

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE DELLE PRODUZIONI
AGRO-ALIMENTARI
XIX CICLO

**Ricerca di ceppi microbici produttori
di fitasi e studio delle loro capacità
pronutrizionali**

Tutor

Prof.ssa Olimpia Pepe

Dottoranda

Dott.ssa Marilena Anastasio

Coordinatore

Prof. Salvatore Spagna Musso

INDICE

INTRODUZIONE

Acido fitico

- *Caratteristiche generali e strutturali*
- *Ruolo e funzione fisiologica*

Effetti antinutrizionali

Acido fitico e zinco

Acido fitico e ferro

Acido fitico e calcio

Acido fitico e magnesio

Acido fitico e manganese

Acido fitico e rame

Interazione tra minerali ed altri nutrienti

- *Vitamine*
- *Grassi*

Acido fitico e fibre

Acido fitico e proteine

Effetti dell'acido fitico sulle attività enzimatiche

Fitasi

- *Quando si parla di "fitasi ideale"?*
- *Cenni storici*

Caratteristiche generali

- *Specificità del substrato*
- *Temperatura e pH*
- *Termostabilità*
- *Resistenza alla proteolisi*
- *Punto isoelettrico*
- *Massa molecolare*

Distribuzione delle fitasi in natura

- *Microrganismi*
- *Piante*
- *Tessuti animali*

Sito attivo e meccanismo di reazione

Effettori dell'attività enzimatica

Sistema dell'espressione delle fitasi

Degradazione del fitato

Idrolisi del fitato nel tratto gastrointestinale

Defosforilazione enzimatica del fitato durante i processi alimentari per incrementare la biodisponibilità di minerali essenziali

Effetto dei vari processi sulle concentrazioni di mio-inositolo fosfato

- *Effetto del lavaggio*
- *Effetto dei trattamenti termici e della fermentazione*
- *Effetto della cottura*
- *Effetto della germinazione*

- *Aggiunta di fitasi durante i processi alimentari*

Applicazione delle fitasi

- *Applicazione biotecnologica delle fitasi nella nutrizione umana*
- *Applicazione biotecnologica delle fitasi nella nutrizione animale*

SCOPO DELLA RICERCA

MATERIALI E METODI

Screening dei ceppi per l'attività fitasica

- *Ceppi testati*
- *Condizioni di crescita*

Valutazione dell'attività fitasica

- *Screening dei ceppi produttori in substrato solido*
- *Valutazione dell'attività fitasica in substrato liquido*
- *Saggio di produzione delle fitasi*

Attività fitasica durante una lavorazione sperimentale di impasti ottenuti con farina raffinata ed integrale

- *Ceppi scelti come componenti degli starter*
- *Preparazione dell'inoculo*

Preparazione degli impasti

- *Determinazione del pH*
- *Determinazione dell'acidità titolabile totale*
- *Conteggi in piastra*

Determinazione dei sali minerali mediante assorbimento atomico

- *Estrazione dei minerali liberi*
- *Incenerimento degli impasti e delle farine dopo estrazione*
- *Lettura allo spettrofotometro per assorbimento atomico (AAS)*

RISULTATI E DISCUSSIONI

Attività fitasica in substrato solido

Attività fitasica in mezzo liquido

Valutazione preliminare di impasti inoculati con starter microbici e determinazione dei minerali liberi mediante spettrofotometro per assorbimento atomico (AAS)

- *Valutazione del pH ed acidità titolabile totale*
- *Valutazione dei minerali liberi letti all'AAS nei vari impasti*

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

BIBLIOGRAFIA

Tabelle e figure

INTRODUZIONE

Acido fitico

Caratteristiche generali e strutturali

L'acido fitico, mio-inositolo esafosfato, è il maggior componente degli alimenti di origine vegetale. Circa il 75% del fosforo totale nei cereali e legumi è presente sottoforma di fitato, sale dell'acido fitico, non prontamente disponibile da parte dei monogastrici (pollame, maiali e uomo) (Wodzinsky & Ullah, 1996). La restante parte di fosforo è rappresentata dai fosfati inorganici solubili e dal fosforo cellulare (fosforo legato agli acidi nucleici, proteine fosforilate, zuccheri e lipidi) (Lopez et al., 2002). Durante i processi di trasformazione e digestione degli alimenti, l'acido fitico può essere parzialmente defosforilato per produrre prodotti di degradazione, come penta, tetra e trifosfati, attraverso l'azione di fitasi endogene, che si ritrovano nella maggior parte dei semi delle piante superiori (Sandberg et al., 1987). L'acido fitico consta di uno zucchero (simile al glucosio) che è il mio-inositolo, a cui sono legati covalentemente i gruppi fosfato (PO_4). È presente come sale di cationi mono e bivalenti (potassio, calcio e magnesio), si accumula rapidamente negli strati aleuronici dei semi durante il periodo di maturazione ed è generalmente considerato come fonte primaria di inositolo e di riserva di fosforo nei semi di piante utilizzati nell'alimentazione animale (farina di semi, grani di cereali e legumi) (Maga, 1982). Nei tuberi il fosforo-fitato costituisce il 10-25 % del fosforo totale, mentre nella frutta e nella verdura la

percentuale è variamente distribuita. Nei semi dei legumi i fitati si distribuiscono uniformemente, mentre nella cariosside del grano si concentrano sia nello strato aleuronico che nel germe (Sirikka, 1997). Nell'endosperma del grano e nel chicco di riso i fitati sono presenti in percentuali molto basse.

Ferguson e Bollard (1976) ad esempio, hanno riscontrato che nei piselli secchi il 99% dei fitati si concentrano nei cotiledoni e l'1% nell'embrione. Tra i cereali la quantità più alta di fitati si trova nel mais (0.83-2.22 %) e nei fagioli "dolique" (5.92 - 9.15%) (Kerovuo, 2000). In tabella 1 è riportato il contenuto di fitato (g/100 g di peso secco) presente in diversi alimenti. In tabella 2 invece sono riportate alcune stime dell'assunzione del fitato nelle diete di varie nazioni. Per compiere questi studi in modo accurato e valido è necessario compilare tabelle in cui sono indicati i cibi assunti attraverso metodi concordati e le stime della variabilità di composizione delle derrate alimentari. Come mostrato in tabella 2, i cereali sono la principale fonte di fitato nei paesi Occidentali, mentre nei paesi in via di sviluppo predominano i legumi. Negli Stati Uniti l'assunzione giornaliera di fitato è di 750 mg, con i cereali come maggiore fonte. In Italia si ha un'assunzione più bassa a causa del consumo di cereali raffinati e di altri prodotti come la pasta. Nei paesi dove il consumo di carne è più basso, l'assunzione del fitato è più alta (2100 mg) (Sirikka, 1997).

Il fosforo organico di solito contribuisce anche a più o meno il 50% del fosforo totale presente nel suolo. La rizosfera è caratterizzata da un'elevata densità microbica; le sostanze organiche (zuccheri, acidi organici, polisaccaridi) sono essudate dalle piante al suolo, dove vengono utilizzate dai microrganismi come

fonti prontamente disponibili di carbonio ed energia per la crescita e riproduzione (Whipps, 1990). I maggiori componenti del fosforo organico nel suolo sono i fitati, che consistono principalmente di esa e penta fosfati (Dalal, 1977). Per diventare però disponibile per le piante, il fosforo organico deve essere defosforilato (Richardson, 2001). Tale defosforilazione avviene ad opera delle fitasi, fosfatasi responsabili della degradazione del fitato, che gioca un ruolo importante nella nutrizione della pianta (Tarafdar & Claassen, 1988; Findenegg & Nelemans, 1993). Inoltre si è visto che l'attività fitasica derivante dai microrganismi del suolo come *Pseudomonas* sp. (Richardson et al., 2000; 2001 b) e *Bacillus amyloliquefaciens* (Idriss et al., 2002) può contribuire alla nutrizione della pianta. I rizobatteri, ad esempio, che promuovono la crescita della pianta (PGPR), sono una classe di batteri che vivono liberi nella rizosfera ed hanno effetti benefici sulle piante (Kloepper et al., 1980; Bloemberg & Lugtenberg, 2001).

La struttura conformazionale dell'acido fitico è stata oggetto di studio da parte di diversi ricercatori. Johnson e Tate (1969) hanno suggerito una distribuzione assiale del fosfato in posizione 2 ed equatoriale degli altri gruppi fosfato. Diversamente Blank et al. (1971) hanno concluso che i gruppi fosfato in posizione assiale sono l'1, 3, 4, 5 e 6, mentre il 2 è in posizione equatoriale. Costello et al. (1976) hanno supportato l'idea di Johnson e Tate, affermando che la struttura individuata da loro era energeticamente più favorevole rispetto a quella individuata da Blank et al. (1971) (Kerovuo, 2000). Costello et al. (1976), oltre ad individuare la struttura conformazionale dell'acido fitico, hanno studiato anche il pK_a dei 12 siti di dissociazione presenti sulla molecola dell'acido fitico. La conclusione è stata che

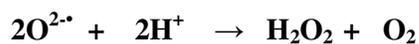
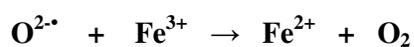
sei gruppi ricadevano in un forte intervallo acido (1.1-2.1); uno in un debole intervallo acido (5.70); due avevano un pK_a compreso tra 6.80 e 7.60 e tre ricadevano in un intervallo acido molto debole (pK_a 10.0-12.0) (Maenz, 2001). Questo suggerì la forte azione complessante dell'acido fitico verso cationi multivalenti e proteine cariche positivamente (Kerovuo, 2000). Le proprietà antinutrizionali del fitato e il suo valore come possibile fonte di fosforo ha indotto, quindi, i ricercatori a sviluppare una tecnica che potesse rimuoverlo in modo da ottenere enormi vantaggi sia da un punto di vista salutistico che economico (Wodzinsky & Ullah, 1996).

Ruolo e funzione fisiologica

I ruoli che svolge l'acido fitico sono molteplici, tra cui riserva di fosforo e di energia nelle piante, competitore per l'ATP, regolatore del livello di fosfato inorganico, fonte di cationi e di mio-inositolo (precursore della parete cellulare) (Kerovuo, 2000). Probabilmente buona parte del fosforo nelle piante è immagazzinato nei semi e viene liberato durante la germinazione per poi essere incorporato nell'ATP (Wodzinsky & Ullah, 1996). Graf (1986) elencò 59 diverse applicazioni dell'acido fitico tra cui quella di solvente per la ruggine, prevenzione della carie dentale, agente anticolesterolemico, etc... Tutte queste applicazioni sono legate alla proprietà dell'acido fitico di chelare metalli, interagire elettrostaticamente con proteine, avere un'alta affinità con l'idrossiepatite (Graf, 1986). Recenti studi si sono focalizzati sul ruolo degli intermedi dell'inositolo-fosfato nel trasportare sostanze nutritive (sali minerali, proteine, etc.) all'interno

della cellula. In particolare l'inositolo trifosfato è attivo nel trasporto come messaggero secondario e nella trasduzione del segnale nelle piante e cellule animali (Wodzinsky & Ullah, 1996), mentre altri intermedi dell'acido fitico sembrano essere coinvolti nella digeribilità dell'amido (Thompson, 1986). Yoon et al. (1983) osservarono una correlazione negativa tra l'assunzione di fitato e l'indice glicemico quando persone sane consumavano legumi e cereali. Inoltre si è visto che l'acido fitico è efficace nella chemioprevenzione e terapia del cancro e nella chemioterapia della carcinogenesi del colon, soprattutto in studi effettuati su topi e ratti (Sirikka, 1997). Hirose et al. (1991) scoprirono che l'acido fitico inibiva anche lo sviluppo della carcinogenesi del fegato (Sirikka, 1997). Shamsuddin (1995) concluse che la sottile discrepanza tra i vari studi sull'efficacia dell'acido fitico nella prevenzione e terapia dei tumori potrebbe essere una conseguenza del grado di disponibilità di questo composto nella dieta. Vari meccanismi sono stati messi a punto per valutare in che modo l'acido fitico possa prevenire fenomeni di carcinogenesi. Una possibile via è il suo coinvolgimento con gli intermedi inositolo-fosfati all'interno della cellula (Sirikka, 1997). Questi ultimi sono capaci di potenziare l'effetto di antiproliferazione e antineoplastico in vivo, mentre il mio-inositolo, ad esempio, può bloccare il carcinogeno che determina la formazione dell'adenoma polmonare. L'altra modalità con cui l'acido fitico può agire in modo benefico nei fenomeni di carcinogenesi è attraverso l'azione chelante sul Fe^{3+} e la soppressione nella formazione del radicale $\bullet OH$. Diversi studi indicano che animali e uomini che assumono molto Fe sono soggetti ad un rischio elevato di neoplasia a vari siti, compreso il cancro del colon-retto e carcinogenesi mammaria (Sirikka,

1997). Questo potrebbe essere ricondotto alla riduzione del Fe^{3+} al Fe^{2+} . Il ferro è un efficace catalizzatore di diverse funzioni biologiche in cui è ridotto a Fe^{2+} . L'ossidazione di Fe^{2+} a Fe^{3+} porta alla formazione di $\text{O}^{2\cdot}$, che spontaneamente si divide in O_2 e H_2O_2 e porta ad una serie di reazioni a catena (tra cui la reazione di Fenton). Il reagente di Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) rapidamente genera $\bullet\text{OH}$, un alto reattivo ossiradicalico che, indiscriminatamente attacca molte biomolecole. Le reazioni coinvolte sono le seguenti:



I radicali intermedi delle reazioni ossidative sembrano essere causa di cancro al colon ed altri carcinomi (Sirkka,1997). I gruppi fosfato 1, 2 e 3 nell'IP₆ (mio-inositolo esafosfato) hanno una conformazione che determina un'interazione specifica con il Fe^{3+} e che inibisce completamente la sua capacità di catalizzare la formazione di radicali idrossilici mentre, allo stesso tempo, non modificano di molto le altre sue proprietà redox. Portando il ferro allo stadio Fe^{3+} , l'acido fitico blocca il ciclo di ossido-riduzione del ferro in molte reazioni ossidative ed anche perossidazioni lipidiche, prevenendo quindi danni al DNA. In questo modo l'IP₆ può ridurre, grazie alla sua funzione antiossidante, l'ossigeno attivo, specie intermedia per lo sviluppo di carcinogenesi e lesioni cellulari (Sirkka, 1997). Non è chiaro fino a che punto i meccanismi proposti siano responsabili degli effetti benefici dell'acido fitico nella carcinogenesi, ma è possibile che scaturiscano da un'interazione tra acido fitico e fibre assunte con la dieta (Sirkka, 1997). Sharma

(1986) concluse che l'effetto sinergico fitati-fibre potrebbe controllare l'ipercolesterolemia ed arteriosclerosi con la formazione di complessi calcio-fitato-pectine. Klevay (1973) scoprì che l'acido fitico poteva influenzare i livelli di colesterolo nel sangue grazie ai diversi effetti sull'assorbimento dello zinco e del rame. Infine, si è visto che diminuendo l'assunzione di fitato nella dieta c'è un aumento dell'incidenza dei calcoli renali soprattutto in paesi industrializzati (Sharma, 1986).

