



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

PRODUZIONE E PURIFICAZIONE DI UN ENZIMA
RICOMBINANTE COINVOLTO NEL METABOLISMO
DELLA VITAMINA B3

PRODUCTION AND PURIFICATION OF A
RECOMBINANT ENZYME INVOLVED IN VITAMIN B3
METABOLISM

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
Laura Mattiacci

Relatore:
PROF.SSA NADIA RAFFAELLI

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE	3
ELENCO DELLE FIGURE	4
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	5
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE.....	6
1.1 Cos'è un enzima ricombinante.....	6
1.2 Enzimi ricombinanti utilizzati nell'industria alimentare	7
1.3 Enzimi ricombinanti utilizzati in altri campi.....	12
1.4 Sicurezza degli enzimi ricombinanti utilizzabili in campo alimentare.....	13
1.5 Scopo della tesi.....	14
CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI.....	15
2.1 Cromatografia di affinità su resina Ni-NTA in FPLC.....	15
2.2 Cromatografia ad esclusione molecolare.....	16
2.3 Determinazione della concentrazione proteica.....	16
2.4 Determinazione dell'attività ricombinante dell'enzima Nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT).....	17
2.5 Elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE).....	19
2.6 Espressione e purificazione della proteina ricombinante Nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT).....	20
CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE.....	24
CONCLUSIONI.....	28
BIBLIOGRAFIA.....	29
SITOGRAFIA.....	32
RINGRAZIAMENTI.....	33

ELENCO DELLE TABELLE

<i>Tabella I</i> Caratteristiche del gradiente utilizzato per la cromatografia in FPLC.	23
<i>Tabella II: Tabella di purificazione dell'enzima NAMPT</i>	25

ELENCO DELLE FIGURE

<i>Figura 1 Modalità di produzione di un enzima ricombinante</i>	<i>6</i>
<i>Figura 2 Microrganismi ospiti e le proteine ricombinanti espresse.....</i>	<i>8</i>
<i>Figura 3 Cromatografia di affinità su resina Ni-NTA.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 4 Reazioni enzimatiche accoppiate alla reazione di interesse</i>	<i>17</i>
<i>Figura 5 Saggio spettrofotometrico.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 6 Modalità di espressione della proteina di interesse.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 7 Profilo di eluizione della cromatografia su resina Ni-NTA</i>	<i>26</i>
<i>Figura 8 Ingrandimento del picco di interesse</i>	<i>26</i>
<i>Figura 9 Elettroforesi dei singoli step di purificazione: estratto grezzo, Ni-NTA, PD-10.....</i>	<i>27</i>

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

Abs: assorbanza

ADH: alcol deidrogenasi

ATP: adenosina trifosfato

BSA: siero albumina bovina

DNA: acido deossiribonucleico

DTT: ditiotreitolo

FDA (food and drug administration): agenzia per gli alimenti e i medicinali

FPLC: Fast protein liquid chromatography, cromatografia liquida per proteine

His-tag: etichetta polistidina

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside

NAD/NADH: nicotinammide adenin dinucleotide, e la sua forma ridotta

Nam: nicotinammide

NAMPT: nicotinammide fosforibosiltransferasi

Ni-NTA: Nichel, acido nitrilacetico

NMN: nicotinammide mononucleotide

NMNAT: nicotinammide mononucleotide adenililtrasferasi

NTA: acido nitrilacetico

OD: densità ottica

PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro

PPi: pirofosfato

PRPP: 5-fosforibosil-1-pirofosfato

RNA: acido ribonucleico

SCF (scientific committee for food): comitato scientifico per l'alimentazione umana

SDS: sodio dodecil solfato

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato

TCEP: tris (2-carbossietil) fosfina

Capitolo 1

INTRODUZIONE

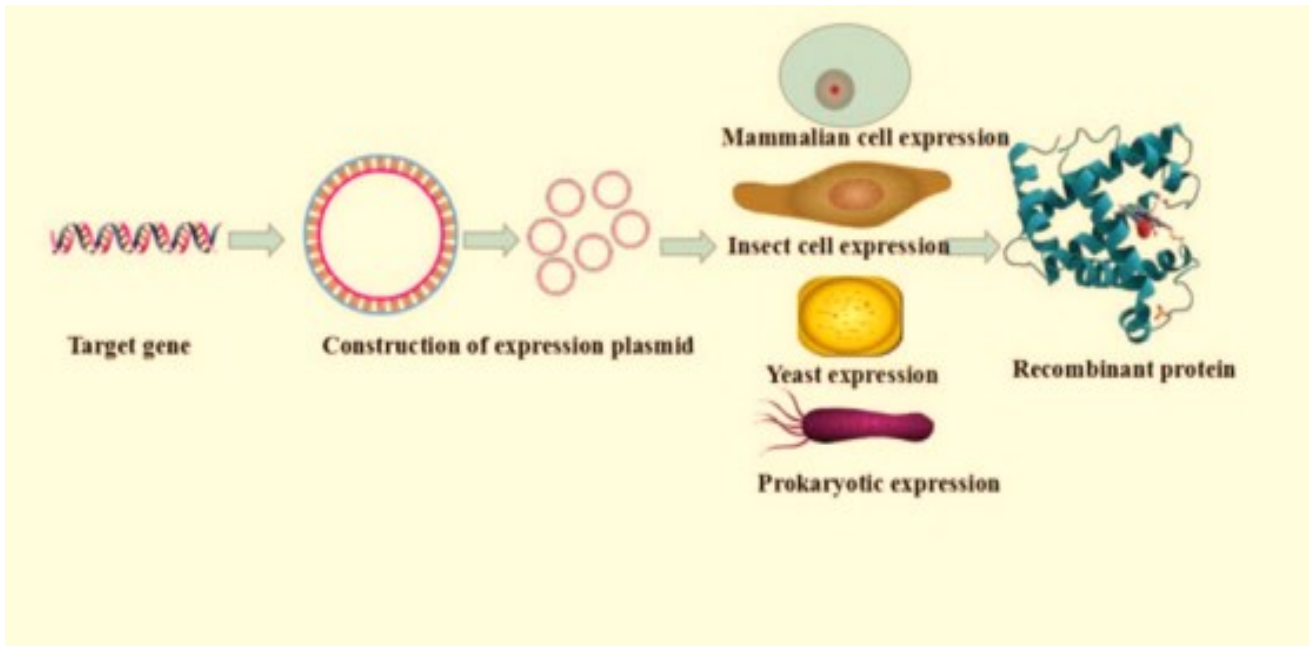


Figura 1 Modalità di produzione di un enzima ricombinante

1.1 Cos'è un enzima ricombinante

Un enzima è una molecola proteica; la sua funzione principale, nonché essenziale per tutti gli organismi viventi è quella di catalizzatore biologico. Queste proteine infatti, catalizzano reazioni necessarie a supportare la vita, in quanto in loro assenza tali reazioni risulterebbero troppo lente e quindi incompatibili con le esigenze dell'organismo umano.

Una delle applicazioni di maggior successo e utilità nel campo delle biotecnologie è quella dell'impiego degli enzimi ricombinanti.

Un enzima ricombinante è un enzima ottenuto attraverso tecniche di ricombinazione in vitro.

Il gene codificante l'enzima d'interesse viene inserito in un vettore, solitamente si utilizza un plasmide, dopodiché il vettore deve esser inserito all'interno dell'organismo ospite. Sfruttando il

macchinario per la trascrizione e traduzione delle proteine dell'ospite, il gene di interesse viene trascritto e la proteina corrispondente viene espressa nell'ospite (Figura 1). Successivamente la proteina viene estratta e sottoposta ad un processo di purificazione. Come organismi ospiti, sono molto impiegati batteri e i lieviti. La scelta del sistema cellulare ospite dipende dal tipo di proteina ricombinante che si vuole ottenere. Le cellule eucariotiche sono utilizzate come cellule ospiti, quando si vuole ottenere una proteina che non si rivelerebbe funzionale se espressa in un ospite batterico, come ad esempio una proteina che necessita di modificazioni post-traduzionali, che le cellule procariotiche non effettuano.

