302.
- **Potter, S. M.** 1995. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J Nutr* **125**:606S-611S.
- **Powar, V., K. Jagannathan.** 1982. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **151**(3):1102-8.
- **Raboy, V.** 1990. The biochemistry and genetics of phytic acid synthesis. In: Morre DJ, Boss W, Loewus FA (eds) Inositol metabolism in plants. Alan R. Liss, New York, pp. 52-73.
- **Raboy, V.** 1997. Accumulation and storage of phosphate and minerals. In: Larkins BA, Vasil IK (eds) Cellular and molecular biology of plant seed development. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 441-447.

- **Raboy, V.** 2001. Seeds for a better future: 'low phytate' grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. *Trends Plant Sci* **6**:458-62.
- **Raboy, V.** 2007. The ABCs of low-phytate crops. *Nature Biotechnology* **25**(8):874-875.
- **Raboy, V., and P. Gerbasi.** 1996. Genetics of myo-inositol phosphate synthesis and accumulation. *Subcell Biochem* **26**:257-85.
- **Rapoport, S., E. Leva, and G. M. Guest.** 1941. Phytase in plasma and erythrocytes of vertebrates. *J Biol Chem* **139**:621-632.
- **Ravindran, V., W. L. Bryden, and E. T. Kornegay.** 1995. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult Avian Biol Rev* **6**:125-143.
- **Reddy, N. R., S. K. Sathe, and D. K. Salunkhe.** 1982. Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* **28**:1-92.
- **Richardson, A. E., and P. A. Hadobas.** 1997. Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Can J Microbiol* **43**:509-16.
- **Richardson, A. E., P. A. Hadobas, and J. E. Hayes.** 2000. Phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots and utilisation of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. *Plant Cell Environ* **23**:397-405
- **Richardson, A. E., P. A. Hadobas, and J. E. Hayes.** 2001. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant J* **25**:641-9.
- **Rodriguez, E., E. J. Mullaney, and X. G. Lei.** 2000a. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **268**:373-8.
- **Rodriguez, E., J. M. Porres, Y. Han, and X. G. Lei.** 1999b. Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* phytase (r-PhyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase (r-AppA) to trypsin and pepsin in vitro. *Arch Biochem Biophys* **365**:262-7.
- **Rodriguez, E., Y. Han, and X. G. Lei.** 1999a. Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase gene (*appA2*) isolated from pig colon. *Biochem Biophys Res Commun* **257**:117-23.

- **Rodriguez, E., Z. A. Wood, P. A. Karplus, and X. G. Lei.** 2000b. Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys* **382**:105-12.
- **Roland, D. A., Sr., H. A. Ahmad, S. S. Yadalam, and T. Sefton.** 2003. Effect of Nongenetically Modified Phytase Supplementation on Commercial Leghorns. *J. Appl. Poult. Res.* **12**:257–263.
- **Rumsey, G. L.** 1993. Fish meal and alternate sources of protein in fish feeds. *Fisheries* **18**(7):14–19.
- **Saiardi, A., C. Sciambi, J. M. McCaffery, B. Wendland, and S. H. Snyder.** 2002. Inositol pyrophosphates regulate endocytic trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:14206-11.
- **Sandberg, A. S., L. R. Hulthen, and M. Turk.** 1996. Dietary *Aspergillus niger* phytase increases iron absorption in humans. *J Nutr* **126**:476-80.
- **Sano, K., H. Fukuhara, and Y. Nakamura.** 1999. Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*. *Biotechnol Lett* **21**:33-38.
- **Sasakawa, N., M. Sharif, and M. R. Hanley.** 1995. Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate. *Biochem. Pharmacology* **50**:137-146.
- **Schenk, G., L. W. Guddat, Y. Ge, L. E. Carrington, D. A. Hume, S. Hamilton, and J. de Jersey.** 2000. Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants. *Gene* **250**:117-25.
- **Schoener, F. J., and P. P. Hoppe.** 2002. The effects of phytase in poultry nutrition. In: McNab JM, Boorman KN (eds) Poultry feedstuffs: supply, composition and nutritive value. CAB International, Wallingford, UK. pp. 363-373.
- **Schwede T., J. Kopp, N. Guex, and M. C. Peitsch.** 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* **31**:3381-3385.
- **Scott, J. J.** 1991. Alkaline Phytase Activity in Nonionic Detergent Extracts of Legume Seeds. *Plant Physiol* **95**:1298-1301.