Effetti antinutrizionali

L'acido fitico sembra avere un forte effetto antinutrizionale dovuto alla sua inusuale struttura molecolare in cui, in completa dissociazione, i sei gruppi fosfato portano ad un totale di dodici cariche negative. Biochimicamente l'acido fitico è molto carico, con 6 gruppi fosfato che si estendono dal centro della molecola di mio-inositolo (figura 1). L'acido fitico quindi effettivamente lega vari cationi mono, di e trivalenti formando complessi insolubili contenenti soprattutto potassio e magnesio; in piccole quantità calcio, zinco, ferro o rame. La solubilità e la stabilità di tali complessi diminuisce quando diminuisce il numero dei residui di fosfato sull'anello del mio-inositolo. Quindi, la rimozione di tali residui comporta una maggiore disponibilità dei minerali essenziali (Sandberg et al., 1999; Han et al., 1994). Nella formazione di complessi insolubili si ha spesso l'interazione tra un solo minerale ed un ligando precipitante (Lopez et al., 2002). Il ligando si presenta di natura inorganica come i fosfati o organica come il fitato. La complessazione con il ligando precipitante può avvenire nei tessuti in cui un

minerale può sostituire un altro minerale nella sua posizione che, diventato libero, reagisce con il ligando precipitante. C'è comunque competizione tra i minerali per il ligando e ciò dipende dalla concentrazione dei minerali coinvolti, dalla forza della loro costante di associazione e dalla solubilità dei prodotti formati. Le sostanze precipitanti che provengono dalla dieta sono quelle che maggiormente influenzano l'assorbimento intestinale dei metalli (Lopez et al., 2002). La riduzione dell'assorbimento dei minerali legati all'acido fitico potrebbe essere causata dalla mancanza di ionizzazione dei minerali complessati che sono in una forma stabile con il fitato. Se la precipitazione avviene, le proteine trasportatrici poste sulle membrane delle cellule intestinali non sono stimolate a legarsi agli ioni metallici vicino alla membrana trasportatrice, poiché i metalli stessi non sono in forma ionica. La maggior parte dei fosfati è debolmente solubile in acqua ed in soluzioni acide, ma l'intestino comunque tende a diventare alcalino, riducendone la solubilità. Quando un minerale è intrappolato all'interno di un composto insolubile, c'è una bassa probabilità di assorbimento intestinale come ad esempio un sale precipitato che essendo generalmente stabile, non crea un'attrazione tale da indurre le proteine trasportatrici, presenti in forma lipidica, a legare ioni e muoversi attraverso le membrane (Lopez et al., 2002). In generale componenti che possono avere un effetto positivo sulla biodisponibilità dei minerali presenti sono l'acido citrico, acido ascorbico, lattosio ed alcuni aminoacidi, mentre l'acido fitico e i composti polifenolici hanno un effetto negativo (Sirikka, 1997).

Il fitato può anche complessare proteine ed aminoacidi. Il gruppo amminico sul lato della catena aminoacidica è coinvolto nell'interazione proteina-fitato, diminuendo

così la digeribilità proteica. L'acido fitico interagisce con le proteine in un intervallo di pH ampio; a pH acidi bassi, l'acido fitico ha una forte carica negativa dovuta alla totale dissociazione dei gruppi fosfato. In queste condizioni ci si può aspettare un'influenza negativa dell'acido fitico sulla solubilità delle proteine per il legame tra i gruppi fosfato basici dell'acido fitico ed i residui protonici degli amminoacidi (lisina, istidina, arginina). In condizioni acide l'acido fitico è capace di legarsi saldamente alle proteine vegetali fino a quando il loro punto isoelettrico è generalmente intorno a pH 4.0–5.0. Negli intervalli intermedi di pH (da 6.0 a 8.0), sia l'acido fitico che le proteine vegetali hanno una netta carica negativa. Possibili meccanismi includono direttamente il legame dell'acido fitico ai gruppi terminali protonati α -NH₂ e ϵ -NH₂ dei residui della lisina ed un'interazione multivalente mediante cationi. Legandosi alle proteine vegetali, l'acido fitico fa diminuire la loro solubilità, digeribilità e valore nutritivo. Oltre a complessarsi con minerali e proteine l'acido fitico interagisce con enzimi come la tripsina, pepsina, α -amilasi e β -galattosidasi, determinando una diminuzione dell'attività di questi importanti enzimi digestivi (Kerovuo, 2000).

Acido fitico e zinco

Lo zinco è un componente essenziale di numerosi enzimi, in cui svolge un ruolo strutturale, di regolazione e catalitico (O' Dell, 1992). Molti enzimi coinvolti nel metabolismo delle proteine e degli acidi nucleici sono zinco-proteine, come l'aminoacil-RNA-sintetasi, DNA ed RNA polimerasi. Lo zinco svolge un ruolo importante, insieme con il selenio e lo iodio, nel metabolismo degli ormoni

tiroidei. Inoltre mantiene la configurazione di alcune proteine non enzimatiche, quali i fattori di trascrizione del DNA, l'insulina e la timulina, e quindi è importante per la maturazione delle cellule del sistema immunitario che derivano dal timo (Beisel, 1982). Svolge anche un'attività antiossidante, prevenendo la perossidazione lipidica e riducendo la formazione di radicali liberi (Bray & Bettiger, 1990). Lo zinco è necessario per la formazione di ossa e muscoli e può, in caso di carenza, diventare un nutriente limitante per tale sintesi.

Dello zinco introdotto con gli alimenti, circa il 10-40% viene assorbito a livello dell'intestino prossimale. La quota assorbita varia a seconda della sua forma chimica, della sua concentrazione ematica, della contemporanea presenza nel lume intestinale di microelementi in competizione per il trasporto, di agenti chelanti e della concentrazione di metallotioneina sintetizzata dalla cellula mucosale. Questa proteina, la cui sintesi è stimolata dalle elevate concentrazioni dell'oligoelemento, lega lo zinco con elevata affinità. Due terzi dello zinco così assorbito vengono legati all'albumina mentre l'altro terzo per essere trasportato si lega ad una macroglobulina.

Lo zinco viene eliminato principalmente con le feci ma anche con le urine (il 2-8% dello zinco in circolo è ultrafiltrabile). Sostanziali quantità di zinco passano attraverso il circolo entero-epatico e sono riassorbite a livello dell'intestino tenue (Jackson, 1989). La quantità di zinco eliminata mediante desquamazione e con i capelli varia a secondo degli apporti precedenti. L'omeostasi dello zinco viene mantenuta principalmente attraverso regolazione dell'assorbimento e, in minor misura, attraverso la regolazione dell'escrezione renale. Sono stati documentati

nell'uomo casi di carenza acuta di zinco. Nelle zone rurali dell'Iran e dell'Egitto, dove la dieta è praticamente priva di proteine animali e dove è frequente una sindrome da malassorbimento, la carenza di zinco si manifesta con ritardi della crescita, fino a casi di nanismo ipogonadico, epatomegalia ed anemia (Prasad, 1963; Aggett, 1989a). Una carenza di zinco con sintomi meno caratteristici è riscontrabile anche nelle infezioni ricorrenti, nella malattia celiaca, nel morbo di Crohn, nel trattamento cronico con diuretici, con D-penicillamina (morbo di Wilson) e nell'anemia falciforme (Vallee, 1993).

Uno stato di modesta ipozinchemia viene rilevata, con una certa frequenza, nelle popolazioni vegetariane, per la presenza di fitati, ossalati, acido ascorbico e fosforo in grande quantità nella loro dieta (Agte et al., 1994). Altri gruppi a rischio di carenza di zinco sono i neonati prematuri, i bambini in crescita, le donne in gravidanza e durante l'allattamento, gli anziani, ed i pazienti con AIDS (Comi, 1991). Alcuni ritardi di crescita osservati in popolazioni occidentali e del Medio Oriente potrebbero dipendere da deficienze lievi ma croniche di zinco (Anonimo, 1989; Gibson et al., 1989).

I vari studi effettuati sulla popolazione anziana circa gli effetti benefici di un'aggiunta di zinco arrivano a conclusioni molto contrastanti: probabilmente un aumento dell'apporto di zinco rispetto alle raccomandazioni è necessario solo quando nell'anziano si riscontra un alterato metabolismo associato ad una riduzione della risposta immunitaria, con un aumento della suscettibilità alle infezioni ed un ritardo nella guarigione delle ferite (Turnland et al., 1986; Cousin, 1989; Prasad, 1989; Mc Clain & Stuart, 1990; Bales et al., 1994, Sturnliolo et al., 1994).

Non è comunque semplice definire una carenza marginale di zinco, perchè troppi fattori, anche non nutrizionali, influenzano la concentrazione di questo elemento o della fosfatasi alcalina nei tessuti normalmente utilizzati per la loro determinazione (siero, sangue, capelli, leucociti). Le maggiori fonti alimentari di zinco sono rappresentate da carni, uova, pesce, latte e derivati, cereali. L'assorbimento medio dello zinco alimentare è stimato tra il 10 ed il 40%. Studi condotti *in vivo* sull'uomo indicano una maggiore biodisponibilità dello zinco da alimenti di origine animale rispetto a quelli di origine vegetale (Shah e Belouje, 1981; Solomons, 1982). Molte osservazioni suggeriscono che sia il contenuto di proteine che la loro qualità (animale o vegetale) influenzino largamente l'assorbimento dello zinco (Sandstrom & Cederblad, 1980; Sandstrom et al., 1989). Diversi costituenti dei prodotti di origine vegetale hanno invece un impatto negativo sulla disponibilità di zinco, in particolare le elevate concentrazioni di acido fitico o di fibra alimentare (Navert et al., 1985). L'effetto inibitorio esercitato dal fitato è più pronunciato ad alti livelli di calcio (Ellis et al., 1987). Anche i fosfati ed i prodotti della reazione di Maillard interferiscono negativamente con l'assorbimento.

Gli effetti inibitori dell'acido fitico sullo zinco potrebbero essere legati al rapporto molare acido fitico/zinco nella dieta, quando l'assunzione di zinco raggiunge il livello di fabbisogno giornaliero. Rapporti molari superiori a 15:1 progressivamente inibiscono l'assorbimento di zinco e sono stati associati ad un sottottimale stato di apporto di zinco nell'uomo (Lopez et al., 2002). Per aumentare la biodisponibilità dello zinco negli alimenti si potrebbe: aumentare l'ammontare totale di zinco nella dieta ed accrescere la biodisponibilità dello zinco consumato,

promuovendo l'assunzione degli accrescitori e riducendo l'impatto dell'acido fitico sull'assorbimento intestinale di zinco.

Acido fitico e ferro

Il contenuto di ferro nell'organismo è di circa 3-4 g. Circa il 65% del ferro totale dell'organismo è presente nella molecola dell'emoglobina, mentre il 10% è contenuto nella mioglobina. La quota rimanente è rappresentata principalmente dal ferro di deposito (ferritina ed emosiderina), mentre minime quantità sono contenute negli enzimi e nei citocromi o sono associate alla transferrina (proteina di trasporto). L'organismo mantiene l'equilibrio del ferro attraverso la costituzione di un pool di riserva, la modulazione dell'assorbimento in funzione dei bisogni, e il recupero dal catabolismo degli eritrociti (Finch & Cook, 1984).

Nel calcolare l'assunzione di ferro con la dieta è molto importante distinguere le due forme di ferro, eme e non-eme, in quanto la loro biodisponibilità è molto diversa ed incide notevolmente sulla valutazione del potenziale assorbimento del ferro dalla dieta (Bjorn-Rasmussen et al., 1974; Cook & Monsen, 1976; Hallberg et al., 1992). Il ferro eme è presente nelle emoproteine del pesce e della carne; il suo assorbimento (circa il 25%) è indipendente dalla composizione della dieta, poichè viene assorbito intatto come complesso porfirinico senza interazioni degli altri costituenti della dieta. L'assorbimento del ferro non-eme, al contrario, è strettamente dipendente sia dalla composizione della dieta sia dallo stato di nutrizione individuale (Gillooly et al., 1983; Hallberg et al., 1987). Alcuni costituenti della dieta, quali fitati e polifenoli, hanno la capacità di inibire

l'assorbimento del ferro non-eme, altri invece possono potenziarlo (acido ascorbico, presenza di carne o pesce). La percentuale di ferro non-eme assorbita varia dal 2 al 13%. Negli alimenti di origine animale il ferro eme costituisce circa il 40-50% del totale, mentre nei vegetali è presente totalmente come ferro non-eme.

La biodisponibilità rappresenta quindi un bilancio tra tutti i fattori presenti contemporaneamente, e di conseguenza è strettamente dipendente dalla composizione dei singoli pasti. L'organismo ha la capacità, entro certi limiti, di incrementare l'assorbimento del ferro quando le riserve di ferro sono basse. La regolazione dell'assorbimento ha comunque un limite quando le perdite di ferro non possono più essere bilanciate da un adeguato assorbimento del ferro dalla dieta.

Molto spesso però l'assunzione del ferro con la dieta può essere inadeguata, come ad esempio nel caso di:

- a) neonati e bimbi da 6 mesi a quattro anni a causa del basso contenuto di ferro nel latte materno ed a causa del rapido sviluppo del corpo;
- b) adolescenti a causa del rapido sviluppo del corpo e dell'espansione dei globuli rossi e quindi dell'emoglobina;
- c) donne in età fertile;
- d) donne in gravidanza a causa dell'aumentato volume di sangue necessario per il feto e la placenta.

In questi casi, supplementi di ferro devono essere assunti sotto forma di solfato, succinato, citrato, lattato, fumarato e gluconato. Questi supplementi forniscono ferro non emnico la cui assunzione è aumentata dalla vit C.

Caratteristica della dieta italiana rispetto a quella di altri paesi europei, è che la maggior parte del ferro assunto deriva da fonti di origine vegetale. Verdure e ortaggi forniscono più di un terzo dell'assunzione totale del ferro (5 mg/die), mentre i cereali e derivati da una parte e la carne dall'altra forniscono ciascuno circa 4 mg/die. Questo significa che dei circa 14 mg/die di ferro assunti giornalmente la maggior parte è in forma non-eme (85% del totale). Questa percentuale tende ad aumentare nel sud del paese rispetto alle regioni del nord. Per quel che riguarda la presenza nella dieta italiana di quei fattori maggiormente coinvolti nel determinare la biodisponibilità del ferro non-eme, il contenuto di acido ascorbico è relativamente elevato, variando da 75 a 110 mg/100 g, il che assicura una biodisponibilità relativamente elevata del ferro non-eme. Tra i composti ad azione inibente, nella dieta sono presenti livelli piuttosto bassi di fitato (300 mg/die) e di tannini (presenti solo in tracce). Questi dati fanno dunque prevedere un livello soddisfacente di biodisponibilità del ferro non-eme nella dieta media italiana (Monsen et al., 1978).