Dopo essere state purificate le proteine ricombinanti utilizzate nei processi alimentari sono vendute sottoforma di preparazioni.

Una preparazione proteica tipicamente contiene la proteina d'interesse e svariate altre sostanze aggiunte come: diluenti, conservanti e stabilizzanti.

I materiali aggiunti sono solitamente sostanze ben conosciute adatte ad essere utilizzate all'interno di alimenti.

Le preparazioni proteiche potrebbero anche contenere altre sostanze derivanti dalla produzione degli organismi e i residui delle materie prime usati nei substrati di fermentazione e durante l'isolamento e purificazione delle stesse proteine (Olempska-Beer, et al., 2006).

Tra i vari campi di applicazione degli enzimi ricombinanti troviamo quello dell'industria alimentare, dove questi enzimi vengono sfruttati per catalizzare reazioni coinvolte nel processo di produzione, lavorazione, preparazione e trattamento degli alimenti.

1.2 Enzimi ricombinanti utilizzati nell'industria alimentare

L'utilizzo di enzimi nelle produzioni alimentari risale al 1874, quando lo scienziato danese Christian Hansen estrasse la chimosina (rennina) dallo stomaco di vitelli per usarla nella produzione di formaggi.

La chimosina è oggi prodotta da microrganismi che contengono il gene bovino che la codifica, il quale viene introdotto nell'ospite attraverso tecniche che sfruttano DNA ricombinante (rDNA).

La chimosina di bovini venne espressa in *E.coli* K-12, uno tra gli ospiti tutt'ora più utilizzati; questo enzima fu il primo ricombinante approvato per l'utilizzo negli alimenti dall'agenzia americana per gli alimenti e i medicinali (FDA) (Olempska-Beer, et al., 2006).

In figura 2 vengono riportati gli ospiti principali per la produzione di enzimi e accanto ad essi gli enzimi ricombinanti che vengono prodotti.

Source microorganism	Enzyme
<i>Aspergillus niger</i>	Phytase Chymosin Lipase
<i>Aspergillus oryzae</i>	Esterase–lipase Aspartic protecinase Glucose oxidase Laccase Lipase Pectin esterase Phospholipase A1
<i>Bacillus licheniformis</i>	α -amylase
<i>Bacillus subtilis</i>	Pullulanase α -acetolactate decarboxylase α -amylase Maltogenic amylase Pullulanase
<i>Escherichia coli</i> K-12	Chymosin
<i>Fusarium venenatum</i>	Xylanase
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i>	Chymosin
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biovar I	α -amylase
<i>Trichoderma reesei</i>	Pectin lyase

Figura 2 Microrganismi ospiti e le proteine ricombinanti espresse

Nel 1991 venne prodotto ed immesso nel mercato il primo enzima fitasi ricombinante, utilizzando come ospite *A. niger*. Tale enzima è capace di idrolizzare l'acido fitico, il quale, grazie alla sua struttura ha la capacità di chelare in maniera forte cationi come calcio, magnesio, zinco, rame, ferro e potassio, formando sali insolubili, e provocando di conseguenza un'incapacità di assorbimento nell'organismo.

Le fitasi sono quindi utilizzate per degradare i fitati durante i processi alimentari e nel tratto gastro-intestinale. Durante le trasformazioni dei prodotti alimentari infatti, i fitati non vengono completamente idrolizzati dalle fitasi endogene, e dato che essi devono esser ridotti a livelli minimi, per aumentare la biodisponibilità di minerali, in particolare di ferro, durante tali trasformazioni, è desiderata l'aggiunta di fitasi esogene.

Attualmente i mangimi per animali, in particolare mangimi per maiali, polli e pesci, sono gli unici prodotti commerciali addizionati di fitasi. Per quanto riguarda gli alimenti destinati al consumo umano nessun prodotto addizionato di fitasi ha ancora trovato posto sul mercato (Greiner, et al., 2006).

Nell'industria lattiero casearia, in particolare nella produzione di formaggi, viene sfruttata sia la chimosina espressa in *E.coli* K-12, sia quella espressa in *A. niger* e in *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* (Bressanini, 2018) (Bonekamp, et al., 1994). Questo enzima, a seguito dell'idrolisi della k-caseina in corrispondenza del legame peptidico fra fenilalanina 105 e metionina 106, determina la destabilizzazione della micella proteica, con conseguente distacco del caseino macropeptide, che viene rilasciato nel siero, e precipitazione della para k-caseina, che formerà il coagulo.

Un'altra classe di enzimi ricombinanti è quella delle lipasi, enzimi che catalizzano l'idrolisi di trigliceridi in glicerolo e acidi grassi liberi.

Tra i maggior produttori di questi enzimi ritroviamo funghi appartenenti al genere *Aspergillus*, in particolare le specie *A. niger* e *A. oryzae*.

Le lipasi sono comunemente usate nel processo di produzione di alimenti, di grassi e oli; la maggior parte di quelle commercializzate vengono utilizzate per migliorare l'aroma di alimenti come carne, frutta, verdure, carpa affumicata, latticini, prodotti da forno e birra (Colabone Celligoi, 2016).

Sempre utilizzando *A. oryzae* come ospite ricombinante vengono prodotte anche le proteasi aspartiche; questi enzimi hanno residui di acido aspartico essenziali per l'attività catalitica. Essi hanno un'ampia applicazione nell'industria alimentare, che va dalla formazione del coagulo per la produzione di formaggio, alla degradazione della torbidità proteica in succhi di frutta e liquori, alla modificazione del glutine del grano (Mamo, et al., 2018).

A. oryzae può inoltre esser sfruttato per la produzione dell'enzima glucosio-ossidasi (GOX), il quale ossida il glucosio a D-glucono-1,5-lattone e perossido d'idrogeno (H₂O₂) (Fernandes, 2018) (Singh, et al., 2019). L'enzima rimuove ossigeno e questo stabilizza cibi e bevande come succhi di frutta, latte in polvere, maionese, prevenendo l'ossidazione che andrebbe a provocare cambiamenti di colore e sapore durante lo stoccaggio. Questo enzima inoltre è utilizzato per stabilizzare gli albumi, in quanto, trasformando il glucosio limita la reazione di Maillard e quindi l'imbrunimento e i cambiamenti di colore durante lo stoccaggio (Sheldon, 2005).

A. oryzae può esser usata per produrre l'enzima ricombinante laccasi, di cui si va a sfruttare la capacità di ossidare composti fenolici, in particolare nell'industria alimentare per la produzione di prodotti da forno, vino birra e succhi di frutta.

Dato che i composti fenolici inibiscono il processo di fermentazione, l'aggiunta dell'enzima, diminuendo la quantità di tali composti, determina un aumento della produzione di etanolo, che a sua volta comporta l'ottenimento di prodotti da forno con maggior volume, migliori caratteristiche organolettiche e maggior morbidezza.

Un altro impiego delle laccasi è quello della chiarificazione di vino, birra e succhi di frutta: anche in questo caso viene sfruttata la capacità di questi enzimi di rimuovere i composti fenolici (Brijwani, et al., 2010).

A.oryzae è inoltre utilizzato come ospite per la produzione di preparazioni commerciali di pectin esterasi. Questo enzima va ad agire sulle pectine, ossia polisaccaridi ad elevato peso molecolare, costituite da unità di acido galatturonico (con una percentuale variabile di gruppi carbossilici metilati), legate attraverso legami α 1,4 glicosidici, che costituiscono circa il 30% della parete cellulare delle cellule vegetali. Da un punto di vista tecnologico le pectine sono responsabili della compattezza e consistenza del frutto che si riflette sulla viscosità e la consistenza dei derivati industriali. Pertanto, occorre evitare o limitare le modifiche chimiche ed enzimatiche delle pectine per migliorare la consistenza degli alimenti vegetali. I concentrati di pomodoro, sono una classe merceologica in cui la consistenza rappresenta una delle caratteristiche qualitative determinanti il valore commerciale. L'enzima pectin esterasi agisce sulle pectine, rimuovendo i gruppi metilici legati ai gruppi carbossilici. La presenza di quasi dieci gruppi carbossilici successivi, privi del gruppo metilico, genera legami crociati tra le pectine per mezzo di interazioni elettrostatiche con gli ioni di calcio, di conseguenza si ha un aumento di consistenza del concentrato di pomodoro (Zúñiga-Hansen, et al., 2012), (Balestrieri, et al., 2009).