- **Segueilha, L., C. Lambrechts, H. Boze, G. Moulin, and P. Galzy.** 1992. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. *J Ferment Bioeng* **74**:7-11.
- **Selle, P. H., V. Ravindran, R. A. Caldwell, and W. L. Bryden.** 2000. Phytates and phytase: Consequences for protein utilization. *Nutr. Res. Rev.* **13**:255-278.
- **Shears, S. B.** 2004. How versatile are inositol phosphate kinases? *Biochem. J.* **377**:265-280.
- **Shi, J., H. Wang, J. Hazebroek, D. S. Ertl, and Harp.** 2005. The maize low-phytic acid 3 encodes a myo-inositol kinase that plays a role in phytic acid biosynthesis in developing seeds. *T. Plant J.* **42**:708-719.
- **Shi, J., H. Wang, Y. Wu, J. Hazebroek, R. B. Meeley, and D. S. Ertl.** 2003. The Maize Low-Phytic Acid Mutant lpa2 Is Caused by Mutation in an Inositol Phosphate Kinase. *Gene Plant Physiol.* **131**:507-515.
- **Shimizu, M.** 1993. Purification and characterization of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1. *Biosci Biotechnol Biochem* **57**:1364-1365.
- **Shin, S., N. C. Ha, B. C. Oh, T. K. Oh, and B. H. Oh.** 2001. Enzyme mechanism and catalytic property of beta propeller phytase. *Structure* **9**:851-8.
- **Silversides, F. G., T. A. Scott, and M. R. Bedford.** 2004. The effect of phytase enzyme and level on nutrient extraction by broilers. *Poult Sci* **83**:985-9.
- **Simon, O., and F. Igbasan.** 2002. In vitro properties of phytases from various microbial origins. *Int J Food Sci Technol* **37**:813-822.
- **Smith, A. W., Poyner, D. R., Hughes, H. K., Lambert, P. A.** 1994. Siderophore activity of myo-inositol hexakisphosphate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **176**, 3455-3459.
- **Strater, N., T. Klabunde, P. Tucker, H. Witzel, B. Krebs, K. K. Donegan, C. J. Palm, V. J. Fieland, L. A. Porteous, L. M. Ganio, D. L. Schaller, L. Q. Bucao, R. J. Seidler.** 1995. Crystal structure of a purple acid phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active site. *Science* **268**:1489-1492.

- **Stahl, C. H., K. R. Roneker, J. R. Thornton, and X. G. Lei.** 2000. A new phytase expressed in yeast effectively improves the bioavailability of phytate phosphorus to weanling pigs. *J Anim Sci* **78**:668-74.
- **Tambe, S. M., G. S. Kaklij, S. M. Kelkar, and L. J. Parekh.** 1994. Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: evidence for unusually small active enzyme peptide. *J Ferment Bioeng* **77**:23-27.
- **Tatala, S., U. Svanberg, and B. Mduma.** 1998. Low dietary iron availability is a major cause of anemia: a nutrition survey in the Lindi District of Tanzania. *Am J Clin Nutr* **68**:171-8.
- **Tomschy, A., M. Wyss, D. Kostrewa, K. Vogel, M. Tessier, S. Hofer, H. Burgin, A. Kronenberger, R. Remy, A. P. van Loon, and L. Pasamontes.** 2000. Active site residue 297 of *Aspergillus niger* phytase critically affects the catalytic properties. *FEBS Lett* **472**:169-72.
- **Tye, A. J., F. K. Siu, T. Y. Leung, and B. L. Lim.** 2002. Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**:190-7.
- **Ullah, A. H., and B. J. Cummins.** 1987. Purification, N-terminal amino acid sequence and characterization of pH 2.5 optimum acid phosphatase (E.C. 3.1.3.2) from *Aspergillus ficuum*. *Prep Biochem* **17**:397-422.
- **Ullah, A. H., and D. M. Gibson.** 1987. Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep Biochem* **17**:63-91.
- **Ullah, A. H., and E. J. Mullaney.** 1996. Disulfide bonds are necessary for structure and activity in *Aspergillus ficuum* phytase. *Biochem Biophys Res Commun* **227**:311-7.
- **Ullah, A. H., and K. Sethumadhavan.** 2003. PhyA gene product of *Aspergillus ficuum* and *Peniophora lycii* produces dissimilar phytases. *Biochem Biophys Res Commun* **303**:463-8.
- **Ullah, A. H., K. Sethumadhavan, E. J. Mullaney, T. Ziegelhoffer, and S. Austin-Phillips.** 2002. Cloned and expressed fungal phyA gene in alfalfa produces a stable phytase. *Biochem Biophys Res Commun* **290**:1343-8.