E' stato visto che l'acido fitico ha un effetto inibitorio molto marcato nell'uomo sull'assorbimento del ferro non eme. Tale effetto inibitorio può essere contrastato da agenti che aumentano l'assorbimento del ferro come proteine o acidi organici (Lopez et al., 2002). L'acido ascorbico è tra gli acidi più efficaci; promuove l'assorbimento del ferro non eme, riducendolo dallo stato ferrico a ferroso, in cui è

più solubile al pH del duodeno e del piccolo intestino. Questo effetto dell'acido ascorbico dipende fortemente dalla dose e varia anche in base al contenuto di acido fitico nei cibi. Come per l'acido ascorbico, i precursori della vitamina A nel grano inibiscono parzialmente l'effetto dei fitati sull'assorbimento di ferro nell'uomo. La vitamina A o beta-carotene forma un complesso con il ferro rendendolo solubile nel lume intestinale e prevenendo l'effetto deleterio dell'acido fitico sull'assimilazione del ferro stesso. Tuttavia, un'alta assunzione di ferro può essere connessa ad un crescente rischio di cancro al colon. Il ferro proveniente dalla dieta rimane largamente non assorbito nell'intestino e si pensa possa partecipare alla generazione di radicali idrossilici con una reazione tipo Fenton insieme alla microflora del colon. In questo modo, l'inibizione dello ione ferrico, mediata dalla perossidazione lipidica sembrerebbe portare ad una maggiore prevenzione delle malattie gastrointestinali. L'acido fitico ed i prodotti di idrolisi possono dunque prevenire la perossidazione lipidica, riducendo e stabilizzando il ferro che determina l'accrescimento di cellule tumorali al colon-retto (Lopez et al., 2002).

Acido fitico e calcio

Il calcio è il più abbondante catione bivalente presente nel corpo umano; in media rappresenta 1000-1200 grammi di un essere umano di 60-70 kg (cioè circa l'1,5%). Il 99% circa del calcio del corpo umano si trova nello scheletro e nei denti; il rimanente 1% è distribuito nei fluidi extra ed intra cellulari. Poiché il calcio è assorbito solo nella sua forma ionizzata, deve essere prima rilasciato in forma solubile. I sali di calcio, infatti, nello stomaco in ambiente acido sono solubilizzati

permettendone l'assorbimento; però nell'intestino in condizioni basiche possono precipitare in forma insolubile, e ciò ne riduce la biodisponibilità. L'assunzione inadeguata, il basso assorbimento e l'eccessiva perdita di calcio con la sudorazione, l'urina e le feci possono portare ad una inadeguata mineralizzazione delle ossa. Bassi livelli di ioni calcio nel sangue (ipocalcemia) possono portare a tetania, cioè ad intermittente contrazione e spasmi dei muscoli delle mani e dei piedi, sebbene possano anche essere interessati il viso e la laringe (sede delle corde vocali).

Negli adulti la deficienza di calcio può portare a osteoporosi (perdita della matrice tissutale proteica e dei minerali delle ossa; condizione questa che rende l'osso fragile e predisposto alle fratture). L'assunzione inadeguata di calcio per lungo tempo è associata allo sviluppo di ipertensione e di cancro al colon. Si pensa alla capacità del calcio di legare la bile e gli acidi grassi liberi, che agiscono come promotori del cancro inducendo iperproliferazione delle cellule del colon.

I fattori che controllano la biodisponibilità del calcio si possono dividere in intrinseci ed estrinseci. Quelli intrinseci sono l'età, il sesso, la gravidanza e la lattazione. Quelli estrinseci includono un numero alto di variabili legate alla dieta che potrebbero influenzarne l'assorbimento tra cui vitamina D, ossalati, fosfopeptidi, grassi, lattosio, acido fitico ed un numero di variabili della dieta che potrebbero influenzarne l'escrezione per via urinaria come sali, fosforo, proteine, alcool e caffeina (Lopez et al., 2002). Negli uomini, l'acido fitico diminuisce l'assorbimento del calcio e migliora la disgregazione del calcio disponibile. Se l'assimilazione del calcio può essere ridotta dall'acido fitico, un alto rapporto

molare calcio/acido fitico negli alimenti porta all'assenza dei prodotti di idrolisi nell'intestino. Il motivo per cui si ha una ridotta degradazione dell'acido fitico potrebbe essere la formazione di complessi di fitato di calcio insolubili, substrati non ottimali per l'enzima fitasi. Inoltre, il consumo di diete povere in prodotti integrali e ricche in calcio hanno una propensione nel causare calcificazione al rene. L'ingestione di alimenti ricchi in acido fitico (crusca, prodotti integrali, etc.) mantiene livelli adeguati di calcio nelle urine tali da permettere un'effettiva inibizione della cristallizzazione dei sali di calcio e di conseguenza prevenire lo sviluppo di calcoli renali (Lopez et al., 2002).

Acido fitico e magnesio

Il corpo umano è costituito da circa 25-30 g di magnesio. All'incirca il 55-60% è localizzato nelle ossa, il 20-25% nei muscoli e il rimanente nei tessuti molli e nei fluidi extracellulari. Nel plasma, il 55% del magnesio è libero; il 30% è legato alle proteine e il rimanente 15% è soprattutto sotto forma di citrato e di fosfato. Il magnesio è presente in una grande varietà di alimenti e di bevande. Particolarmente ricchi in magnesio sono i legumi, le noccioline, il grano integrale, le spezie e i frutti di mare. Anche la frutta e le verdure sono ricche in magnesio. Inoltre cioccolato, mais, carote, pesche, riso bruno e prezzemolo ne contengono buone quantità. Il caffè e il thè sono fra le bevande più ricche in magnesio. Molto spesso la preparazione dei cibi può ridurre il contenuto di magnesio; per esempio, la raffinazione del grano con rimozione del germe e degli strati più esterni può ridurre il contenuto dell'80%.

Circa il 60% del magnesio del corpo umano è associato con le ossa insieme al calcio e al fosforo. Il magnesio non osseo è presente nei fluidi extracellulari, nei tessuti molli e nei muscoli. Nelle cellule il magnesio è legato ai fosfolipidi ed è anche associato con l'ATP, con gli acidi nucleici e con molte proteine (è nel sito attivo di molti enzimi come cofattore).

Una diminuzione di magnesio nel sangue include anche una diminuzione di potassio e di calcio, in dipendenza della diminuita secrezione dell'ormone parotideo. Inoltre, una bassa presenza di questo catione può portare a malattie cardiovascolari, infarto miocardio e ipertensione.

In Francia, lo studio SU-VI-MAX evidenziò che il 72% degli uomini e il 76% delle donne assumono magnesio in quantitativi inferiori alla razione raccomandata (Galan et al., 1997). Le cause maggiori di questo basso apporto di magnesio sono attribuibili ad un apporto totale energetico basso in quanto il magnesio è ingerito insieme a macronutrienti come carboidrati, ad una qualità nutrizionale dei prodotti non soddisfacente (elevato consumo di cibi calorici e poveri in micronutrienti come lo zucchero, bevande gassate, etc.) e ad un incremento di prodotti raffinati sul mercato (farina bianca, zucchero bianco, etc.). A differenza del ferro, il magnesio è governato da un forte meccanismo omeostatico a livello dei reni, quindi, un basso assorbimento è bilanciato da una limitata escrezione urinaria (Hurrell, 2003).

L'assorbimento del magnesio è influenzato principalmente dalla quantità totale di magnesio ingerito e dalla solubilità del magnesio stesso. È stato visto che una dieta ricca in calcio, marginalmente in magnesio e integrata con acido fitico

diminuisce la biodisponibilità del magnesio (Lopez et al., 2002). Nella nutrizione umana questa situazione non è comune; in generale, piante ricche in acido fitico (come prodotti cereali integrali, legumi o oli da semi) contengono una buona quantità di magnesio. In queste condizioni, i cibi non raffinati rimangono la maggiore fonte di magnesio; infatti la farina di grano integrale è ricca in acido fitico, ma contiene magnesio in un quantitativo cinque volte superiore rispetto a quello della farina bianca (Lopez et al., 2002).

Acido fitico e manganese

Il manganese si è rivelato elemento essenziale in ogni specie animale studiata. Il contenuto totale di manganese nell'organismo umano varia da 12 a 20 mg. E' noto come attivatore di numerosi enzimi in vitro, ed è costituente di alcuni metalloenzimi (arginasi, piruvato carbossilasi, glutamina sintetasi e superossido dismutasi mitocondriale) (Hurley & Keen, 1987; Keen, 1990). Si ritiene che venga assorbito solo il 5-10% del manganese proveniente dalla dieta, ma l'efficienza dell'assorbimento è probabilmente maggiore per apporti alimentari bassi. L'assorbimento avviene nell'intestino tenue; ferro e cobalto possono competere per l'assorbimento. Anche elevati livelli di calcio, fosforo e fitati compromettono l'assorbimento del manganese. Non sono stati accertati con sicurezza casi di carenza di manganese nell'uomo (Anonimo, 1988). Nell'animale, in seguito a carenza di manganese indotta sperimentalmente, si sono evidenziati diminuzione della capacità riproduttiva, ritardi della crescita, compromissione della formazione delle cartilagini e dell'osso, difetti nel metabolismo di carboidrati e lipidi, con una

ridotta tolleranza al glucosio e ridotta secrezione di insulina, ipercolesterolemia ed accumulo di lipidi nel fegato e nel rene (Hurley & Keen, 1987).

Tenuto conto della composizione media della dieta della popolazione italiana, e considerati i livelli di concentrazione del manganese negli alimenti riportati in letteratura (Guthrie, 1975), i maggiori contributi all'assunzione di questo metallo in Italia provengono dai cereali e derivati (specialmente integrali), dal vino e dal tè (Cappelloni et al., 1992).

Acido fitico e rame

Grazie ai suoi due stati ossidativi, il rame partecipa all'attività di metalloenzimi che trasferiscono elettroni (ossidasi): citocromo-ossidasi, tiolossidasi, DOPA ossidasi e superossido dismutasi (SOD). Il rame risulta di conseguenza un elemento essenziale per il metabolismo energetico a livello cellulare, per la produzione di tessuto connettivo e per la sintesi di peptidi neuroattivi (catecolamine e encefaline). Partecipa alla catena respiratoria, interviene nella sintesi dell'emoglobina (con il ferro) e nell'attività di cheratinizzazione e pigmentazione dei capelli e della cute. Ha, inoltre, influenza sulla funzionalità cardiaca. Il contenuto totale nell'organismo varia da 50 a 120 mg di cui 40% nei muscoli, 15% nel fegato, 10% nel cervello, 10% nel sangue e il restante nel cuore e nei reni.

L'assorbimento del rame introdotto con gli alimenti avviene a livello del tenue, tramite il legame con una metallotioneina; la quota assorbita viene stimata tra il 35 e il 70%. L'assorbimento viene favorito in condizioni di pH acido, ed è inibito dai

fitati, dal calcio, dall'acido ascorbico e da altri oligoelementi, in particolare dallo zinco, il cui metabolismo è strettamente legato a quello del rame.

Il rame viene trasportato in circolo per la maggior parte legato alla ceruloplasmina (90-95%): la concentrazione plasmatica normale è di circa 100 g/dl. La ceruloplasmina partecipa all'ossidazione di numerosi substrati tra cui l'adrenalina, la serotonina, l'ascorbato, il Fe^{2+} (ossidato in Fe^{3+}) e il Mn^{2+} (ossidato in Mn^{3+}). Inoltre, potrebbe agire come "scavenger" nei confronti dei radicali liberi del plasma.

L'escrezione del rame avviene attraverso le urine, il sudore e la bile. Il circolo entero-epatico e la modulazione dell'assorbimento intestinale concorrono nel mantenere l'omeostasi dell'oligoelemento (Cousins, 1985; Prohaska, 1988).

Stati di carenza in rame sono stati osservati nell'infanzia in neonati pretermine, in lattanti alimentati con latte vaccino non modificato, in bambini malnutriti (Cordano et al., 1964; Cordano, 1974). Nell'adulto, si rilevano casi di carenza in soggetti in nutrizione parenterale totale (Fujta et al., 1989), nella malnutrizione proteico-energetica (Danks, 1988), in soggetti con dieta ricca di zinco e povera di proteine e con dieta particolarmente ricca di fibre. Ipotesi sulle interazioni tra l'acido fitico e rame non sono ancora state ben definite. Per alcuni l'acido fitico non ha nessun effetto sull'assorbimento del rame, mentre per altri l'acido fitico ha effetti inibitori sull'assorbimento del rame negli animali o effetti positivi nei ratti (Lopez et al., 2002). Tuttavia si è visto che l'effetto dell'acido fitico sull'assorbimento del rame è legato a diversi fattori, specialmente considerando il livello di zinco assunto con la dieta. Infatti l'acido fitico può aumentarne

l'assorbimento grazie alla capacità di legare lo zinco, annullando la capacità di quest'ultimo nel competere con il rame per i siti di assorbimento intestinale (Lopez et al., 2002).

Secondo Klevay et al. (1984) un elevato rapporto zinco/rame derivante da apporti subottimali di rame potrebbe essere un fattore di rischio per l'aterosclerosi e dunque per le malattie cardiovascolari. Klevay ed altri autori hanno infatti osservato che livelli di assunzione di rame subottimali (0,7-1 mg/die) sono associati ad elevati tassi di colesterolo plasmatico, alterata tolleranza al glucosio e aritmie. Altri autori, invece, non hanno riscontrato queste alterazioni (Turlund et al., 1989).

La carenza di rame può essere rivelata da basse concentrazioni plasmatiche di rame e di ceruloplasmina; quest'ultima è però molto sensibile alle variazioni ormonali e di tipo infiammatorio. Ultimamente è stata proposta la misura dell'attività della superossidodismutasi quale parametro indiretto dello stato di nutrizione per il rame dell'organismo (Coudray et al., 1992; Uauy et al., 1993).

Interazione tra minerali ed altri nutrienti

Vitamine

Anche le vitamine possono avere effetti positivi e/o negativi sull'assorbimento dei minerali. È stato dimostrato, ad esempio, che la vitamina D ha un ruolo nella regolazione dell'assorbimento intestinale dello ione calcio. Una carenza di vitamina D nelle persone più anziane soprattutto, potrebbe interferire con l'assorbimento di calcio (Andon et al., 1993).

Grassi

L'assorbimento di calcio può ridursi in presenza di alti livelli di grasso. Il grado con cui i grassi interferiscono dipende dal tipo di grasso presente nella dieta.

Acido fitico e fibre

L'acido fitico negli alimenti è sempre assunto insieme a vari composti; nelle matrici vegetali ad esempio è ingerito con fibre, minerali, elementi presenti in tracce ed altri fitomicronutrienti. Le fibre e l'acido fitico vengono solitamente assunti insieme in una dieta a base di cereali, legumi, etc. ed è difficile separarne gli effetti per quanto concerne la complessazione di ioni metallici essenziali (Lopez et al., 2002). Si è visto che in vitro le fibre e l'acido fitico hanno una forte azione sinergica nel legare o complessare i minerali; anche studi su uomini ed animali hanno evidenziato che, in una dieta ricca in fibre con una certa quantità di acido fitico, si altera il metabolismo dei minerali. In linea generale però, gli effetti sull'assorbimento dei minerali dipendono dal tipo di fibra (solubile o insolubile, fermentiscibile o non fermentiscibile), dalla quantità di fibre assunte con la dieta e dai composti associati (Lopez et al., 2002). Carboidrati fermentiscibili (amido resistente, pentosani e fruttani) presenti in semi e legumi riescono ad annullare l'effetto inibitorio dell'acido fitico sull'assorbimento dei minerali. Studi effettuati su ratti hanno messo in risalto che, con la fermentazione di alcuni carboidrati da parte della flora batterica, si formano acidi grassi a catena corta come l'acetato, propionato e butirrato. Questi acidi possono complessarsi con ioni che hanno una bassa carica, che riescono ad attraversare le membrane cellulari degli enterociti.