L'enzima ricombinante fosfolipasi A1 (LA1) prodotto usando come ospite *A.oryzae*, è stato introdotto nel mercato per aumentare la resa dei prodotti lattiero caseari, soprattutto di formaggi. Particolare interesse verso l'utilizzo di questi enzimi, che modificano i lipidi polari del latte, è emerso quando è stato dimostrato che la parziale idrolisi dei fosfolipidi presenti all'interno del latte permette un aumento della resa in formaggio. L'utilizzo delle fosfolipasi nella produzione di formaggio, sembrerebbe infatti, aumentare la resa in formaggio dell'1%, senza comprometterne la qualità. Questo aumento è dovuto alla capacità delle fosfolipasi di idrolizzare i fosfolipidi nelle due componenti polare e apolare: la componente apolare permette una maggior ritenzione di grassi, mentre la parte polare consente di trattenere all'interno della cagliata un maggiore umidità (Casado, et al., 2012).

L'enzima ricombinante α -amilasi è prodotto da specie di microrganismi geneticamente modificati. Tra le specie di batteri più utilizzate per la produzione commerciale di tale enzima ritroviamo *B.licheniformis*, *B.subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* Biovar I.

α -amilasi è un enzima che catalizza l'idrolisi dei legami α 1,4-glicosidici dell'amido liberando oligosaccaridi contenenti tre o più residui di glucosio; questa capacità viene sfruttata nell'industria alimentare per la produzione di sciroppo di glucosio e fruttosio dall'amido. In tale processo, che prevede l'utilizzo sequenziale di diversi tipi di amilasi, questo enzima funge da catalizzatore del primo step (Sundarram, et al., 2014).

L'enzima pullulanasi è un enzima idrolitico che va a tagliare i legami α 1,6-glicosidici dell'amido, dell'amilopectina, del pullulano e di altri oligosaccaridi. Questa proteina infatti permette una completa e efficiente conversione del polisaccaride ramificato in piccoli zuccheri fermentescibili durante il processo di saccharificazione. Per la sua produzione in elevate quantità vengono sfruttati diversi microrganismi: *B.licheniformis* e *B.subtilis* ne sono due esempi. Grazie alla sua capacità idrolitica viene sfruttato insieme all' α -amilasi nell'industria alimentare per la produzione di sciroppo di glucosio (Hii, et al., 2012).

L' α -acetolattato decarbossilasi è l'enzima che decarbossila l'acetolattato. Viene prodotto industrialmente a partire da un ceppo ricombinante di *B.subtilis*, è sfruttato nell'industria alimentare nella produzione della birra per evitare la conversione dell'acetolattato in α -diacetile, sostanza che produce un flavour sgradevole (Adrian, et al., 2009).

B.subtilis è inoltre indicato per la produzione industriale di un altro enzima: l'amilasi maltogenica. Questa proteina favorisce la degradazione dell'amido in maltosio e viene utilizzata come coadiuvante tecnologico per la produzione di pane e prodotti della pasticceria. Essa riduce la cristallizzazione dell'amido nella crosta in modo che venga rallentato il processo di rafforzamento del pane; inoltre può essere utilizzata per ricavare dall'amido liquefatto sciroppo di maltosio, il quale viene spesso utilizzato nell'industria alimentare al posto di quello di glucosio per dolcificare pietanze e bevande (Confederazione svizzera, Ufficio federale della sicurezza alimentare e veterinaria USAV, 2015).

L'enzima xilanasi viene prodotto utilizzando un ospite fungino: il *Fusarium venenatum*. Viene utilizzato nell'industria dei prodotti da forno per facilitare la lavorazione e la stabilità dell'impasto, permettendo inoltre di ottenere una mollica più soffice e uniforme e un maggior volume del pane (Pedersen, et al., 2010). Questa proteina è infatti capace di degradare l'emicellulosa nella farina di grano, favorendo in questo modo la redistribuzione dell'acqua e lasciando l'impasto più soffice e facile da lavorare.

Trichoderma reesei è un microrganismo essenziale per la produzione dell'enzima ricombinante pectinasi. Questa proteina va ad agire sulle pectine idrolizzando i legami α 1,4 glicosidici.

Viene sfruttata in campo enologico in quanto le pectine contenute nel materiale in sospensione del mosto conferiscono torbidità e viscosità; in seguito all'idrolisi si assiste ad una rapida riduzione della viscosità del mosto e un aumento della sua filtrabilità (Mojsov, 2013).

1.3 Enzimi ricombinanti utilizzati in altri campi

L'ambito alimentare non è l'unico in cui queste proteine trovano impiego.

Gli enzimi ricombinanti vengono utilizzati all'interno dei detersivi, in particolare le lipasi vengono aggiunte ai detersivi per favorire la rimozione dagli indumenti di macchie causate da sostanze ad elevato contenuto in grassi. Questi enzimi hanno il vantaggio di essere meno aggressivi sui tessuti rispetto alle sostanze chimiche utilizzate in passato; inoltre, permettono di ridurre i danni causati all'ambiente dalle sostanze chimiche che normalmente sono presenti nei detersivi. Gli enzimi infatti, diversamente dai costituenti convenzionali dei detersivi, sono biodegradabili, non tossici e non lasciano residui dannosi (Hasan, et al., 2010). Per quanto riguarda l'industria tessile, i principali enzimi utilizzati sono le amilasi, le cellulasi, e le proteasi. Le amilasi sono enzimi utilizzati nel campo del tessile dal 1980. Nell'industria tessile l'amido è utilizzato durante la lavorazione dei tessuti per proteggere le fibre. L'enzima α -amilasi è aggiunto per eliminare l'amido prima delle fasi finali della lavorazione (coloritura).

Le cellulasi invece, sono impiegate nell'industria tessile per il cotone e per l'effetto "consumato" tipico del tessuto dei jeans, ovvero il denim. In passato si utilizzava la pietra pomice al fine di effettuare delle abrasioni sul tessuto o schiarirne il colore; gli enzimi cellulasi sono in grado di compiere la stessa operazione in maniera più veloce e controllata, tanto da introdurre una scala di tonalità a seconda della concentrazione di enzima utilizzato.

Gli enzimi proteolitici, invece, vengono utilizzati per la lavorazione della lana.

L'enzima catalasi permette l'eliminazione dell'acqua ossigenata e il trattamento dei coloranti nelle fasi di candeggio e tintura dei tessuti. L'utilizzo di questo enzima consente un minor consumo di acqua (Araújo, et al., 2008).

Nel settore conciario, invece, lipasi e proteasi facilitano passaggi di lavorazione del cuoio e delle pelli come la macerazione e lo sgrassamento. Con un simile utilizzo altri enzimi sono stati introdotti nell'industria cartaria nelle fasi di sbiancamento.

Un settore in cui gli enzimi ricombinanti stanno acquisendo sempre più importanza è quello della produzione di biocarburanti, in particolare di propellenti a basso impatto ambientale che

permetteranno in futuro di abbandonare l'uso del petrolio, riducendo allo stesso tempo le emissioni inquinanti.

1.4 Sicurezza degli enzimi ricombinanti utilizzabili in campo alimentare

La valutazione di sicurezza riguardo gli enzimi ricombinanti utilizzabili nei processi alimentari è stata ampiamente discussa in letteratura, nei documenti guida emessi da enti normatori e organizzazioni internazionali, per esempio dal comitato scientifico per l'alimentazione umana (SCF).

In linea di principio, vengono fatte le stesse considerazioni sulla sicurezza degli enzimi derivanti da microrganismi ricombinanti e non.

Il componente chiave nella valutazione della sicurezza degli enzimi è la sicurezza delle specie sfruttate, in particolare il loro potenziale patogenico e tossinogenico (Olempska-Beer, et al., 2006).

I candidati principali come vettori sicuri per la produzione di enzimi ricombinanti sono queglii organismi, né patogenici né tossinogenici, già utilizzati (nella loro forma nativa, non come vettori ricombinanti) all'interno degli alimenti per operare delle trasformazioni, e dei quali, quindi, è certa la sicurezza.