- **Van der Kaay, J., and P J Van Haastert.** 1995. Stereospecificity of inositol hexakisphosphate dephosphorylation by *Paramecium* phytase. *Biochem J.* **312**(Pt 3):907–910.
- **Vance, C. P., S. C. Uhde, D. L. Allan.** 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a non-renewable resource. *New Phytol* **157**:423–447.
- **Verwoerd, T. C., P. A. van Paridon, A. J. van Ooyen, J. W. van Lent, A. Hoekema, and J. Pen.** 1995. Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves. *Plant Physiol* **109**:1199-205.
- **Veum, T. L., D. W. Bollinger, C. E. Buff, and M. R. Bedford.** 2006. A genetically engineered *Escherichia coli* phytase improves nutrient utilization, growth performance, and bone strength of young swine fed diets deficient in available phosphorus. *J Anim Sci* **84**:1147-58.
- **Vohra, A., and T. Satyanarayana.** 2001. Phytase production by the yeast, *Pichia anomala*. *Biotechnol Lett* **23**:551-554.
- **Vohra, A., and T. Satyanarayana.** 2002. Purification and characterization of a thermostable and acid-stable phytase from *Pichia anomala*. *World J Microbiol Biotechnol* **18**:687-691.
- **Vohra, A., and T. Satyanarayana.** 2003. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit Rev Biotechnol* **23**:29-60.
- **Vucenik, I., and A. M. Shamsuddin.** 2003. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic. *J Nutr* **133**:3778S-3784S.
- **Wang, X. Y., F. G. Meng, and H. M. Zhou.** 2004. The role of disulfide bonds in the conformational stability and catalytic activity of phytase. *Biochem Cell Biol* **82**:329-34.
- **Wang, Y., X. Gao, Q. Su, W. Wu, and L. An.** 2007. Cloning, expression, and enzyme characterization of an acid heat-stable phytase from *Aspergillus fumigatus* WY-2. *Curr Microbiol* **55**:65-70.
- **Ward, K. A.** 2001. Phosphorus-friendly transgenics. *Nat Biotechnol* **19**:415-6.

- **Wilkes, H., Wittich, R. M., Timmis, K. N., Fortnagel, P. & Francke, W.** 1996. Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl Environ Microbiol* **62**, 367-371.
- **Wittich, R.-M., H. Wilkes, V. Sinnwell, W. Francke, and P. Fortnagel.** 1992. Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1005-1010.
- **Wyss, M., L. Pasamontes, A. Friedlein, R. Remy, M. Tessier, A. Kronenberger, A. Middendorf, M. Lehmann, L. Schnoebelen, U. Rothlisberger, E. Kuszniir, G. Wahl, F. Muller, H. W. Lahm, K. Vogel, and A. P. van Loon.** 1999a. Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl Environ Microbiol* **65**:359-66.
- **Wyss, M., R. Brugger, A. Kronenberger, R. Remy, R. Fimbel, G. Oesterhelt, M. Lehmann, and A. P. van Loon.** 1999b. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl Environ Microbiol* **65**:367-73.
- **Xiang, T., Q. Liu, A. M. Deacon, M. Koshy, I. A. Kriksunov, X. G. Lei, Q. Hao, and D. J. Thiel.** 2004. Crystal structure of a heat-resilient phytase from *Aspergillus fumigatus*, carrying a phosphorylated histidine. *J Mol Biol* **339**:437-45.
- **Xiao, K., M. J. Harrison, and Z. Y. Wang.** 2005. Transgenic expression of a novel *M. truncatula* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by *Arabidopsis*. *Planta* **222**:27-36.
- **Xiong, A. S., Q. H. Yao, R. H. Peng, Z. Zhang, F. Xu, J. G. Liu, P. L. Han, and J. M. Chen.** 2006. High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**:1039-47.
- **Yang, W. J., Y. Matsuda, M. Inomata, and H. Nakagawa.** 1991. Developmental and dietary induction of the 90K subunit of rat intestinal phytase. *Biochim Biophys Acta* **1075**:83-7.
- **Yanke, L. J., H. D. Bae, L. B. Selinger, and K. J. Cheng.** 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology* **144**:1565-1573.