Inoltre, avendo un'azione acidificante (diminuizione del pH) sull'intestino cieco, determinano un incremento della solubilità dei minerali ed il loro assorbimento (Lopez et al., 2002).

Acido fitico e proteine

Il fitato, oltre ad inibire l'assorbimento dei minerali comportandosi da agente chelante, limita anche l'assorbimento delle proteine. Maenz (2001) vide che il fitato e le proteine formavano complessi binari attraverso legami elettrostatici tra le cariche dei gruppi fosfato e quelle dei gruppi amminoacidici con residui di arginina o lisina presenti all'interno delle proteine o con i gruppi ammino terminali. Questi complessi binari fitato-proteine possono formarsi quando esistono le condizioni ottimali di pH nel tratto gastrointestinale (Maenz, 2001). A pH basso l'acido fitico ha una forte carica negativa dovuta alla totale dissociazione dei gruppi fosfato, mentre le proteine possiedono una carica netta positiva. Ciò provoca una forte interazione elettrostatica tra i gruppi fosfato basici dell'acido fitico e i residui amminoacidici protonati (lisina, istidina e arginina) (Adeola & Sands, 2003). Okubu et al. (1976) studiarono il range di pH che permetteva alle componenti di glicina delle proteine della soia di legarsi all'acido fitico. Nessun legame si osservava al di sopra di un punto isoelettrico pari a 4.9, con un incremento del livello di formazione dei legami ad ogni diminuzione di pI. Il massimo livello di legami si osservava ad un pI di 2.5. Da questi studi si può ipotizzare quindi, che il livello a cui la digestione proteica è inibita dalle interazioni fitato-proteine varia a seconda delle proteine e delle differenze nel

numero totale di gruppi cationici disponibili per partecipare al legame con il fitato. Il legame acido fitico-proteine nelle piante ne diminuisce la solubilità e la digeribilità, riducendo in questo modo il loro valore nutritivo (Adeola & Sands, 2003).

Effetti dell'acido fitico sulle attività enzimatiche

L'acido fitico può avere effetti negativi sulla digeribilità dell'amido combinandosi con enzimi digestivi o legando minerali (ad esempio calcio), noti come catalizzatori enzimatici (Thompson, 1986). Yoon et al. (1983) mostrarono che esiste una correlazione negativa tra l'indice glicemico e il contenuto di acido fitico, ed una significativa inibizione dell'attività salivare dell'alfa-amilasi da parte dell'acido fitico (Yoon et al., 1983; Thompson & Yoon, 1984). Bjorck & Nyman (1987) invece evidenziarono che l'acido fitico influiva poco sulle attività dell'alfa-amilasi, amiloglucosidasi, maltasi, cellulasi o emicellulasi. Sharma et al. (1978) mostrarono, come Yoon et al. (1983) una forte inibizione da parte dell'acido fitico sulle attività enzimatica di diverse alfa-amilasi.

Nyman e Bjorck (1987), invece non rilevarono alcun effetto negativo. Knuckles et al. (1989) mostrarono che il fitato è capace di determinare in vitro una piccola ma significativa diminuzione nella digestione della pepsina e sieralbumina bovina, fortemente correlata con il grado di fosforilazione dell'inositolo.

Risultati contraddittori ottenuti in diversi studi possono essere attribuiti alle differenze nel legame fitato-proteina derivanti dalle variazioni di pH utilizzato. Si è

visto inoltre che l'acido fitico riduce la digeribilità dei lipidi in vitro e nei topi in vivo (Knuckles et al., 1989).

Fitasi

Quando si parla di “fitasi ideale”?

Tre caratteristiche biologiche sembrano essere necessarie per classificare una “fitasi ideale”: efficace nel rilasciare fosforo-fitato nel tratto digestivo, resistente all'inattivazione termica nei processi alimentari, economica da produrre.

La capacità di ogni fitasi di idrolizzare fosforo-fitato nel tratto digestivo è determinata dalle sue proprietà enzimatiche, come efficacia catalitica, specificità del substrato, temperatura e pH ottimali e resistenza alla proteolisi. Siccome lo stomaco è il principale sito funzionale, è necessaria una fitasi con un pH ottimale basso o acidico e alta resistenza alla pepsina.

Cenni storici

Le prime fitasi commerciali sono state lanciate sul mercato nel 1991. Dalla scoperta dell'enzima fitasi alla sua commercializzazione in Europa sono passati circa 87 anni (Suzuki et al., 1907). Per poterlo commercializzare sono stati considerati due fattori: la praticità d'uso dell'enzima e la capacità di produrlo in modo economicamente vantaggioso (Wodzinski & Ullah, 1996). Le fitasi microbiche sono disponibili commercialmente sia liquide che in polvere. Natuphos è stata la prima fitasi disponibile commercialmente a partire da un ceppo di *Aspergillus niger* geneticamente modificato. I primi studi mirati ad identificare

composti fosforici organici presenti nelle piante furono condotti da Plimmer (1913) e da Anderson (1914a, b, c, d), che riconobbero l'importanza delle fitine in diete a base di soia. Il primo tentativo per rendere la fitasi un prodotto commercializzabile ebbe inizio nel 1962 a Skokie, (Illinois) all'International Minerals and Chemicals. Nel 1968 Shieh et al. isolarono dal terreno un microrganismo che era capace di produrre fitasi in quantità considerevoli. Nonostante vari tentativi, nessuno scoprì un microrganismo capace di produrre fitasi in colture liquide. Shieh et al. (1969) cercarono di ottimizzare i substrati di crescita e le condizioni di pH e temperatura, per favorire la produzione dell'enzima. Isolarono un ceppo di *Aspergillus niger*, NRRL 3135, produttore di due fitasi: la phy A e phy B. La phy A mostrava attività sia a pH 2.5 che a 5.5. La phy B invece aveva pH ottimale intorno a 2.0. Un team di ricerca del Southern Regional Research Center (SSRC) isolò, caratterizzò e sequenziò le fitasi phy A e phy B e una fosfatasi acida, prodotte da *A. niger* NRRL 3135.

Nel 1962 vennero sviluppati i primi progetti riguardo l'alimentazione di animali monogastrici in cui il fosfato inorganico era sostituito con la fitasi. Venne testato l'enzima nei mangimi per polli da arrosto per valutare se manteneva inalterata la sua attività nell'attraversare il gozzo e l'intestino degli animali. Poiché il pH ottimale dell'enzima era simile a quello del tratto digestivo dei polli, la fitasi non perdeva la sua attività nel gozzo e almeno parzialmente nell'intestino (Wodzinski & Ullah, 1996). Intorno al 1987 in Olanda ebbe inizio un progetto che riguardava l'abbattimento dell'inquinamento da fosfati nell'ambiente e falde acquifere, attraverso un miglioramento delle rese produttive di fitasi di *A. niger* NRRL 3135.

Dopo vari esperimenti e prove a diverse temperature si riuscì a produrre nel mezzo circa 7.9 g/l dell'enzima, partendo da un ceppo bioingegnerizzato. In seguito la Food and Drug Administration (FDA) approvò una petizione in cui le fitasi potevano essere definite GRAS (Generally Recognized As Safe) e quindi nel gennaio 1996 negli Stati Uniti potevano essere vendute come additivi per alimenti. In quello stesso periodo in Finlandia iniziarono ricerche sulle fitasi prodotte da aspergilli, per poterle utilizzare soprattutto nel processo di cottura e nell'alimentazione degli animali (Wodzinski & Ullah, 1996).

Caratteristiche delle fitasi

Le fitasi sono enzimi o sostanze a base proteica, che velocizzano o catalizzano una reazione chimica. Appartengono ad un sottogruppo della famiglia delle fosfatasi acide e catalizzano l'idrolisi dell'acido fitico a monofosfato inorganico ed esteri fosforici, o in alcuni casi a mio-inositolo libero (figura 2). Questi enzimi, a seconda dell'optimum di pH, della loro specificità per il substrato e meccanismo di reazione, possono essere classificati in fosfatasi basiche, fosfatasi acide porporiche, fosfatasi acide (con elevato e basso peso molecolare) e fosfatasi proteiche (Konietzny & Greiner, 2002).

La Enzyme Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry distingue due tipi di fitasi: la 3-fitasi, che inizialmente rimuove l'ortofosfato a partire dalla posizione D-3 del fitato e la 6-fitasi, che preferenzialmente inizia la defosforilazione del fitato in posizione L-6 (D-4) dell'anello del mio-inositolo. In particolare la 3-fitasi è tipica dei microrganismi mentre la 6-fitasi è caratteristica

delle piante superiori (Johnson & Tate, 1969). La prima fitasi ad essere caratterizzata fu quella di *Aspergillus niger* (phy A), codificata da 1.4 kb di frammenti di DNA, con una massa molecolare di 80 kDa e 10 siti N-glicosilati.

Come per altri enzimi, l'attività fitasica è influenzata dalle proprietà intrinseche dell'enzima e dalle condizioni in cui esso agisce (Lei & Porres, 2003). Le proprietà più rilevanti sono:

- specificità del substrato
- pH e temperatura
- termostabilità
- resistenza alla proteolisi
- punto isoelettrico
- massa molecolare.

Specificità del substrato

In base alla specificità per il substrato, le fitasi possono essere raggruppate in: quelle con un'elevata specificità per il substrato e quelle che possiedono una scarsa affinità per il fitato. Le fitasi con ampia specificità per il substrato degradano velocemente il fitato a mio-inositolo monofosfato senza accumulo di intermedi di reazione, mentre gli enzimi con scarsa affinità portano ad un accumulo di inositolo tri e bifosfato nel corso della degradazione del fitato, con una progressiva diminuzione della velocità nel rilascio di fosfato (Konietzny & Greiner, 2002). La differenza nella specificità per il substrato tra le due classi di

fitasi riflette una differente attività specifica con il fitato, poiché gli enzimi con un'ampia specificità per il substrato hanno una più bassa affinità per il fitato, mentre quelli con una bassa specificità per il substrato hanno una più alta attività specifica con il fitato (Konietzny & Greiner, 2002). Non rientrano in tale classificazione le fitasi delle piante e quelle di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*. Le fitasi delle piante mostrano un'ampissima specificità per il substrato e un'altissima attività specifica, mentre le fitasi di *Bacillus* sono molto specifiche per il fitato, ma hanno una attività specifica apparentemente bassa (Konietzny & Greiner, 2002). Sebbene molte fitasi siano in grado di degradare l'acido fitico ad esteri monofosfati dell'inositolo come prodotto finale, quelle di *Bacillus* sp. ad esempio degradano la molecola dell'acido fitico ad inositolo trifosfato come prodotto finale alternando la posizione del fosfato (Lei & Porres, 2003). In tabella 3 è riportata la specificità per il substrato di fitasi di origine microbica e vegetale. Adenosinmonofosfato (AMP), adenosindifosfato (ADP), adenosintrifosfato (ATP), guanosinmonofosfato (GMP), guanosintrifosfato (GTP), nicotinaminadenindinucleotidofosfato (NADP), *p*-nitrofenil fosfato, fenil-fosfato, 1-naftil-fosfato, 2-naftil-fosfato, fruttosio 1,6-difosfato, fruttosio 6-fosfato, glucosio 1-fosfato, glucosio-6 fosfato, galattosio 1-fosfato, α -glicerofosfato, β -glicerofosfato, 3-fosfoglicerato, piridoxalfosfato, *o*-fosfo-L-serina e pirofosfato sono molecole frequentemente idrolizzate dalle fitasi (Konietzny & Greiner, 2002). Solo poche fitasi sono altamente specifiche per il fitato come la fitasi alcalina di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, mentre le fitasi di *E. coli*, *A. niger* e *A. terreus* hanno una specificità per il fitato meno spinta. Ad eccezione delle fitasi di

Emericella nidulans e *Myceliophthora thermophila*, tutte quelle finora studiate seguono la costante cinetica di Michaelis-Menten. Come indicato in tabella 3, il valore K_m delle fitasi varia da < 10 a $650 \mu\text{M}$. Relativamente basso è il K_m delle fitasi di *A. niger* ($10\text{-}40 \mu\text{M}$), *A. terreus* ($11\text{-}23 \mu\text{M}$), *A. fumigatus* ($< 10 \mu\text{M}$), *Schwamniomyces castelli* ($38 \mu\text{M}$) e *K. aerogenes* ($62 \mu\text{M}$) (Konietzny & Greiner, 2002). Le costanti catalitiche delle fitasi (K_{cat}) hanno un intervallo ampio, che va da < 10 (soia e mais) a 1744 s^{-1} (*E. coli*) (tabella 3). L'efficienza cinetica di un enzima è confermata dal significato del rapporto k_{cat} / K_m per un dato substrato. La fitasi di *E. coli* ha un valore di k_{cat}/K_m pari a $1.34 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ che è il più alto finora riscontrato. Nonostante le percentuali relative di idrolisi di alcuni composti fosforilati come il pirofosfato e l'ATP per le fitasi delle piante siano significativamente più alte di quelle per il fitato, queste stesse fitasi hanno un rapporto k_{cat} / K_m più alto. Ciò sta ad indicare che il fitato è il miglior substrato per le fitasi delle piante in condizioni fisiologiche standard (Konietzny & Greiner, 2002).

In tabella 3, è inoltre riportata l'energia di attivazione di Arrhenius per l'idrolisi del fitato ad opera di varie fitasi, che varia da 25 a 53 kJ mol^{-1} (Konietzny & Greiner, 2002).

Temperatura e pH

Finora sono state identificate due fitasi: quelle acide con un pH ottimale intorno a 5 ed alcaline con un pH ottimale intorno a 8, presenti soprattutto nei semi dei legumi e nell'intestino dei ratti (Konietzny & Greiner, 2002). Come mostrato in tabella 3,

molte fitasi hanno un pH ottimale compreso tra 4.5 e 6. La fitasi di *A. niger* (phyA) ad esempio ha due pH ottimali: 2.5 o 5.5 (Lei & Porres, 2003). Diversamente da molte altre fitasi, quella di *A. fumigatus* ha un ampio intervallo di pH; circa l'80 % della massima attività si evidenzia ad un valore di pH compreso tra 4.0 e 7.3 (Wyss et al., 1999a). Alcune fitasi batteriche, specialmente quelle di *Bacillus* sp., hanno un pH ottimale che va da 6.0 a 8.0.

Comparando i vari pH, si nota che molte fitasi prodotte hanno la massima attività in un intervallo di pH acido, eccetto per la fitasi di *Bacillus* sp. In questo modo, le fitasi possono agire in maniera efficiente nel gozzo o stomaco, poiché trovano condizioni di pH ottimali (Simon & Igbasan, 2002). Per quanto concerne la temperatura ottimale, varia da 35 a 77°C (tabella 3). In generale, le fitasi delle piante hanno massima attività a temperature più basse rispetto a quelle microbiche. Tra le fitasi finora isolate, si è visto che le fitasi dei cereali sono quelle che agiscono a temperature più basse (Konietzny & Greiner, 2002). Temperature relativamente alte precludono un'attività più o meno spinta delle fitasi, soprattutto nello stomaco di alcuni animali come maiali e polli (Lei & Porres, 2003).