Sebbene né microrganismi patogenici, né tossinogenici vengano intenzionalmente utilizzati nella produzione di enzimi per i processi alimentari, ricerche scientifiche in merito alla sicurezza degli enzimi ricombinanti, hanno rivelato che alcuni funghi tradizionalmente usati come produttori di enzimi producono metaboliti secondari tossici. La produzione dei metaboliti è favorita delle condizioni createsi durante il processo di trasformazione, tuttavia essendo il livello di questi metaboliti basso, essi non destano preoccupazione per quanto riguarda la sicurezza sulla salute dei consumatori (Olempska-Beer, et al., 2006).

1.5 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è stato quello di allestire una procedura per la produzione e la purificazione di un enzima ricombinante di possibile interesse industriale. L'enzima preso in esame è stato la Nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT), che trasforma la vitamina nicotinammide nella sua forma biologicamente attiva, cioè la Nicotinammide adenin dinucleotide (NAD). Il lavoro è consistito nella produzione della proteina ricombinante in cellule di *E.coli* e nella purificazione della proteina in maniera tale da mantenere la sua attività catalitica.

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

2.1 Cromatografia di affinità su resina Ni-NTA in FPLC

La cromatografia per affinità comporta l'immobilizzazione di un ligando, che mostra interazioni specifiche, ma reversibili con la molecola da purificare, ad una matrice solida. Quando si inserisce un campione biologico all'interno di una colonna riempita con la matrice di affinità, la molecola d'interesse si legherà specificamente al ligando, mentre le sostanze contaminanti verranno lavate via con la fase mobile, spesso costituita da un tampone.

La cromatografia per affinità su resina Ni-NTA utilizza una matrice che permette la purificazione di proteine ricombinanti che portano una sequenza di sei istidine all'N terminale (His-tag). Il ligando immobilizzato sulla matrice è l'acido nitrilacetico (NTA) che è in grado di chelare i metalli. Questo gli permette di occupare quattro dei siti di legame della sfera di coordinazione dello ione Ni^{2+} . La resina Ni-NTA sfrutta la capacità del Ni^{2+} di legare proteine a livello dei residui di istidina.

L'interazione tra lo ione metallico e le istidine presenti nella coda della proteina avviene quando quest'ultima viene fatta passare attraverso la matrice inserita dentro una colonna. Mentre la maggior parte delle proteine scorrerà lungo la colonna senza essere trattenute, quelle contenenti l'His-tag si legheranno. L'interazione tra le proteine e la matrice è mostrata in Fig. 3.

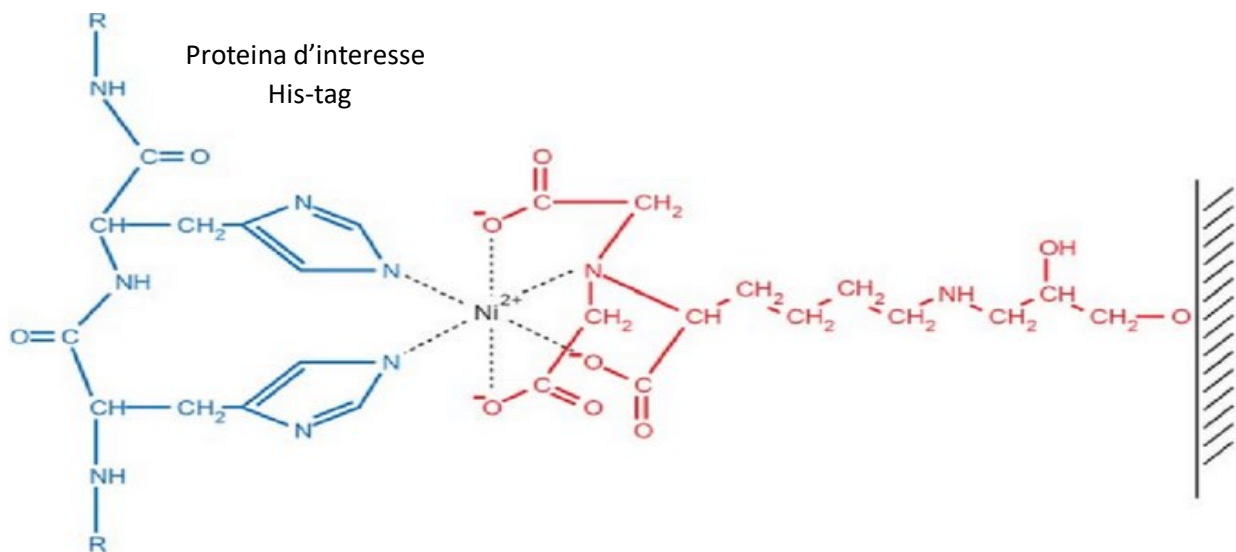


Figura 3 Cromatografia di affinità su resina Ni-NTA.

È mostrata l'interazione tra l' His-tag di una proteina ricombinante e lo ione Ni²⁺, chelato dal gruppo funzionale della resina cromatografica

2.2 Cromatografia ad esclusione molecolare

La cromatografia ad esclusione molecolare è una tecnica analitica usata per separare gli analiti sfruttando le dimensioni dei pori della fase stazionaria.

Le molecole più grandi passano attraverso gli spazi interstiziali della fase stazionaria e escono insieme all'eluente, mentre le molecole più piccole sono in grado di penetrare nelle particelle del gel che costituisce la fase stazionaria e scorreranno in maniera più o meno veloce a seconda delle loro dimensioni.

Il tipo di resina utilizzata in questo lavoro è la Sephadex G-25 (GE Helthcare), la quale permette una rapida separazione delle proteine ad alto peso molecolare da molecole di piccole dimensioni, compresi i sali. E' stata pertanto utilizzata per desalificare i campioni.

2.3 Determinazione della concentrazione proteica

Il metodo usato per misurare la concentrazione proteica è il metodo Bradford (Bradford 1976).

Il suo grande vantaggio è quello di non risentire di interferenze da parte di altre sostanze presenti come contaminanti non proteici, questo lo rende il metodo più comune e rapido per la misurazione spettrofotometrica della concentrazione proteica all'interno di un campione.

Il reattivo di Bradford è composto da Coomassie Brilliant Blue G-250 allo 0,001% in etanolo al 4,7% ed acido fosforico all'8,5%.

Il colorante in seguito al legame con la proteina modifica il suo massimo assorbimento da 465 nm a 595 nm. La densità ottica (OD) a 595 nm del complesso proteina-reattivo è direttamente proporzionale alla quantità della proteina nell'intervallo 2-10 µg. Costruendo una retta di taratura con una proteina standard, la siero albumina bovina (BSA), è possibile risalire alla concentrazione proteica del campione, tenendo conto della sua OD a 595 nm e del volume usato nel saggio.

2.4 Determinazione dell'attività ricombinante dell'enzima Nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT)

L'enzima NAMPT catalizza la formazione di Nicotinammide mononucleotide (NMN) a partire da Nicotinammide (Nam) e 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP).

L'attività enzimatica è stata determinata attraverso un saggio spettrofotometrico utilizzando un sistema di enzimi ancillari che trasformano l'NMN prodotto dall'enzima prima a NAD e poi a NADH (figura 4).

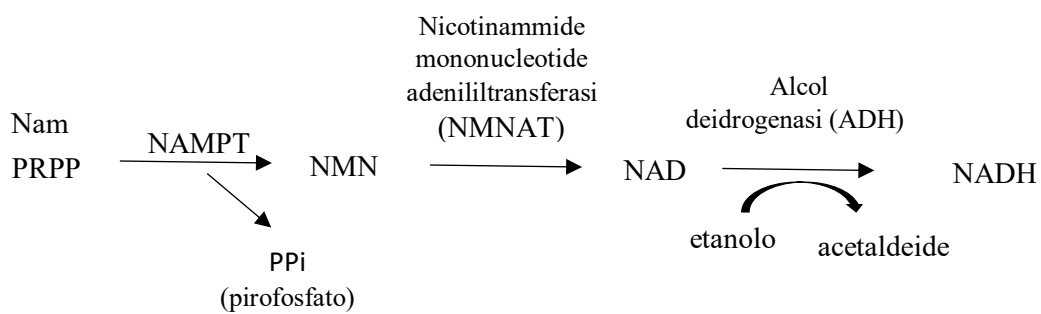


Figura 4 Reazioni enzimatiche accoppiate alla reazione di interesse

Il NADH viene sintetizzato a partire da NMN in seguito ad una serie di reazioni enzimatiche catalizzate dagli enzimi NMNAT e ADH.