- **Yi, Z., E. T. Kornegay, and D. M. Denbow.** 1996c. Supplemental microbial phytase improves zinc utilization in broilers. *Poult Sci* **75**:540-6.
- **Yi, Z., E. T. Kornegay, and D. M. Denbow.** 1996d. Effect of microbial phytase on nitrogen and amino acid digestibility and nitrogen retention of turkey poults fed corn-soybean meal diets. *Poult Sci* **75**:979-90.
- **Yi, Z., E. T. Kornegay, V. Ravindran, and D. M. Denbow.** 1996b. Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculation of phosphorus equivalency values for phytase. *Poult Sci* **75**:240-9.
- **Yi, Z., E. T. Kornegay, V. Ravindran, M. D. Lindemann, and J. H. Wilson.** 1996a. Effectiveness of Natuphos phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in soybean meal-based semipurified diets for young pigs. *J Anim Sci* **74**:1601-11.
- **Yip, W., L. Wang, C. Cheng, W. Wu, S. Lung, and B. L. Lim.** 2003. The introduction of a phytase gene from *Bacillus subtilis* improved the growth performance of transgenic tobacco. *Biochem Biophys Res Commun* **310**:1148-54.
- **Yoon, J. H., L. U. Thompson, and D. J. Jenkins.** 1983. The effect of phytic acid on in vitro rate of starch digestibility and blood glucose response. *Am J Clin Nutr* **38**:835-42.
- **Yoon, S. J., Y. J. Choi, H. K. Min, K. K. Cho, J. W. Kim, S. C. Lee, & Y. H. Jung.** 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microb Technol* **18**:449-454.
- **Zamudio, M., A. Gonzalez, and J. A. Medina.** 2001. *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Lett Appl Microbiol* **32**:181-4.
- **Zhang, L., L. An, X. Gao, Y. Wang.** 2005. Properties of *A. ficuum* AS3.324 phytase expressed in tobacco, *Process Biochem.* 40:213–216.
- **Zhang, Z., R. R. Marquardt, W. Guenter, J. Cheng, and Z. Han.** 2000. Prediction of the effect of enzymes on chick performance when added to cereal-based diets: use of a modified log-linear model. *Poult Sci* **79**:1757-66.



## 6. Bibliografia

- **Zhao, D. M., M. Wang, X. J. Mu, M. L. Sun, and X. Y. Wang.** 2007. Screening, cloning and overexpression of *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris* with favourable characteristics. *Lett Appl Microbiol* **45**:522-8.
- **Zinin, N. V., A. V. Serkina, M. S. Gelfand, A. B. Shevelev, and S. P. Sineoky.** 2004. Gene cloning, expression and characterization of novel phytase from *Obesumbacterium proteus*. *FEMS Microbiol Lett* **236**:283-90.
- **Zou, L. K., H. N. Wang, X. Pan, T. Xie, Q. Wu, Z. W. Xie, and W. R. Zhou.** 2006. Design and expression of a synthetic phyC gene encoding the neutral phytase in *Pichia pastoris*. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai) **38**:803-11.

## **RINGRAZIAMENTI**

*Vorrei ringraziare il Professore Nelson Marmioli, coordinatore del mio Dottorato di ricerca, e la Professoressa Anna Maria Sanangelantoni, mio docente guida, per l'opportunità che mi hanno offerto e per avermi seguito durante questi anni. Ringrazio, inoltre, il Dipartimento di Scienze Ambientali, per le strutture messe a mia disposizione, e tutto il laboratorio della sezione di Genetica e Biotecnologie Ambientali. Grazie al Professore José Berenguer de Carlos, per l'importantissima esperienza svolta nel suo laboratorio presso l'Università Autonoma di Madrid.*

*Un ringraziamento particolare va a Marina, per l'aiuto ed il sostegno che mi ha dato in tutti questi anni.*

*Il mio lavoro è stato realizzato grazie al contributo dei seguenti progetti di ricerca:*

- ✓ *FIRB 2001-RBAU015FL2\_003 "Selezione e caratterizzazione di geni ed enzimi ecofunzionali da batteri Gram positivi ad alto contenuto in GC per studi ecologici e di biorisanamento "*
- ✓ *ASI-1B1121-X4 "Evoluzione diretta di enzimi termofili"*
- ✓ *FIL 2004-2005-2006-2007*
- ✓ *Azioni integrate Italia-Spagna IT538 "Expression of a plant phytase in Thermus thermophilus and molecular evolution towards thermostabilization"*