Termostabilità

La termostabilità delle fitasi, così come per altri enzimi, dipende dalla loro capacità di resistere alla denaturazione termica e ritornare alla conformazione nativa dopo trattamento termico (Wyss et al., 1998). Un aspetto che va ad influenzare negativamente la termostabilità degli enzimi è la loro bassa attività specifica a temperatura ambiente che, associata ad una forte rigidità, li fa diventare meno

flessibili (Lei & Porres, 2003). È stata misurata l'attività residua dopo trattamento termico in diverse condizioni (concentrazioni di tampone, tempi, temperature) ma, se consideriamo un unico enzima, l'interpretazione dei dati risulta difficile; comparando invece misurazioni di più enzimi, si riescono ad ottenere informazioni sulla stabilità relativa.

Ad esempio pre-incubando a 80°C per 60 minuti in un tampone sodio acetato a pH 5.5 le fitasi di *A. niger*, *Peniophora lycii* e *Trametes pubescens*, l'attività residua era del 52, 62 e 15% rispettivamente (Simon & Igbasan, 2002). Estremamente termostabile è la fitasi di *A. fumigatus* studiata da Pasamontes et al. (1997) capace di resistere a temperature superiori a 100°C per circa 20 minuti, con una perdita del 10% della sua attività iniziale. In realtà la sua termostabilità è dovuta ad una notevole capacità di ritornare completamente nello stato nativo in una conformazione in cui è pienamente attiva subito dopo il trattamento termico (Konietzny & Greiner, 2002). Wyss et al. (1998) studiarono la termostabilità di una fitasi e di una fosfatasi acida a pH ottimale di 2.5 di *A. niger* misurandone l'attività enzimatica. Da questi studi emerse che la fitasi non era termostabile, poiché non aveva la capacità di ritornare allo stato nativo dopo la denaturazione da calore. Con una temperatura compresa tra 50 e 55 °C subiva un cambio conformazionale irreversibile, con una perdita del 70-80% dell'attività enzimatica (Kerovuo, 2000). Invece la fosfatasi acida a pH 2.5 aveva un'alta termostabilità intrinseca. A temperature superiori a 80°C, avvenivano cambiamenti minori anche se si verificava un'irreversibile inattivazione dell'enzima; un'esposizione invece a 90°C comportava un cambiamento conformazionale irreversibile e quindi una

perdita completa dell'attività enzimatica. La fitasi ad esempio del ceppo *Bacillus* sp. DS11 ha una temperatura ottimale di 70°C, che è la più alta tra le fitasi microbiche (Kerovuo, 2000). E' molto termostabile con un'attività residua del 100% dopo 10 minuti di incubazione a 70°C (in presenza di CaCl₂). La stabilità della fitasi del ceppo *Bacillus* sp. DS11 si riduce drasticamente a 50°C in assenza di CaCl₂, mentre è poco stabile sopra i 90°C in presenza di CaCl₂. Dopo incubazione a 90°C per 10 minuti, l'attività residua dell'enzima si riduce del 50% rispetto a quella iniziale e ciò indica che lo ione Ca²⁺ ha un forte effetto protettivo sull'enzima contro le denaturazioni termiche (Kerovuo, 2000).

Resistenza alle proteolisi

Una fitasi per poter essere efficace deve resistere fortemente alla degradazione idrolitica che avviene nel tratto gastro-intestinale ad opera delle proteasi. Le fitasi fungine e batteriche hanno una diversa sensibilità alla pepsina e tripsina; le seconde hanno una più alta resistenza alla degradazione proteolitica rispetto alle prime (Lei & Porres, 2003). L'inattivazione delle fitasi ad opera degli enzimi proteolitici è influenzata dal rapporto fitasi/proteasi. Rodriguez et al. (1999) studiarono la sensibilità della fitasi di *A. niger* e della fosfatasi acida a pH 2.5 di *E. coli* a tre concentrazioni di pepsina e tripsina. I risultati indicavano un'alta stabilità della fosfatasi acida di *E. coli* in presenza della pepsina, mentre la fitasi di *A. niger* era gradualmente inattivata con l'aumento della concentrazione di pepsina (Simon & Igbasan, 2002). L'alta stabilità dell'enzima di *E. coli* contro l'inattivazione ad opera della pepsina è stata riportata anche da Golovan et al. (2000). La fitasi di

Bacillus sp. è estremamente resistente alla papaina, pancreatina e tripsina, anche se altamente suscettibile alla pepsina. La sensibilità alla pepsina della fitasi di *Bacillus* sp. potrebbe essere causata da una modificazione conformazionale durante la denaturazione a bassi pH (Simon & Igbasan, 2002).

Punto isoelettrico

Come riportato in tabella 3, il punto isoelettrico delle fitasi varia a seconda del tipo di fitasi e del microrganismo che le produce; la variabilità è dovuta alle diverse sequenze aminoacidiche che ne determinano le cariche (www.phytase.net). È stato dimostrato che *Aspergillus ficuum* ha un pI di circa 4.5, così come presumibilmente molte delle fitasi di altre specie appartenenti al genere *Aspergillus* (*Aspergillus niger* ed *Aspergillus oryzae*). Tutte le fitasi di funghi, batteri e piante hanno un valore di pI acido, ad eccezione della fitasi di *Aspergillus fumigatus* che ha un pI di circa 8.6 (tabella 3) (Wyss et al., 1999b). Le fitasi batteriche sembrano possedere un pI maggiore rispetto a quelle fungine: le prime hanno generalmente un pI maggiore di 6, le seconde un valore di pI inferiore a 5.5.

Massa molecolare

La maggior parte delle fitasi fino ad oggi caratterizzate presentano una struttura proteica monomerica con una massa molecolare compresa tra 40 e 70 kDa ed alcune presentano anche subunità multiple (tabella 4) (Konietzny & Greiner, 2002). La fitasi prodotta dal ceppo di *A. niger* NRRL 3135 è tra gli enzimi più studiati; contiene parti sostanziali di catene N-legate al mannosio e galattosio, una

massa molecolare di 85 kDa ed è per il 27% glicosilata. Analizzando gli amminoacidi si nota un alto contenuto di acido aspartico, serina e treonina (Dvořáková, 1998). La struttura primaria completa della fitasi è spiegata attraverso la sequenza di Edman. La molecola deglicosilata è una proteina con 441 residui di 48.5 kDa ed è costituita da amminoacidi per il 37% non polari, l'11.5% acidi ed il 9.5% basici (Ullah & Dischinger, 1993). La fitasi ad esempio che si accumula nei semi del mais durante la germinazione è un enzima dimerico formato da due subunità di 38 kDa. Quella purificata invece dall'intestino di ratto mostra all'SDS-PAGE due bande proteiche con una massa molecolare di 70 e 90 kDa rispettivamente (Kerovuo, 2000). Queste bande rappresentano due differenti enzimi, fosfatasi alcalina e fitasi; soltanto quella di subunità 90 kDa è indotta dall'acido fitico. Sono state trovate due diverse forme di fitasi in *Klebsiella aerogenes* di cui una, che è l'enzima nativo, ha un peso molto elevato (700 kDa), mentre l'altra è probabilmente una frazione dell'enzima nativo con peso molecolare basso (tra 10 e 13 kDa) (Kerovuo, 2000). Le fitasi batteriche sono generalmente più piccole di quelle fungine. La massa teorica delle fitasi fungine è di circa 50 kDa, mentre quella sperimentale tra i 65 e 70 kDa. La fitasi nativa di *A. niger* NRRL 3135 risulta glicosilata per il 27%, mentre le glicosilazioni di *Hansenula polymorpha* e *Saccharomyces cerevisiae* sono altamente variabili. In generale, le glicosilazioni possono avere diversi effetti sulle proprietà di un enzima. Prima di tutto influenzano le proprietà catalitiche e la stabilità dell'enzima, il pI della proteina ed infine consumano energia metabolica rendendo più basso il livello di espressione della proteina (Kerovuo, 2000). Han & Lei (1999) studiarono

il ruolo della glicosilazione nell'espressione funzionale della fitasi (phy A) di *A. niger* in *Pichia pastoris*. I risultati evidenziarono la stessa capacità di idrolizzare l'acido fitico ed un leggero miglioramento della termostabilità nell'enzima glicosilato prodotto da *P. pastoris* rispetto all'enzima espresso in *A. niger*. La deglicosilazione tramite tunicamicina (antibiotico che blocca la biosintesi delle glicoproteine) durante l'espressione determinava una minore produzione della fitasi; ciò evidenziava che la glicosilazione è vitale per la biosintesi del ricombinante phy A in *P. pastoris* (Kerovuo, 2000).

Distribuzione delle fitasi in natura

Le fitasi sono molto diffuse in natura; si ritrovano nei microrganismi, nelle piante e in alcuni tessuti animali (Konietzny & Greiner, 2002; Vohra & Satyanarayana, 2003) (tabella 5). Ricerche recenti hanno dimostrato che le fitasi microbiche sono tra le più promettenti per un'applicazione biotecnologica (Pandey et al., 2001; Vohra & Satyanarayana, 2003). Sebbene le fitasi da diverse specie di batteri, lieviti e funghi siano state caratterizzate (Konietzny e Greiner, 2002; Pandey et al., 2001; Vohra e Satyanarayana, 2003), la produzione commerciale correntemente si focalizza sul fungo del suolo *Aspergillus*. Comunque, per diverse proprietà (specificità del substrato, resistenza alla proteolisi, efficienza catalitica), le fitasi batteriche sono una reale alternativa agli enzimi fungini.

Microrganismi

Le fitasi sono state ritrovate in molti batteri come *Pseudomonas* sp. (Irving & Cosgrove, 1971), *Bacillus* sp. (Choi et al., 2001; Kerovuo et al., 1998; Powar & Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992), *Escherichia coli* (Greiner et al., 1993), *Enterobacter* e batteri del rumine anaerobici. Nell'ambito dei batteri lattici pochi ceppi sembrano avere attività fitasica, ma con la maggior parte di essi non si è visto alcun rilevamento significativo di attività fitasica (Shirai et al., 1994; Sreeramulu et al., 1996; Zamudio et al., 2001). Le fitasi microbiche sono facilmente prodotte in terreni colturali e, in generale, possono essere sintetizzate extracellularmente dallo stesso starter microbico durante i processi alimentari (De Angelis et al., 2003). L'attività fitasica si riscontra in numerosi microrganismi che, per la maggior parte producono soltanto fitasi intracellulari. Quelle extracellulari sono state osservate esclusivamente nei funghi filamentosi; in particolare ceppi di *A. niger* sono stati considerati i maggiori produttori di fitasi (Gargova et al., 1997). Gli unici batteri che hanno mostrato attività fitasica extracellulare appartengono ai generi *Bacillus* (Choi et al., 2001; Kerovuo et al., 1998; Kim et al., 1998; Powar & Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992) ed *Enterobacter*. Da diversi studi sulle fitasi prodotte da batteri lattici, emerge che pochi di essi mostrano attività fitasica (Sreeramulu et al., 1996; Zamudio et al., 2001). Soltanto ultimamente si è visto che alcuni batteri lattici isolati da impasti acidi erano capaci di idrolizzare il fitato. In particolare, un ceppo di *Lactobacillus sanfranciscensis*, CB1, mostrava un'attività fitasica molto elevata (420.8 U/ml) dopo 2 ore di incubazione a 45°C (De Angelis et al., 2003). Inoltre, alcuni batteri lattici hanno mostrato la capacità di degradare il

fitato durante processi di fermentazione degli alimenti. La riduzione del contenuto di fitato poteva essere probabilmente causata dall'attivazione di fitasi endogene come risultato di un abbassamento del pH dovuto alla produzione di acidi (Konietzny & Greiner, 2002).

Anche nei lieviti la capacità di sintetizzare e secernere fitasi sembra essere diffusa. In diversi studi si è visto che tutti i lieviti testati mostravano attività fitasica quando crescevano in un substrato contenente IP_6 come unica fonte di fosforo. I lieviti studiati appartenevano alle specie *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis* e diverse specie tropicali come *Metschnikowia lochheadii*, *Candida drosophilae* e *Candida tolerans* (Sandberg & Andlid, 2002). Nella maggior parte dei microrganismi è stato dimostrato che il livello di fosfato teoricamente disponibile non è l'unico fattore che influenza la produzione delle fitasi microbiche. Ad esempio, in una brodocoltura di *A. niger* NRRL 3135 in ambiente anaerobico, la produzione di fitasi è inibita da un'alta concentrazione di glucosio ed un basso livello di ossigenazione. Rispetto alla produzione delle fitasi fungine, la sintesi dell'enzima in *B. subtilis* e *K. terrigena* è indotta dal fitato presente nel terreno di coltura (Konietzny & Greiner, 2002).

Piante

Le fitasi si trovano maggiormente nei chicchi, semi e polline di molte piante come cereali, semi oleosi e noci, ma una bassa attività fitasica è stata riscontrata anche nelle radici delle piante (Konietzny & Greiner, 2002). Si può dire quindi che le

fitasi sono diffuse nel regno vegetale; in particolare nel grano, segale, orzo, pisello, fagiolo, soia, mais, riso, senape bianca, patata, ravanella, lattuga, spinaci, graminacee, etc (Dvořáková, 1998). La fitasi presente nei chicchi, semi e polline agisce degradando il fitato durante la fase di germinazione in modo da rendere fosfati, minerali e mio-inositolo disponibili per la crescita e lo sviluppo della pianta (Reddy et al., 1989). Nelle radici la fitasi determina un aumento della disponibilità del fosforo utile al terreno, anche se alcuni studi hanno dimostrato che il fitato è scarsamente utilizzato dalle piante stesse (Hayes et al., 2000). In generale i legumi e i semi oleosi hanno un'attività fitasica 10 volte più bassa. L'attività fitasica più alta è stata riscontrata nella segale, frumento, orzo e grano saraceno. Il pH ottimale per la degradazione del fitato è di circa 5.0, mentre nei legumi l'enzima può agire sia ad un pH acido (5) che basico (8). Per i cereali inoltre, si è visto che l'attività fitasica si manifesta nello strato aleuronico, mentre per i legumi nei cotiledoni (Konietzny & Greiner, 2002). Ci sono opinioni contrastanti sull'origine dell'attività fitasica nei cereali e legumi durante la germinazione. Alcuni suggeriscono una sintesi "de novo" della fitasi (Bianchetti & Sartiraba, 1967), mentre altri la attribuiscono ad un'attivazione di un enzima già esistente (Eastwood & Laidman, 1971). Durante la germinazione l'attività fitasica potrebbe essere controllata dall'acido giberellico e dai fosfati; l'acido giberellico semplicemente aumenta la secrezione di fitasi, ma non ne stimola la sintesi (Konietzny & Greiner, 2002).