La velocità di formazione dell'NMN, direttamente proporzionale alla velocità di formazione del NADH, viene rilevata attraverso lo spettrofotometro andando a monitorare nel tempo l'aumento di assorbanza a 340 nm alla temperatura di 37° C (temperatura ottimale dell'enzima).

La miscela di reazione è composta da: una opportuna quantità del campione da analizzare, Hepes 56 mM pH 7.5, etanolo assoluto 0,5% v/v, semicarbazide 14 mM, MgCl₂ 25 mM, adenosina trifosfato (ATP) 1 mM, Nam 0,01 mM, ADH 0,03 mg/ml, BSA 0,56 mg/ml, NMNAT 140 mU.

La miscela di reazione, viene riscaldata alla temperatura di 37° C in una cuvetta posta all'interno dello spettrofotometro, raggiunta la temperatura desiderata viene aggiunto il substrato PRPP alla concentrazione 0.1 mM in modo da far partire la reazione enzimatica.

In Fig. 5 è mostrato l'andamento dell'assorbanza (Abs) a 340 nm in funzione del tempo di reazione di due miscele contenenti due diverse quantità di enzima.

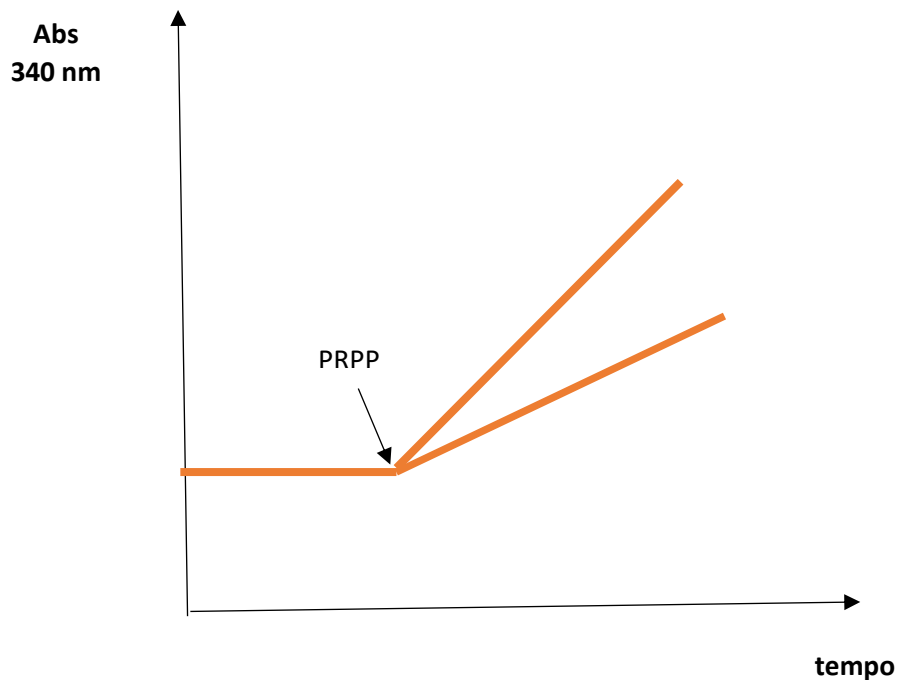


Figura 5 Saggio spettrofotometrico

L'aumento di assorbanza nel tempo si osserva solo dopo aver aggiunto PRPP

L'attività enzimatica (Unità/ml) è calcolata sulla base dell'aumento di assorbanza a 340 nm della miscela nel tempo ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) e viene calcolata con la seguente formula:

$$\text{Unità/ml} = \Delta\text{Abs}/\text{min} \cdot V_{\text{MIX}} / \epsilon \cdot V_{\text{ENZIMA}}$$

Dove:

- ΔAbs = aumento dell'assorbanza a 340 nm nell' intervallo di tempo espresso in min
- Min= tempo nel quale avviene l'incremento di assorbanza
- V_{MIX} = volume finale della miscela
- ϵ = coefficiente di estinzione millimolare del NADH (6,22)
- V_{ENZIMA} = volume della preparazione enzimatica nella miscela del saggio

2.5 Elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

L'elettroforesi utilizzata per verificare la purezza di un enzima viene realizzata su un gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), secondo il metodo Schagger (1987). Le proteine si muovono verso l'anodo in virtù della carica netta negativa fornita dal sodio dodecil solfato (SDS), infatti prima del caricamento sul gel, le proteine vengono trattate a 100° C con SDS, un detergente anionico che le denatura e conferisce loro una carica netta negativa permettendone la separazione in base al peso molecolare. Infatti, gli anioni dell'SDS si legano alle proteine in rapporto 1 molecola di SDS e 2 residui di amminoacidi; se la reazione tra le due componenti avviene in maniera adeguata, il risultato sarà l'ottenimento di complessi SDS-proteine aventi una carica netta negativa proporzionale alla massa della proteina. Inoltre, le proteine vengono trattate con il 2-mercaptoetanololo che spezza i ponti disolfuro che potrebbero essere localizzati inter- o intra-subunità.

I complessi SDS-proteina sono poi forzati a migrare in un gel di poliacrilammide e, sottoposti ad un campo elettrico di intensità costante, le proteine migreranno in direzione dell'elettrodo di segno opposto ossia l'anodo (polo +).

La velocità con cui le proteine migrano nella camera elettroforetica decresce linearmente all'aumentare del peso molecolare delle stesse (Zhu, et al., 2012), di conseguenza quelle più piccole migreranno più velocemente delle più grandi.

Una scelta molto importante nella separazione elettroforetica è quella del gel di poliacrilammide, ossia la matrice che permette la separazione dei campioni, in particolare le dimensioni dei pori. La grandezza dei pori, infatti, determina una maggiore o minor resistenza da parte dello stesso gel alla penetrazione da parte dell'enzima, ciò comporta che proteine ad alto peso molecolare vengono rallentate, mentre quelle a basso peso molecolare vengono fatte passare in modo più scorrevole.

Una volta effettuata la corsa elettroforetica le proteine devono essere colorate con coloranti che si fissano con forza ad esse. Il gel viene colorato per 45 minuti in agitazione con una soluzione costituita da Comassie Brilliant Blue R-250 0,1% (w/v), acido acetico 10% (v/v) metanolo 50% (v/v). Successivamente viene effettuata una decolorazione con una soluzione contenente 50% metanolo e 10% acido acetico fino ad ottenere l'ottimale visualizzazione delle bande proteiche. Il gel viene infine lasciato in una soluzione di conservazione composta da 5% di metanolo e 7% di acido acetico.

Confrontando la mobilità elettroforetica della banda corrispondente alla proteina d'interesse con quella di standard polipeptidici a peso molecolare noto, fatti migrare nelle stesse condizioni, è stato possibile risalire al peso molecolare dell'enzima NAMPT in condizioni denaturanti.

2.6 Espressione e purificazione della proteina ricombinante Nicotinammide fosforibosiltransferasi (NAMPT)

L'espressione della proteina ricombinante NAMPT è stata ottenuta per mezzo di cellule di *E.coli* BL21 (DE3) nelle quali è stato inserito il plasmide ricombinante contenente il gene per l'espressione della proteina di interesse.

Il particolare ceppo di cellule di *E.coli* sfruttate come ospiti, porta nel proprio cromosoma il gene che codifica per la T7 RNA polimerasi con a monte il promotore *lacUV5*, e il gene *lacI* che codifica per un repressore che legandosi al promotore *lacUV5* reprime la trascrizione della T7 RNA polimerasi. Questo promotore viene indotto da Isopropil β -d-1-tiogalattopiranoside (IPTG), infatti l'IPTG permette all'RNA polimerasi di legarsi al promotore *lacUV5* e di conseguenza di trascrivere T7 RNA polimerasi.

Il plasmide contenente il gene di interesse, porta a monte di quest'ultimo, il promotore per la polimerasi T7, a cui si va a legare la T7 RNA polimerasi, trascritta dal gene T7 in seguito

all'aggiunta di IPTG. Il legame della T7 RNA polimerasi al promotore T7 permette la trascrizione del gene target (figura 6).

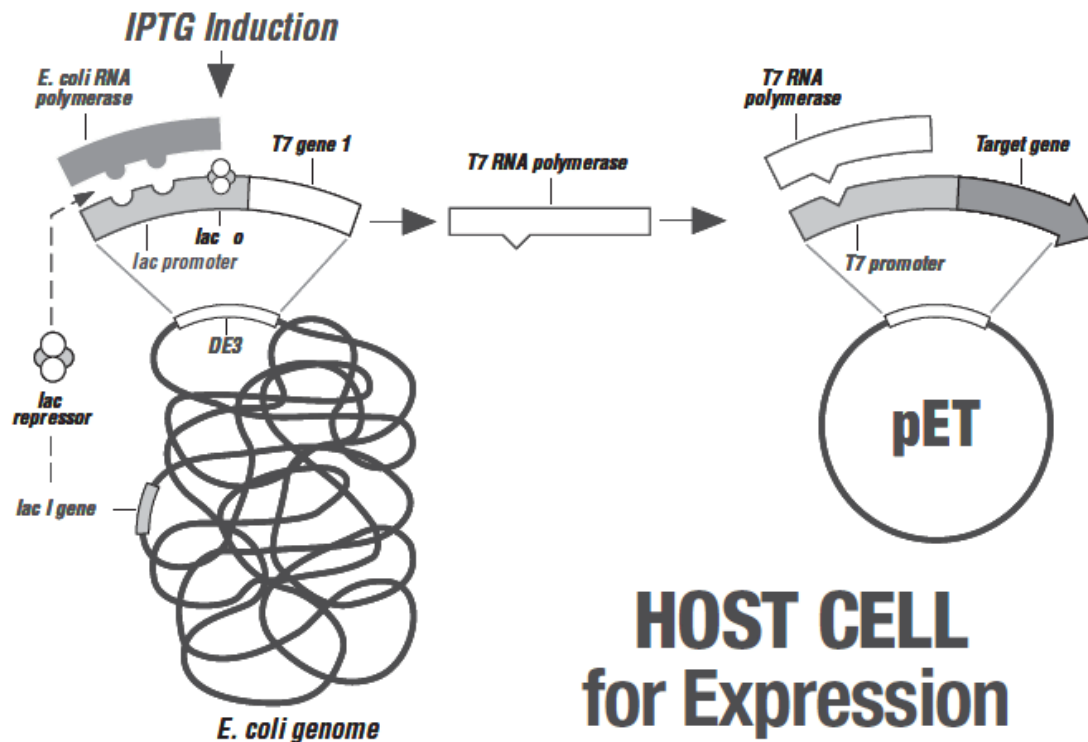


Figura 6 Modalità di espressione della proteina di interesse

Per l'espressione della proteina di interesse viene sfruttato un sistema di espressione basato sul gene T7.

Le cellule di *E. coli* trasformate col plasmide ricombinante sono state fatte crescere in terreno di coltura liquido Luria Bertani (LB) addizionato dell'antibiotico Ampicillina 100 µg/ml, a 37°C in agitazione per tutta la notte. Dopo crescita over night le cellule sono state inoculate in una coltura di maggior dimensioni, fino al raggiungimento di un OD₆₀₀ pari a 0,6-0,8. La coltura è stata lasciata a temperatura ambiente per circa 30 minuti, e poi addizionata di IPTG 0,8 mM, per indurre l'espressione della proteina, e incubata alla temperatura di 23° C.

Dopo circa 16 ore dall'induzione le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 5000g per 12 minuti mantenendo la temperatura a 4° C; i pellet cellulari ottenuti sono stati conservati a -20°C.

Per la preparazione dell'estratto grezzo, il pellet cellulare è stato opportunamente risospeso in tampone di lisi: Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 0,5 mM, imidazolo 10 mM, Chapso 2 mM, tris (2-carbossietil) fosfina (TCEP) 1 mM, con rapporto tampone/volume originale della coltura di 1/20. Al tampone sono stati aggiunti gli inibitori di proteasi: fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM e cocktail di inibitori di proteasi 50 µl/g di pellet. Dopo rottura meccanica delle cellule mediante sonicazione (4 cicli da 30 secondi con pausa di 30 secondi), la sospensione cellulare è stata centrifugata a 20 000 g per 30 minuti a 4° C.

Sul surnatante recuperato, che rappresenta l'estratto grezzo, è stata determinata la concentrazione proteica attraverso il metodo Bradford e l'attività enzimatica attraverso il saggio spettrofotometrico (come riportato rispettivamente nei paragrafi 2.3 e 2.4). L'estratto grezzo è stato poi sottoposto a cromatografia di affinità su resina Ni-NTA in FPLC (AKTA, Biotech Pharmacia).

La resina è stata equilibrata in tampone Hepes 50 mM pH 7.5, NaCl 0,5 M, imidazolo 10 mM, ditioneitolato (DTT) 1 mM (tampone A), ad un flusso costante di 1 ml/min. Dopo il caricamento del campione e un lavaggio con lo stesso tampone di equilibratura, l'eluizione è stata eseguita in 45 minuti applicando un gradiente discontinuo di imidazolo da 10 mM a 350 mM nel tampone A.

Le caratteristiche del gradiente sono riportate in tabella I.

Tempo (Min.)	% Tampone A + Imidazolo 10 mM	% Tampone B + Imidazolo 350 mM	Durata (Min.)
0	100	0	10
10	94	6	10
20	0	100	10
30	0	100	10
40	Fine		

Tabella I Caratteristiche del gradiente utilizzato per la cromatografia in FPLC.

Per durata si intende l'intervallo di tempo che il sistema impiega a raggiungere la composizione della fase mobile indicata nella seconda e terza colonna, a partire dal tempo della corsa cromatografica indicato nella prima colonna.

L'eluato è stato raccolto in frazioni e le frazioni cataliticamente attive sono state riunite in un pool che è stato desalificato mediante cromatografia su PD-10 (paragrafo 2.2).

Il tampone usato è composto da HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 0,3 M, 20% di glicerolo. Questo tampone è stato utilizzato per equilibrare la colonna.

Dopo l'equilibratura 2,5 ml di campione sono stati caricati nella colonna, e la resina è stata poi eluita con 3,5 ml di tampone.

Capitolo 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'enzima ricombinante NAMPT è stato purificato attraverso le tecniche descritte precedentemente (capitolo materiali e metodi) e i risultati ottenuti sono stati riportati nella tabella II.

Sono state scelte tecniche cromatografiche che permettessero il legame e la successiva eluizione della proteina enzimatica di interesse con tamponi di forza ionica e pH tali da impedire l'inattivazione dell'enzima.

Inizialmente sono stati preparati 4,5 ml di estratto grezzo, risospendendo il pellet cellulare proveniente da 100 ml di coltura in un opportuno tampone di lisi. La sonicazione ha permesso la rottura delle cellule e la successiva centrifugazione ha separato la frazione solubile (estratto grezzo) dai detriti cellulari. Sull'estratto grezzo è stata determinata la concentrazione proteica con il metodo Bradford. Questa è risultata pari a 12,4 mg/ml. Sullo stesso estratto è stata calcolata l'attività enzimatica mediante il saggio spettrofotometrico, che è risultata essere pari a 2 mUnità/ml. Per mUnità si intende la quantità di enzima che catalizza la produzione di 1 mole di NMN al minuto, a 37°C.

L'estratto grezzo è stato caricato sulla resina Ni-NTA per essere purificato mediante cromatografia di affinità in un unico step. L'eluizione della proteina è stata ottenuta con un gradiente discontinuo d'imidazolo (tabella I, figure 7 e 8).