Tessuti animali

Rispetto alle fitasi presenti nei microrganismi e piante, quelle nei tessuti animali sono ancora poco studiate. Nel 1908 si scoprì la prima fitasi da tessuto animale, ovvero nel fegato e sangue di vitello. Successivamente ulteriori ricerche su sangue di mammiferi non diedero risultati soddisfacenti; fu individuata la fitasi soltanto nel sangue di piccoli invertebrati come uccelli, rettili e pesci (Konietzny & Greiner, 2002). Siccome il fitato ha effetti negativi dal punto di vista nutrizionale sugli animali, incluso l'uomo, è stata studiata l'attività fitasica nel tratto gastrointestinale di vari animali. Tale attività è stata rilevata negli estratti della mucosa dell'intestino di topi, conigli, polli e vitelli (Konietzny & Greiner, 2002).

Sito attivo e meccanismo di reazione

Le fosfatasi acide sono un gruppo eterogeneo di enzimi che idrolizzano gli esteri fosforici a bassi valori di pH. Molte di queste hanno in comune una sequenza proteica altamente conservata (*RHGxRxP-motif*) in prossimità del gruppo N-terminale. Le fosfatasi acide che contengono questo sito attivo sono definite come fosfatasi acide istidina, poiché presentano un'istidina nel sito attivo implicato nell'attività catalitica. Inoltre, sono caratterizzate da un altro sito conservato (*HD-motif*) in prossimità del gruppo C-terminale. Questo sito attivo è conservato in tutte le fitasi fungine ed è anche presente nella fitasi di *Escherichia coli*.

Esistono due classi di fosfatasi acide: a basso ed alto peso molecolare. Queste ultime a loro volta si suddividono in due sottoclassi: una che presenta il sito RH oppure HD e l'altra che li presenta entrambi (Kerovuo, 2000). In seguito a studi

effettuati da Ullah e Dischinger (1995) su mutagenesi sito-diretta della fitasi di *Escherichia coli*, si è giunti alla formulazione del meccanismo di reazione delle fosfatasi acide istidina, che implica due step:

- la carica positiva del gruppo glicinico del tripeptide RHG interagisce direttamente con il gruppo fosfato del substrato, rendendolo più suscettibile all'attacco nucleofilo, mentre l'istidina agisce come elemento nucleofilo nella formazione di un complesso fosfoenzimatico instabile;
- l'acido aspartico protona il gruppo uscente del substrato.

Considerando la fitasi di *Aspergillus niger*, la struttura delle fosfatasi acide istidine può essere suddivisa in due domini, uno grande chiamato α/β ed un altro chiamato α . Il dominio α/β è costituito da sei foglietti piegati β , di cui i foglietti A, B, C, D sono paralleli ed i foglietti A, E, F antiparalleli. All'estremità N-terminale del foglietto centrale sono presenti due lunghe α -eliche (c e d), mentre all'estremità C-terminale sono presenti due lunghe α -eliche (k e l) e due α -eliche più piccole (m e n). Il dominio α , invece, è costituito da una α -elica centrale e da sette eliche disposte intorno ad essa (a, b, c, d, e, f, g, i, j). Nel mezzo di questi due domini una "sacca" profonda, limitata dall'estremità N-terminale della proteina, contiene gli aminoacidi implicati nel meccanismo di reazione: Arg58, His59 ed i restanti aminoacidi che costituiscono la sequenza RHGxRxP-*motif* caratteristica di queste fitasi. In tutta la sequenza sono state identificate dieci cisteine formanti cinque ponti disolfuro, che permettono il mantenimento della struttura tridimensionale dell'enzima.

La struttura della fitasi di *Escherichia coli* è costituita da due domini, quello α/β conservato e quello α variabile (Konietzny & Greiner, 2002). Due α -eliche (i, j) si trovano al centro circondate da un insieme di eliche (*Aspergillus niger*), diversamente però è stata osservata la presenza di un unico “ β -fermaglio”, che contorna il bordo opposto del sito attivo all’interno della sacca catalitica. La fosfatasi acida di *Aspergillus niger* con optimum di pH a 2.5, a differenza degli enzimi descritti precedentemente, possiede una struttura quaternaria tetramericata in soluzione anziché una struttura monomerica. Le interazioni responsabili della tetramerizzazione provengono dalla parte opposta dell’entrata del sito attivo per cui le quattro entrate sono tutte esposte al solvente permettendo un facile accesso al substrato. Inoltre, due residui N-acetilglucosammina (NAG472, NAG473) di un idrato di carbonio sono legati all’Asn172 favorendo la formazione del tetramero. Il dimero è formato da due monomeri identici con un’ampia superficie di sovrapposizione di circa 2700 Å (13% della superficie totale). L’interazione principale tra i due monomeri è osservata a livello dell’estremità N-terminale (residui 14-24), piegandosi sulla superficie dell’altro monomero per formare il dimero. Il tetramero presenta una struttura piramidale (figura 3) (www.123bio.net).

Le sequenze aminoacidiche delle fitasi di *Bacillus amyloliquefaciens* (Kim et al., 1998b) e *Bacillus subtilis* (Kerovuo et al., 1998) non hanno omologia con le sequenze di altre fosfatasi presenti nel database. Inoltre, non presentano i siti attivi RHGxRxP e HD-*motif* riscontrati nelle fosfatasi acide istidine. Quindi, le fitasi del

genere *Bacillus* rappresentano una nuova classe di fosfatasi. Una caratteristica interessante di questa famiglia è la loro dipendenza dal calcio che ne influenza la stabilità ed attività catalitica. Diversi studi hanno portato all'ottenimento della struttura cristallina delle fitasi termostabili (Ts-phy) espresse da *Bacillus amyloliquefaciens* al fine di evidenziare il ruolo del calcio nella stabilità dell'enzima e conoscere la struttura dettagliatamente. L'enzima ha una struttura elicoidale con sei ali, ognuna delle quali è composta da quattro a cinque foglietti β piegati. Il quarto foglietto di ogni ala è interamente connesso alla prima ala successiva. Le ali sono allineate a livello degli assi delle eliche, per cui al centro delle eliche si forma un canale che le attraversa da una parte all'altra. Le ali inoltre, presentano delle interazioni di carattere idrofobico. La fissazione degli ioni calcio avviene in tre parti dell'enzima, due alla periferia ed uno al centro. I due ioni calcio che sono alla periferia (Ca_1 e Ca_2) formano un centro a due atomi in cui l'Asp308 agisce come residuo legante (figura 4). Studi recenti hanno dimostrato che la sola presenza del calcio a livello dei siti ad alta affinità non è sufficiente per osservare l'attività catalitica, ma occorre la presenza dello ione a livello dei tre siti dell'estremità superiore della molecola. In effetti, questi tre ioni formano una triade rispettivamente con il Ca_4 , Ca_5 e Ca_6 (www.123bio.net).

Anche la fitasi di *Enterobacter* spp. non è omologa a nessuna fitasi o fosfatasi acida, ma presenta un 30-38% di omologia con le fosfatasi acide a basso peso molecolare di *Chryseobacterium meningosepticum* e *Streptococcus equisimilis*. In particolare appaiono conservati alcuni residui di lisina e triptofano.

Di seguito è riportata la sequenza aminoacidica di *Aspergillus niger* (blu) e *Aspergillus ficuum* (verde). Su una sequenza di 438 aminoacidi ci sono solo 12 differenze (rosso) (www.phytase.net):

TCDTVDQGYQCFSETSHLWGQYAPFFSLANESAI SPDVPAGCRVTFAQVLSRH
SCDTVDQGYQCFSETSHLWGQYAPFFSLANESVISPEVPAGCRVTFAQVLSRH

GARYPTESKGGKYSALIEEIQQNVTTFDGKYAFLKTYNYSLGADDLTPFGEQE
GARYPTDSKGGKYSALIEEIQQNATTFDGKYAFLKTYNYSLGADDLTPFGEQE

LVNSGIKFYQRYESLTRNIIPFIRSSGSSRVIASGKFIIEGFQSTKLKDPRAQ
LVNSGIKFYQRYESLTRNIVPFIRSSGSSRVIASGKFIIEGFQSTKLKDPRAQ

PGQSSPKIDVVI SEASSNNTLDPGTCTVFEDSELADTVEANFTATFAPSIRQ
PGQSSPKIDVVI SEASSNNTLDPGTCTVFEDSELADTVEANFTATFVPSIRQ

RLENDLSGVTLTDTEVTYLMDCSFDTISTSTVDTKLSPFCDLFTHDEWIHYD
RLENDLSGVTLTDTEVTYLMDCSFDTISTSTVDTKLSPFCDLFTHDEWINYD

YLQSLKYYGHGAGNPLGPTQGVGYANELIARLTHSPVHDDTSSNHTLDSNPA
YLQSLKYYGHGAGNPLGPTQGVGYANELIARLTHSPVHDDTSSNHTLDS SPA

TFPLNSTLYADFSHDNGIISILFALGLYNGTKPLSTTTVENITQTDGFSSAWT
TFPLNSTLYADFSHDNGIISILFALGLYNGTKPLSTTTVENITQTDGFSSAWT

VPFASRLYVEMMQCQAEQEPLVRVLVNDRVVPLHGCPIDALGRCTRDSFVRGL
VPFASRLYVEMMQCQAEQEPLVRVLVNDRVVPLHGCPVDALGRCTRDSFVRGL

SFARSGGDWAEC SA
SFARSGGDWAEC FA

Effettori dell'attività enzimatica

E' stato dimostrato che gli ioni metallici hanno la capacità di regolare l'attività fitasica, ma è molto difficile determinare se l'effetto inibitorio che essi esprimono è il risultato di un legame con l'enzima o della formazione di un complesso ioni-fitato poco solubile (Konietzny & Greiner, 2002). È stato osservato che le fitasi di *Enterobacter* spp. sono inibite fortemente da alcuni ioni metallici come Zn^{2+} , Ba^{2+} ,

Cu^{2+} , Al^{3+} . Allo stesso modo la fitasi di *Bacillus subtilis* (natto) N-77 è inibita da Zn^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} . Entrambi questi enzimi sono fortemente inibiti da EDTA (acido etilendiamminotetracetico). Diversamente l'attività fitasica di *Aspergillus fumigatus* è stimolata in presenza di EDTA (fino al 50%) (Konietzny & Greiner, 2002; Kerovuo, 2000). Reagenti riducenti, come 2-mercaptoetanololo, ditiotriolo e glutatione non hanno effetto sulle fitasi microbiche. Ciò indica che questi enzimi non hanno gruppi sulfidrilici liberi o che i gruppi sulfidrilici liberi influenzano negativamente l'attività enzimatica (Kerovuo, 2000). Il fluoruro è un forte inibitore di diverse fosfatasi, ma non ha effetto sulle fitasi alcaline di *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* (Konietzny & Greiner, 2002).

Il molibdato, il wolframato e il vanadato sono riconosciuti come inibitori delle fitasi come nel caso di *Klebsiella terrigena* (Kerovuo, 2000). Anche lo stesso fitato inibisce molte fitasi quando è ad una concentrazione di 300 μM , come nel caso delle radici di mais, fino a 20 mM per la soia. Con un'elevata concentrazione di substrato, la carica dovuta ai gruppi fosfato potrebbe influenzare le condizioni locali del dominio catalitico dell'enzima. Questo potrebbe inibire la conversione del complesso enzima-substrato ad enzima e prodotti, sebbene la formazione di complessi proteina-fitato poco solubili non possa essere esclusa (Konietzny & Greiner, 2002).

Sistema dell'espressione delle fitasi

La fitasi batterica è un enzima inducibile e la sua espressione è soggetta ad una complessa regolazione, non uguale per tutti i batteri (Konietzny & Greiner, 2004).

Finora la produzione della fitasi è stata studiata, dettagliatamente, solo in *Escherichia coli* e *Roultella terrigena*. In un mezzo “non limitante” tali fitasi sono inibite nel corso della fase di crescita esponenziale e vengono prodotte non appena le colture entrano nella fase stazionaria. Questo implica che la sintesi dell’enzima, in un mezzo “non limitante”, potrebbe essere indotta da carenza di un nutriente o di energia che si verificano durante la fase stazionaria..

Nel caso di *Escherichia coli* l’espressione della fitasi è indotta quando per la crescita è necessario fosforo inorganico, mentre quantità basse di carbonio, azoto e zolfo hanno uno scarso effetto sulla sua sintesi (Konietzny & Greiner, 2004). Una forte inibizione della formazione di fitasi è generalmente stata osservata in molti produttori microbici, inclusi muffe, lieviti e batteri, con l’eccezione di *Raoultella terrigena* e dei batteri del rumine (Konietzny & Greiner, 2004). La repressione della sintesi di fitasi sembra essere meno significativa in un mezzo con una composizione estremamente complessa. Non si conosce però, come i componenti del mezzo portino ad una riduzione dell’espressione. Inoltre, l’espressione della fitasi dipende dalla natura della fonte di carbonio utilizzata per la crescita. Il glucosio, mostrando una repressione catabolica, è stato usato per aumentare la produzione di fitasi.

In un mezzo con pochi nutrienti, la carenza di fosfato, ma non quella di glucosio e ammonio, provoca una forte stimolazione dell’espressione del gene *rpoS*, identificato come regolatore centrale di molti geni in fase stazionaria, seguita da un incremento dell’attività fitasica. In *Escherichia coli* è stato dimostrato che il sistema cAMP-CAP (nutriente-specifico), più che la fonte di carbonio, è

direttamente implicata in questa regolazione, mentre la sintesi della fitasi di *Escherichia coli* e di *Raoultella terrigena* è regolata negativamente dal cAMP (Konietzny & Greiner, 2004).

Degradazione del fitato

La degradazione del fitato assume un'importante valenza nutrizionale, poiché la rimozione dei gruppi fosfato dall'anello di inositolo determina una minore forza di fissazione del fitato nei confronti dei minerali, aumentandone la solubilità e quindi la biodisponibilità dei minerali essenziali (Sandberg & Andlid, 2002). Esistono tre metodi per limitare l'effetto inibitorio dell'acido fitico sull'assorbimento dei minerali presenti negli alimenti a base di cereali e legumi. Il primo consiste nel rimuovere l'acido fitico con il metodo dell'ultrafiltrazione; il secondo nel degradarlo enzimaticamente e il terzo aggiungendo composti all'alimento che inibiscono la formazione del legame tra minerali ed acido fitico, come acido ascorbico (Davidsson et al., 1995) ed EDTA (Hurrell et al., 2000). Quindi le fitasi assumono un ruolo importante nell'alimentazione, sia perché degradano il fitato nel corso della preparazione degli alimenti, che per la sua idrolisi nel tratto gastrointestinale. Il contenuto di fitato negli alimenti può essere ridotto a seguito di processi tecnologici che subiscono gli alimenti; attivando la fitasi nativa dello stesso o aggiungendo l'enzima come additivo (Sandberg & Andlid, 2002).