L'eluato è stato raccolto in frazioni, che sono state saggiate per verificare la presenza dell'attività enzimatica. Le frazioni attive sono state riunite in un unico pool sul quale è stata determinata anche la concentrazione proteica. Il pool così ottenuto ha mostrato una concentrazione proteica di 0,09 mg/ml e un'attività enzimatica pari a 2,9 mUnità/ml.

Il pool proteico è stato infine desalificato mediante cromatografia ad esclusione molecolare e anche su questo è stata misurata la concentrazione proteica, che è di 0,04 mg/ml e l'attività enzimatica pari a 2,6 mUnità/ml. La proteina di interesse è stata purificata 400 volte, con un recupero del 100% (Tabella II).

Step	Volume (ml)	Conc. proteica (mg/ml)	Proteine totali (mg)	Attività (mU/ml)	mU totali	Attività specifica (mU/mg)	Indice di purificazione ⁽¹⁾	Recupero (%) ⁽²⁾
Estratto Grezzo	4,5	12,4	55,8	2,0	9,0	0,16	-	
Ni-NTA	2,5	0,09	0,22	2,9	7,25	32,9	205	80
PD-10	3,5	0,04	0,14	2,6	9,1	65	406	100

Tabella II: Tabella di purificazione dell'enzima NAMPT

(1) = Attività specifica/Attività specifica estratto grezzo

(2) = mU totali/mU totali estratto grezzo

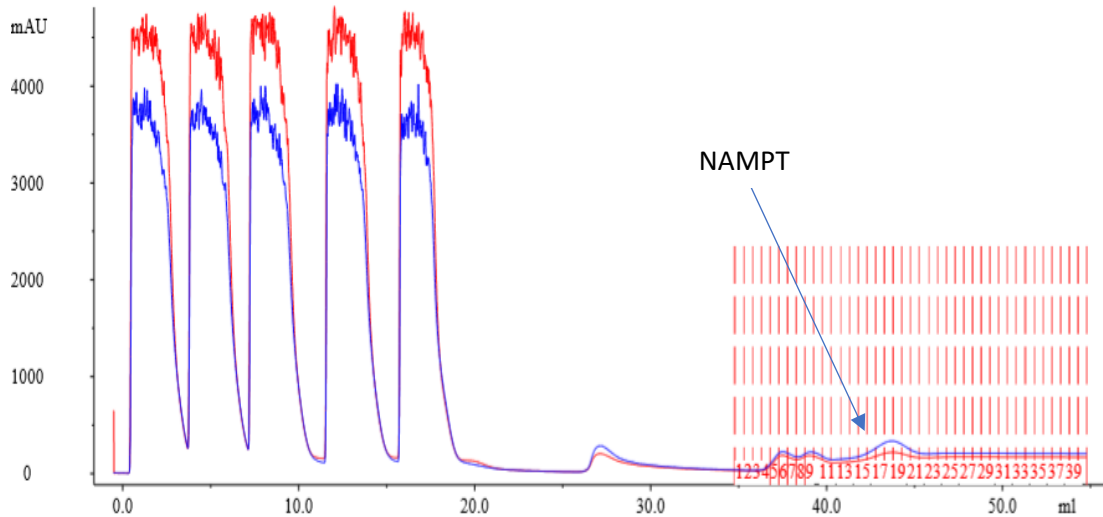


Figura 7 Profilo di eluzione della cromatografia su resina Ni-NTA

In blu è mostrata l'assorbanza a 280 nm e in rosso quella a 260 nm. Il picco dell'enzima di interesse è quello indicato con la freccia.

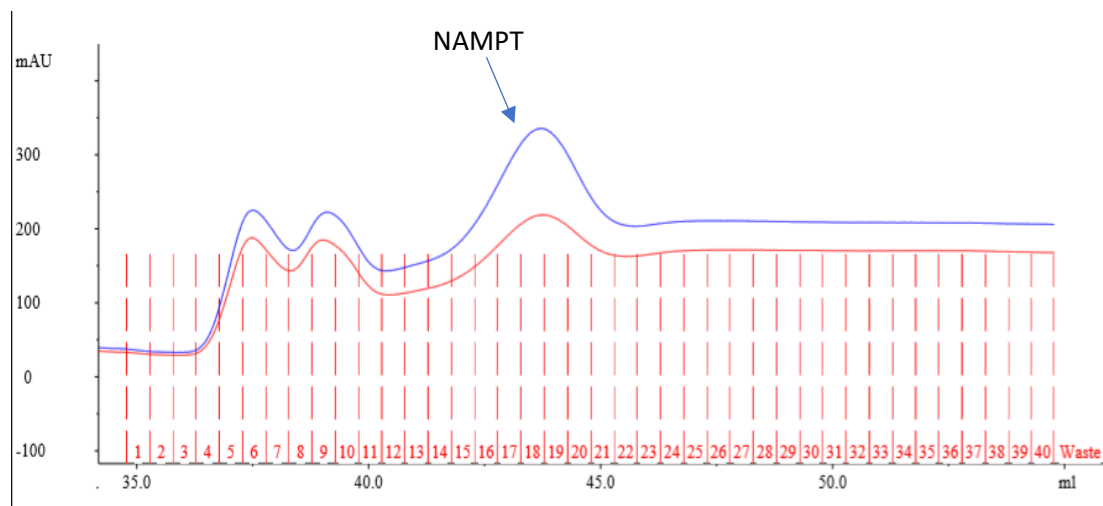


Figura 8 Ingrandimento del picco di interesse

La purificazione su resina Ni-NTA ha permesso di ottenere una preparazione omogenea della proteina, come mostrato in Figura 9. È stato possibile confermare il peso molecolare dell'enzima

NAMPT grazie al confronto con una miscela di standard di peso molecolare noto. La dimensione della banda corrispondente alla proteina d'interesse è di 55 kDa.

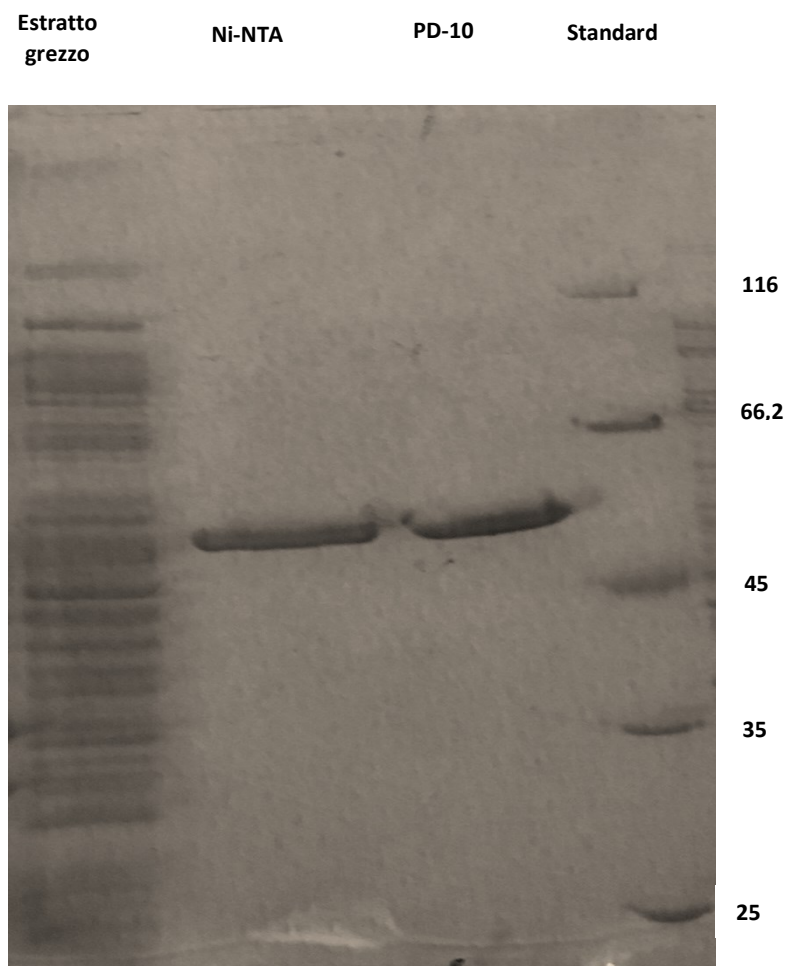


Figura 9 Elettroforesi dei singoli step di purificazione: estratto grezzo, Ni-NTA, PD-10

CONCLUSIONI

In questo progetto di tesi è stato messo a punto il processo di produzione, espressione e purificazione dell'enzima NAMPT, che è coinvolto nella trasformazione della vitamina B3 nella sua forma biologicamente attiva, il coenzima NAD.

L'importanza della produzione di proteine ricombinanti su larga scala è fondamentale nell'industria alimentare e non solo, coinvolgendo anche altri settori quali l'industria tessile e la produzione di biocarburanti.

Per quanto riguarda il settore alimentare la chimosina è stata il capostipite degli enzimi prodotti in forma ricombinante nel 1874, ed ha aperto la strada a molti altri enzimi come fitasi, lipasi, laccasi, fosfolipasi.

Nel caso dell'enzima oggetto di questo lavoro di tesi, come organismo ospite per l'espressione della proteina, è stato utilizzato il microrganismo *E.coli*.

E.coli è uno dei più usati per la produzione di enzimi ricombinanti su larga scala, in quanto, rispetto ad altri microrganismi mostra alcuni vantaggi, come la capacità di crescere rapidamente e raggiungere un'elevata densità nel terreno di coltura, e avere un genoma ben conosciuto. La produzione dell'enzima di interesse in questo ospite è stata di 0,14 mg a partire da 100 ml di coltura.

La purificazione dell'enzima mediante cromatografia di affinità ci ha permesso di ottenere un enzima cataliticamente attivo con un elevato grado di purezza (privo di contaminanti) utilizzando un unico step cromatografico. Il protocollo utilizzato è veloce e versatile, infatti può essere applicato anche per la produzione di altri enzimi ricombinanti.

BIBLIOGRAFIA

- Adrian, J., Frangne, R., Potus, J., 2009. Dizionario degli alimenti, scienza e tecnica. *Tecniche nuove*. pp. 1-577
- Araújo, R., Casal, M., Cavaco-Paulo, A., 2008. Application of enzymes for textile fibres processing. *Biocatalysis and Biotransformation*. 26(5). pp 332-349.
- Balestrieri, A., Giovane, A., 2009. Applicazioni tecnologiche e biotecnologiche nei processi industriali di trasformazione dei prodotti vegetali. *Natural 1*. pp. 53-71
- Bonekamp, F.J., Oosterom, J., 1994. On the safety of *Kluyveromyces lactis* - a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41 pp. 1-3.
- Bressanini D., 2018. Altri OGM che usiamo senza saperlo. *OGM TRA LEGGENDE E REALTÀ. Alla scoperta delle modifiche genetiche nel cibo che mangiamo*. Bologna: Zanichelli. Capitolo 4. pp. 87-98
- Brijwani, K., Rigdon, A., Vadlani, P. V., 2010. Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. *Enzyme Research*, pp. 1-10.
- Casado, V., Martin, D., Martin, C., Torres, C., Reglero, G., 2012. Phospholipases in food industry: a review. *Method in molecular biology*, vol. 861 Capitolo 29. pp. 495-521
- Colabone Celligoi, M. A. P., 2016. Lipase: Properties, Functions and Food Applications. *Microbial Enzyme Technology in Food Applications*, edizione: 1, capitolo: 12. A cura di: Ramesh, Cristina M. Rosell, pp. 216-242.

- Fernandes, P., 2018. Enzymatic processing in the food industry, Glucose oxidase. *Reference Module in food science*
- Greiner, R., Konietzny, U., 2006. Phytase for food application. *Food Technology Biotechnology* 44(2) pp. 125–140.
- Hasan, F., Shah, A. A., Javed, S., Hameed, A., 2010. Enzymes used in detergents: Lipases. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(31), pp. 4836-4844.
- Hii, S. L., Tan, J. S., Ling, T. C., Ariff, A. B., 2012. Pullulanase: Role in starch hydrolysis and potential industrial application, review article. *Enzyme Research Volume*, Hindawi Publishing Corporation. pp. 1-14.
- Mamo J., Assefa, F., 2018. The Role of Microbial Aspartic Protease Enzyme in Food and Beverage Industries, review Article. *Journal of Food Quality*. volume 2018, pp. 1-15.
- Mojsov, K., 2013. Use of enzymes in wine making: a review. *International Journal of Technology Marketing* 3(9). pp. 112-127
- Olempska-Bier, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M.D., Dinovi, M. J., 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms- a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 45, pp. 144-148.
- Pedersen, P. B., Broadmeadow, A., 2010. Toxicological studies on *Thermomyces lanuginosus* xylanase expressed by *Fusarium venenatum*, intended for use in food. *Food Additives & Contaminants*, Vol. 17. pp. 739-747.
- Sheldon, B. W., 2005. Techniques for reducing pathogens in eggs. *Food safety control in the Poultry Industry*, capitolo: 12. pp. 273-309.
- Singh, P., Kumar S., 2019. Microbial Enzyme in Food Biotechnology. *Enzymes in Food Biotechnology, Production, Applications, and Future Prospects* capitolo: 2. pp. 19-28

Sundarram, A., Pandurangappa, T., Murthy, K., 2014. α -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, vol. 2, no. 4. pp. 166-175

Zhu, Z., Lu, J. J., Liu, S., 2012. Protein Separation by Capillary Gel Electrophoresis: A Review. *Analytica chimica acta* vol. 709. pp: 21-31.

Zúñiga-Hansen, M.E., Pérez-Torres, E., Caballero-Valdés, E., Fernández-Parodi J., 2012. Effect of a commercial pectinmethylesterase on tomato paste consistency. *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 15, no. 3.

SITOGRAFIA

Ufficio federale della sicurezza alimentare e veterinaria (USAV), Confederazione svizzera, 2015.

Amilasi maltogenica aspetti inerenti alla sicurezza alimentare.

Disponibile da: <https://www.blv.admin.ch/blv/it/home.html>

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che hanno concorso in un modo o nell'altro al raggiungimento di questo traguardo.

Un grazie speciale va alla mia relatrice, la prof.ssa Nadia Raffaelli, per avermi dato l'opportunità di realizzare un avvincente progetto di tesi, tesi sperimentale che mi ha permesso di poter lavorare all'interno del laboratorio di biochimica dell'Università Politecnica delle Marche. Vorrei ringraziarla inoltre, per avermi dedicato parte del suo prezioso tempo, per i suggerimenti che mi ha dato durante il periodo di stesura della tesi, per l'aiuto, per la sua disponibilità nel chiarire qualsiasi dubbio mi si porgesse e per avermi permesso di portare a termine questo percorso di studi.

Grazie alla Dott.ssa Federica Zamporlini per il tempo concessomi, per l'aiuto datomi durante le ore trascorse in laboratorio, per la chiarezza nelle spiegazioni. Mi preme ringraziarla per la sua costante disponibilità e la sua estrema gentilezza.

Vorrei ringraziare inoltre la mia famiglia, che mi è sempre stata accanto e non mi ha mai fatto mancare il suo sostegno, aiutandomi e stimolandomi in questi anni di studio; è anche grazie al loro aiuto che ho potuto raggiungere questo traguardo, un traguardo che non rappresenta un punto di arrivo, ma piuttosto un primo passo per costruirmi un futuro.

Grazie a mio fratello che pur di condividere con me e la mia famiglia questa giornata così importante, prenderà un volo dal Belgio sacrificando gli impegni lavorativi, in modo da poter assistere alla discussione della mia tesi di laurea.

Grazie a Benedetta, anche lei studentessa di Scienze e Tecnologie Alimentari, conosciuta tra i banchi universitari, insieme abbiamo portato avanti questo percorso universitario, sopportandoci e supportandoci a vicenda, ed insieme siamo arrivate al traguardo, anche lei oggi è qui a coronare questo sogno.

Un ultimo ringraziamento a tutti gli amici che mi hanno aiutato in questo periodo e che oggi sono qui con me per festeggiare questo successo.