Idrolisi del fitato nel tratto gastrointestinale

Pochi studi sono stati fatti per valutare l'idrolisi del fitato nello stomaco. Ricerche svolte sull'idrolisi dell'inositolo fosfato nello stomaco dei suini da macello hanno mostrato che approssimativamente il 50% del fitato ingerito viene idrolizzato (Sandberg & Andlid, 2002). L'idrolisi probabilmente avviene in seguito ad un'attività fitasica nativa dell'alimento, se nella dieta di tali animali è presente l'orzo come cereale. Nel considerare la degradazione del fitato nell'intestino, bisogna tener presente dell'effetto di fitasi provenienti dall'alimentazione, di fitasi della mucosa intestinale e fitasi prodotte dalla microflora intestinale. L'optimum per l'attività endogena di fitasi nell'alimento varia da un pH di 4 a 6, anche se una lieve attività è stata registrata a pH più bassi. Le fitasi endogene sono inoltre termolabili, essendo inattivate a 70-80°C, temperature comunemente raggiunte nel corso della preparazione degli alimenti (Sandberg & Andlid, 2002). Si è visto inoltre, che l'attività fitasica aumenta con il diminuire del numero dei gruppi fosfato. Ciò suggerisce che l'idrolisi nell'intestino può essere favorita dalle fitasi presenti nello stomaco con formazione di inositolo fosfati inferiori. Rimuovendo alcuni gruppi fosfato nello stomaco, l'inositolo fosfato con un basso livello di fosforilazione probabilmente è molto più facilmente idrolizzato dalle fosfatasi presenti nell'intestino, che non sono in grado di idrolizzare l'IP₆. Sandberg et al. (1987) studiarono proprio l'effetto della fitasi assunta con la dieta e di quella intestinale sull'idrolisi dell'IP₆. Venne paragonata la modalità di degradazione dell'IP₆ da parte dell'enzima nella crusca di frumento cruda e nella crusca sottoposta a lavorazione (estrusione). Sei soggetti ileostomizzati furono studiati

durante due periodi di 4 giorni con una dieta costante a basso contenuto di fibre e con l'aggiunta di 54 g di una miscela composta da crusca cruda, glutine e amido nel primo periodo ed una dieta di 54 g con crusca estrusa nel secondo periodo. I risultati evidenziarono che il 60% dell'IP₆ proveniente dalla dieta con crusca cruda era idrolizzato durante il passaggio attraverso lo stomaco e l'intestino tenue, con un incremento dell'assorbimento di zinco e fosforo e formazione di prodotti di idrolisi. Questo non avveniva per i soggetti alimentati con crusca sottoposta ad estrusione, in quanto nel corso della cottura e dell'estrusione, la fitasi intrinseca della crusca veniva disattivata (Sandberg & Andlid, 2002). Sandberg & Andersson (1988) estesero questo studio utilizzando crusca di frumento con fitasi non attiva e non trovarono né idrolisi dell'IP₆, né la formazione di prodotti intermedi. Sandberg et al. (1987) e Sandberg & Andersson (1988) conclusero quindi che la fitasi dietetica ha un'importanza elevata nell'idrolisi del fitato nello stomaco e nell'intestino tenue, mentre la fitasi intestinale, se presente nell'uomo, non gioca un ruolo significativo. Infatti, recentemente è stato dimostrato che l'attività fitasica che si verifica nell'intestino tenue dell'uomo è limitata, confermando che l'intestino tenue ha una bassa capacità di digerire l'IP₆ (Sandberg & Andlid, 2002). L'azione della fitasi microbica invece, si esplica nel colon ad opera della microflora intestinale. Gli animali "germ-free" (germi liberi) potrebbero essere un modello efficace per investigare *in vivo* il grado della degradazione del fitato da parte di fitasi microbiche. In uno studio di Wise & Gilbert (1982) venne paragonata l'idrolisi del fitato in ratti "germ-free" e convenzionali. Nei ratti convenzionali alimentati con diete con alto e basso contenuto in calcio era

idrolizzato rispettivamente il 22 e il 55% del fitato, mentre un'idrolisi trascurabile si verificava nei ratti "germ-free". Si concluse quindi, che la microflora era responsabile dell'idrolisi osservata (Sandberg & Andlid, 2002).

Defosforilazione enzimatica del fitato durante processi alimentari per incrementare la biodisponibilità di minerali essenziali

In diversi processi alimentari si ha una riduzione del contenuto di fitato presente nella materia prima da trasformare. L'idrolisi del fitato, ad esempio, durante la germinazione, il lavaggio, la cottura e la fermentazione avviene grazie all'attivazione di fitasi intrinseche (Beal & Mehta, 1985), naturalmente presenti nelle piante e microrganismi. La capacità di defosforilare il fitato cambia tra le diverse specie vegetali e microbiche, a causa delle differenze nelle loro attività fitato-degradative intrinseche (Egli et al., 2002; Eeckhout & de Paepe, 1994) e proprietà enzimatiche (Konietzny & Greiner, 2002). Molte piante e semi esibiscono attività degradativa in un range di pH tra 3 e 10, con un'attività massima residua a valori di pH da 5 a 5.5 (Konietzny & Greiner, 2002). Paragonati ai legumi, i cereali esibiscono, generalmente, un'attività fitasica più alta a pH tra 5 e 5.5 (Egli et al., 2002; Eeckhout & de Paepe, 1994), laddove l'attività a pH 8.0 è più bassa che nei legumi.

Effetto dei vari processi sulle concentrazioni di mio-inositolo fosfato

Effetto del lavaggio

Il lavaggio è spesso usato come pretrattamento per facilitare la lavorazione di legumi e cereali. Può durare da 15 a 20 minuti, fino alle 12-16 ore. Poiché il fitato è solubile in acqua, una riduzione significativa del fitato si può avere eliminando l'acqua di lavaggio. In aggiunta, l'azione di fitasi endogene contribuisce alla riduzione di fitato. Il valore di temperatura e pH sembrano avere un effetto notevole sull'idrolisi enzimatica del fitato durante il lavaggio (Fredlund et al., 1997). Se lo step di lavaggio è portato avanti a temperature tra 45 e 65°C e il pH tra 5.0 e 6.0, che sono condizioni ottimali per la defosforilazione del fitato ad opera delle fitasi intrinseche della pianta, una percentuale significativa di fitato (26-100%) è enzimaticamente idrolizzata (Greiner & Konietzny, 1999; Fredlund et al., 1997).

Effetto dei trattamenti termici e della fermentazione

La fermentazione dei cibi raggruppa diversi processi microbici ed enzimatici alimentari, che permettono di ottenere un prodotto con caratteristiche ottimali come shelf-life prolungata, sicurezza, arricchimento nutrizionale, eliminazione di antinutrienti. Molti cereali, legumi e vegetali sono utilizzati nella preparazione di vari cibi fermentati.

Oggi, culture starter e condizioni controllate sono solitamente valutate nei processi di fermentazione. Il tipo di microrganismo, le condizioni di fermentazione usate e la quantità di fitato presente nella materia prima influisce molto sulla quantità di

fitato rimosso durante la fermentazione. Lieviti e batteri lattici sono, ad esempio, usati per produrre pane; la riduzione del fitato si verifica durante tutte le fasi del processo ed ovviamente dipende dal tipo di pane da preparare. La fitasi presente nella farina dei cereali è principalmente responsabile della defosforilazione del fitato durante la fermentazione del pane, laddove il contributo dell'attività fitasica microbica dei lieviti commerciali e batteri lattici è molto bassa o quasi inesistente (Turk et al., 1996; Leenhardt et al., 2005). In alcuni cibi fermentati indiani tradizionali quasi tutto l'acido fitico può essere idrolizzato, sebbene in molti cibi il 50% o meno del fitato rimanga (Reddy & Pierson, 1994).

Prodotti come tempeh, miso, koji derivano dalla fermentazione della soia con *Rhizopus oligosporus* e *Aspergillus oryzae*. Si è visto che entrambe le muffe producono fitasi sia intra che extracellulari (Wang et al., 1980; Fujita et al., 2003).

Diversi trattamenti termici, utilizzati nei tradizionali processi alimentari riducono il contenuto di fitato. La velocità con cui esso diminuisce dipende dalla temperatura, pH e la presenza di attivatori ed inibitori (Reddy et al., 1989). L'acido fitico diminuisce durante la bollitura a 100°C, ma la degradazione è maggiore in processi in cui sono attivate le fitasi (Viveros et al., 2000; Eeckhout & de Paepe, 1994).

Lease (1966) e deBoland et al. (1975), che studiarono l'effetto dell'autoclavaggio sul contenuto di fitato, mostrarono che la percentuale di fitato rimosso è bassa quando quest'ultimo è associato a proteine e/o cationi. Mosha et al. (1995) mostrarono che sia il blanching tradizionale che al microonde determinavano una riduzione significativa del fitato in prodotti vegetali. Utilizzando un blanching tradizionale per 10 min., attraverso l'HPLC si notò che i contenuti di fitato in

cavolo, rapa, patate dolci diminuivano da 1.01 a 0.27, 2.16 a 1.0 e da 0.36 a 0.12 mg/100 g peso fresco rispettivamente. Diminuzioni più basse si osservavano per tempi di blanching più brevi. Il blanching al microonde causava riduzioni dello stesso livello. Khail e Mansour (1995) trovarono la germinazione un mezzo più efficace per ridurre il contenuto di acido fitico nei fagioli (diminuzione 54%) piuttosto della cottura (31%) o in autoclave (< 41%), dati rilevati da Wheeler e Ferrel (1971).

Effetto della cottura

Poiché il fitato è resistente al calore, non si ha una riduzione significativa durante la cottura. Quindi, una defosforilazione considerevole del fitato durante la cottura si può avere solo non considerando l'acqua di cottura o l'attività enzimatica dovuta all'azione di fitasi vegetali intrinseche durante la prima parte della fase di cottura. Tempi prolungati a temperature elevate portano ad una progressiva inattivazione degli enzimi endogeni. Quindi, fornendo piante con fitasi termostabili o aggiungendo fitasi esogene termostabili si ha un miglioramento della defosforilazione del fitato durante la cottura. Durante la fermentazione del pane, ad esempio, il contenuto di acido fitico diminuisce sia a causa dell'azione delle fitasi presenti nella farina che delle alte temperature. L'attività fitasica del lievito commerciale non è significativa a queste condizioni (Tangkongchitr et al., 1981 e 1982; Snider & Liebman, 1992). Il fitato è idrolizzato durante tutti gli stadi della fermentazione (Tangkongchitr et al., 1981; Mc-Kenzie-Parnell & Davies, 1986). Diversamente poco fitato è idrolizzato in pani non lievitati, ad indicare che la

fermentazione è importante nella degradazione del fitato. Altri fattori contribuiscono alla degradazione del fitato negli impasti, come le dimensioni delle particelle dei cibi, pH, temperatura, contenuto di acqua e tempo di fermentazione. Il pH dell'impasto è stato visto come il fattore determinante principale (Fretzdorff e Brummer, 1992; Larsson & Sandberg, 1991). Infatti la solubilità dell'acido fitico chelato ai cationi dipende, oltre che dal pH, anche dalle quantità e tipo di cationi presenti (Cheryan, 1980). In alcune circostanze lo ione Ca^{2+} può giocare un ruolo importante nel prevenire la riduzione dell'acido fitico durante la cottura (Tangkongchitr et al., 1982) ed è stato dimostrato che l'aggiunta di latte inibisce l'idrolisi del fitato (Snider & Liebman, 1992; Cheryan, 1980; Turk & Sandberg, 1992). Diversamente, si è visto che il latte fermentato non inibisce la degradazione del fitato allo stesso modo (Turk & Sandberg, 1992). Possibili spiegazioni sono che l'acido lattico presente nel latte fermentato incrementa la solubilità del calcio-fitato, o che il pH più basso nell'impasto contenente latte fermentato è più vicino al pH ottimale della fitasi piuttosto che nell'impasto fatto con latte normale. Secondo Reddy e Pierson (1994) la riduzione del contenuto di acido fitico nei vari tipi di pane può variare dal 13 al 100%, con una diminuzione minore in pani non lievitati. Il contenuto di acido fitico nel pane di segale, ad esempio, può, a condizioni ottimali, ridursi quasi a zero (Fretzdorff & Brummer, 1992; Larsson & Sandberg, 1991). In pani invece contenenti avena Larsson e Sandberg (1991) riportarono una riduzione tra 44 e 62%, sebbene l'acidità era favorevole all'attività fitasica (pH 4.5).

Effetto della germinazione

La germinazione è un processo largamente usato nei legumi e cereali per aumentarne il valore nutrizionale attraverso la rottura di alcuni antinutrienti, come fitato ed inibitori proteasici. Il fitato è idrolizzato durante la germinazione attraverso le fitasi o l'azione contemporanea di fitasi e fosfatasi che non accettano il fitato come substrato per provvedere ai bisogni nutrizionali della pianta senza un accumulo di intermedi del mio-inositolo meno fosforilati. I livelli di fitato che determinano un forte incremento nell'assorbimento dei minerali potrebbero essere ottenuti dopo 6-10 giorni di germinazione. Poiché sono necessari periodi di tempo lunghi, questo approccio è utile per applicazioni casalinghe, ma non sembra essere un metodo industrialmente economico.

Aggiunta di fitasi durante i processi alimentari

L'aggiunta di fitasi potrebbe essere un'alternativa valida per ottimizzare la defosforilazione del fitato con enzimi già presenti nella materia prima. E' stata dimostrata l'efficacia della fitasi aggiunta nel ridurre il contenuto di fitato per i cereali così come per i legumi (Greiner & Konietzny, 1999), con una quasi completa degradazione del fitato. Il grado di idrolisi del fitato durante i processi è influenzato dalla materia prima usata, dal tipo di lavorazione, dall'origine della fitasi e dalla quantità di enzima aggiunto. Poiché la temperatura e il pH sono i principali fattori che influenzano l'attività enzimatica, caatteristiche favorevoli per l'enzima sono elevata capacità degradativa anche a temperatura ambiente, resistenza al calore accettabile, alta attività in un range di pH ampio. Le fitasi

potrebbero essere classificate in fitasi acide con un pH ottimale tra 3.5 e 6.0 ed alcaline tra 7.0 e 8.0. Fitasi alcaline sono state purificate da specie di *Bacillus* (Kerovuo et al., 1998; Kim et al., 1998), polline bianco (Jog et al., 2005) ed intestino di topo (Yang et al., 1991). A seconda dell'origine dell'enzima, la temperatura ottimale per l'idrolisi del fitato varia da 35 a 80°C. Generalmente, le fitasi vegetali hanno una massima attività a temperature più basse di quelle microbiche. L'attività specifica è uno dei fattori chiave per lo sviluppo commerciale di un'enzima in quanto ha un impatto sull'economicità dell'uso proposto. L'attività specifica di fitasi caratterizzate va da < 10 U/mg (polline di giglio, soia, mais, *Penicillium simplicissimum*) a > 1000 U/mg (*Candida krusei*, *Peniophora lycii*) a 37°C ed il loro pH ottimale.

Sebbene le fitasi microbiche siano più adatte per un'applicazione nei processi alimentari, fitasi di cereali e legumi sono un'alternativa a causa della loro più alta accettabilità da parte del consumatore e del loro potenziale allergenico basso.

Applicazione delle fitasi

Fino ad ora, le fitasi sono state principalmente usate come additivo per l'alimentazione animale nelle diete di maiali e pollame e a volte anche dei pesci. Numerosi studi animali hanno dimostrato l'efficacia di fitasi microbiche aggiunte (Stahl et al., 2000; Rodehutsord & Pfeffer, 1995). Infatti si è visto che fitasi aggiunte alle diete migliorano la biodisponibilità di rame e zinco nei maiali (Adeola et al., 1995) e pollame (Yi et al., 1996). Risultati simili sono stati riscontrati anche nei pesci. L'aggiunta di fitasi incrementa la concentrazione di

minerali come magnesio, fosforo, calcio, manganese e zinco nel plasma, ossa (Vielma et al., 1998). Inoltre, includendo adeguate quantità di fitasi nelle diete di animali, si riduce la necessità di aggiungere ortofosfato nell'alimentazione. Come risultato, l'ambiente è protetto dall'inquinamento con una riduzione dell'escrezione di fosfato fecale degli animali fino al 50%.

Per diversi anni Natuphos era l'unica fitasi commerciale prodotta utilizzata come additivo alimentare. La preparazione di quest'enzima ha un'autorizzazione nell'Unione Europea per poterlo utilizzare nell'alimentazione dei maiali ed è descritta come una 3-fitasi prodotta da *Aspergillus niger*. In seguito, l'enzima fu approvato come additivo in Turchia. La sua produzione su larga scala è basata sull'uso di un ceppo di *A. niger* trasformato con un gene fitasi di *A. niger var. ficuum* (Zhang et al., 2000). La fitasi può trovare diverse applicazioni: la prima nella produzione di alimenti funzionali e di mangimi degradando il fitato e la seconda nella preparazione di mio-inositolo fosfati da utilizzare per studi biochimici (Dvořáková, 1998), ma fino ad ora, nessuna fitasi di applicazione alimentare ha trovato sbocchi sul mercato. Miglioramenti tecnologici aggiungendo fitasi durante la trasformazione alimentare sono stati riscontrati durante il processo di produzione del pane (Haros et al., 2001), di isolati proteici vegetali (Wang et al., 1999; Fredrikson et al., 2001), e durante il frazionamento della crusca (Kvist et al., 2005).

Il motivo principale per cui il fitato viene degradato è che non è digeribile per animali monogastrici compreso l'uomo (Simell et al., 1989). Il fitato non degradato e parti di fosfato inorganico, passando attraverso il tratto intestinale sono escreti

all'esterno, causando seri problemi ambientali. Il più importante è la discarica di fosfati nelle acque, che man mano porta all'eutrofizzazione, specialmente in aree in cui c'è una produzione intensiva di bestiame. Inoltre, il fitato complessa ioni metallici multivalenti che vanno ad interferire sull'assimilazione di importanti minerali come ferro, zinco, calcio, magnesio, rame, con carenze nella dieta sia umana che animale. Oltretutto il fitato inibisce enzimi digestivi, quali α -amilasi, pepsina e tripsina, e rende le proteine più resistenti alla digestione proteolitica.

Applicazione biotecnologica delle fitasi nella nutrizione umana

Con l'aumento del consumo di fibre e proteine attraverso i cereali e legumi, si assume più fitato. I vegetariani che mangiano maggiormente prodotti di grano integrale e cereali estrusi, le persone anziane che hanno un consumo di alimenti con molti cereali non bilanciato, le persone che vivono in paesi in via di sviluppo che mangiano pane non lievitato e bambini che mangiano alimenti in polvere a base di soia, assumono un grande quantitativo di fitato (Simell et al. 1989). La degradazione dell'inositolo esa e penta fosfato è essenziale quindi per migliorare la biodisponibilità dei minerali (Sandberg et al., 1988). Ad esempio l'aggiunta di fitasi prodotta da *A. niger* alla farina, che contiene semola di grano, aumenta l'assorbimento di ferro nell'uomo (Sandberg et al., 1996). In alcuni processi tecnologici che subiscono i legumi, come la cottura, la germinazione, i trattamenti idrotermici, la fermentazione e la macerazione, il quantitativo di fitato viene ridotto notevolmente; è quindi utile sfruttare le fitasi per diminuire il contenuto dell'acido fitico. La fitasi degrada pienamente l'acido fitico durante il processo con rullo

compressore a secco in alimenti derivati da farina di riso, grano, mais, avena, sorgo e farina di soia. In cereali e cibi a base di legumi, il fitato inibisce l'assorbimento di ferro, causando un'alta prevalenza di carenza di ferro, ad esempio bambini di paesi sviluppati, donne in età fertile o vegetariani. Sandberg et al. (1999) mostrarono che l'IP₆ così come l'IP₅ avevano effetti inibitori sull'assorbimento del ferro. L'IP₃ e IP₄ non mostravano effetti così negativi da soli, ma se combinati con l'IP₅ o IP₆. Quindi si stabilì che per migliorare l'assorbimento del ferro in cereali e legumi, la degradazione degli inositolo fosfati doveva portare a forme meno fosforilate dell'IP₃.

Haros et al. (2001) investigarono la possibilità di usare fitasi nel processo di preparazione del pane. Diverse quantità di fitasi fungine furono aggiunte ai pani di farina di grano intero e si vide che la fitasi migliorava il processo. Lo scopo principale dell'attività era una fermentazione più breve senza intaccare il pH dell'impasto del pane. Si osservarono un aumento del volume del pane e un miglioramento della struttura della mollica.

Applicazione biotecnologica delle fitasi nella nutrizione animale

L'eccessivo fosforo della dieta animale viene escreto all'esterno e quindi finisce nel suolo insieme con il letame. A causa dell'incremento di bestiame in molte regioni, il letame è stato concimato a livelli che vanno oltre la necessità della pianta, determinando un accumulo di fosfato nel suolo (CAST, 2002). Questo potrebbe portare ad un'eutrofizzazione delle superfici acquatiche e a lungo termine rilasciare fosfato nella superficie marina. E' necessario quindi la degradazione del

mio-inositolo fosfato, che producendo mio-inositolo, importante fattore di crescita e minerali in tracce, questi diventano prontamente disponibili. Si migliora così la digeribilità ed anche il valore nutritivo dei mangimi e si abbassa il livello di fosforo escreto (Dvořáková, 1998). Esistono due modi per utilizzare le fitasi nei mangimi: il primo è sostituire il fosforo inorganico con la fitasi mentre il secondo, nonostante le condizioni di reazione (pH, temperatura, umidità, tempo di incubazione) non siano ottimali nello stomaco o intestino animale è il pre-trattamento dei mangimi. L'aggiunta di fitasi microbiche alle diete non ruminanti ha mostrato effetti anche su diversi minerali essenziali, come ad esempio l'aumento della disponibilità del calcio (Sebastian et al., 1998). Una maggiore biodisponibilità è stata rilevata anche per magnesio, zinco, rame, ferro e manganese. Gli effetti di fitasi microbiche su proteine ed aminoacidi possono essere spiegati dall'idrolisi dei complessi fitato-proteina e fitato-proteina-minerale in alimenti di origine vegetale (Ravindran et al., 1999). I complessi fitato-proteina si possono formare nello stomaco nel caso in cui il fitato non è stato idrolizzato dalle fitasi (Jongbloed et al., 1997). Dal momento che il fitato può legare l'amido e inibire l'amilasi (Deshpande & Cheryan, 1984), si può ipotizzare che l'attività fitasica incrementi l'utilizzo di energia negli animali monogastrici. L'Alko Co. (Finlandia), l>Alltech (USA) e BASF (USA) iniziarono la produzione in scala industriale delle fitasi vendute sotto il nome di Finase, Allzyme Phytase e Natuphos rispettivamente, utilizzate con successo nella mangimistica. La Finase venne aggiunta ai chicchi di soia nella dieta dei maiali, convertendo approssimativamente un terzo del fosforo non disponibile in una forma disponibile

(Dvořáková, 1998). Non furono fatti solo esperimenti con maiali ma anche con polli confermando la possibilità di sostituire l'aggiunta di fosforo inorganico con l'uso di fitasi microbiche in diete ricche in fitato negli animali monogastrici.

SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di ricercare ceppi microbici produttori di fitasi, da impiegare successivamente durante la fermentazione di impasti operata in scala di laboratorio, per evidenziarne l'effetto sulla solubilità di minerali nutrizionalmente importanti nella dieta (ferro, zinco e manganese).

MATERIALI E METODI

Screening dei ceppi per l'attività fitasica

Ceppi testati

Lo studio sull'attività fitasica è stato condotto testando 364 microrganismi, isolati da differenti ecosistemi. In particolare 161 ceppi di batteri lattici (LAB) isolati da sourdough, impasti per pizza, salami e feci di neonati; 36 ceppi di lieviti isolati da sourdough ed impasti per pizza; 35 ceppi di muffe isolate da pane; 68 ceppi di bacilli isolati da pane e 64 ceppi di azotofissatori isolati da suolo e compost ottenuto a partire da scarti agro-alimentari. Alcuni di questi ceppi sono stati precedentemente identificati attraverso metodi biochimici e molecolari (Coppola et al., 1996; Pepe et al., 2003; Pennacchia et al., 2004; Pepe et al., 2004).

Condizioni di crescita

I ceppi microbici erano previamente coltivati nei loro terreni di crescita ottimali: batteri lattici e leuconostocs in MRS broth (Oxoid); lattococchi ed enterococchi in M17 broth (Oxoid); lieviti e muffe in Malt broth (Oxoid); bacilli in Starch broth ed azotobatteri in LG broth modificato (Aquilanti et al., 2004). Tutti i microrganismi erano incubati a 28 o 30°C per 24-48 ore. Per gli azotobatteri il tempo di incubazione era prolungato, se necessario, fino ad una settimana.

Di seguito sono riportati le composizioni dei diversi substrati utilizzati:

MRS broth:	composizione g/l
Peptone	10,0
Estratto di carne	8,0
Estratto di lievito	4,0
Glucosio	20,0
Potassio fosfato monoacido	2,0
Sodio acetato. 3 H ₂ O	0,5
Tri-ammonio citrato	2,0
Magnesio solfato. 7 H ₂ O	0,2
Manganese solfato. 4 H ₂ O	0,05
Tween 80	1,0 ml
pH	6,2 ± 0,2

Malt broth:	composizione g/l
Estratto di malto	3,0
Estratto di lievito	3,0
Peptone	5,0
Glucosio	10,0
pH	5,5

Starch Broth:	composizione g/l
Estratto di carne	1,0
Estratto di lievito	2,0
Peptone	5,0
Cloruro di sodio	5,0
Amido	2,0
pH	7,4

M17 broth:	composizione g/l
Tryptone	5,0
Peptone di soia	5,0
Digerito di carne	5,0
Estratto di lievito	2,5
Acido ascorbico	2,5
Magnesio solfato	0,25
Glicerofosfato disodico	19,0
pH	6,9 ± 0,2

LG broth modificato:	composizione g/l
Glucosio	20,0
CaCl ₂	0,01
MgSO ₄	0,2
Na ₂ MoO ₄	0,002
FeCl ₃	0,01
CaCO ₃	1
Fitato di sodio	10
pH	6.8

Valutazione dell'attività fitasica

Screening dei ceppi produttori in substrato solido

Per rilevare l'attività fitasica in piastra si sfruttavano i metodi di Volfova et al. (1994) e Bae et al. (1999), a cui erano apportate alcune modifiche. I batteri lattici, lieviti, bacilli e muffe erano coltivati a 30°C per 24-48h in Chalmers brodo modificato senza rosso neutro e con l'1% di fitato di sodio. Dopo tale periodo di incubazione, 5 µl delle sospensioni microbiche erano spottati su Agar Chalmers modificato senza CaCO₃ e con l'1% di fitato di calcio (Pepe et al., 2001). Gli azotobatteri erano invece coltivati a 28°C per 48h in LG broth modificato. Successivamente 5 µl delle sospensioni microbiche erano spottati su LG agar modificato senza CaCO₃ e con l'1% di fitato di calcio.

Le piastre erano incubate a 30 e 28°C ed esaminate dopo 2 giorni di incubazione per l'eventuale formazione di aloni di chiarificazione attorno alle colonie, dovuti all'idrolisi dell'acido fitico.

Per eliminare i falsi positivi dovuti alla degradazione acida del fitato di calcio, le piastre erano lavate con acqua distillata e ricoperte per 2 volte, con una soluzione acquosa di cloruro di cobalto al 2% (p/v), lasciandola agire per 20 minuti a temperatura ambiente. In seguito, la soluzione era rimossa e le piastre esaminate per verificare la persistenza degli aloni di chiarificazione che indicavano l'effettiva attività fitasica. L'entità dell'attività fitasica era valutata misurando il diametro degli aloni (mm). L'attività fitasica era maggiormente evidente quando le piastre erano incubate per 3 giorni a temperatura ambiente (Pepe et al., 2004).

Chalmers brodo modificato:	composizione g/l
Glucosio	20,0
Peptone di soia	3,0
Estratto di carne	3,0
Estratto di lievito	3,0
Fitato di sodio	10,0
pH	6,8-7,0

LG-Agar modificato:	composizione g/l
Glucosio	20,0
CaCl ₂	0,01
MgSO ₄	0,2
Na ₂ MoO ₄	0,002
FeCl ₃	0,01
CaCO ₃	1
Fitato di sodio	10
Agar	15
pH	6.8

Agar-Chalmers modificato:	composizione g/l
Glucosio	20,0
Peptone di soia	3,0
Estratto di carne	3,0
Estratto di lievito	3,0
Fitato di calcio	10,0
Agar	15
pH	6,8-7,0

Valutazione dell'attività fitasica in substrato liquido

La produzione di fitasi era testata anche in brodo mettendo a punto un protocollo specifico che si basava su esperimenti già riportati in letteratura (De Angelis et al., 2003; Sreeramulu et al., 1996), apportando però delle modifiche.

Il saggio era effettuato sui ceppi che avevano mostrato un'attività fitasica più spinta in substrato solido ed era condotto combinando diversi fattori: substrato di crescita, temperature di crescita dei ceppi (30 e 37°C), temperature di reazione (37 e 44°C) e durata del saggio (45 minuti e 75 minuti).

Preliminarmente i ceppi erano inoculati in Chalmers brodo modificato con una percentuale massima di glucosio dell'1%, senza fitato di sodio e con un pH pari a 6.0. Dopo incubazione a 30°C per 24-48 ore, i ceppi erano nuovamente inoculati all'1%, in tubi da 20 ml contenenti:

- Chalmers-brodo con l'1% di glucosio;
- Chalmers-brodo con l'1% di glucosio e con fitato di sodio (5g/l);
- Chalmers-brodo con l'1% di glucosio e CaCl₂ (2%).

Successivamente erano incubati a 30 e 37°C, e ad intervalli di tempo regolari (t_0 , t_{12} , t_{24} e t_{50}), si prelevavano 3 ml di brodocoltura, di cui:

- 1 ml era sottoposto a conteggio diretto mediante camere di conta (Counting Chambers, profondità 0.02 mm, area 1/400 mm², Weber Scientific International LTD, England) o indiretto (dopo 24 e 50 ore di incubazione) mediante piastramento su Agar Chalmers modificato senza rosso neutro;
- 2 ml erano centrifugati a 14000 rpm per 10 minuti e il surnatante raccolto era utilizzato per il saggio di produzione in brodo.

Saggio di produzione delle fitasi

Il protocollo utilizzato per il saggio di produzione in brodo era il seguente:

- Aggiunta ad 1ml di surnatante colturale, di 600 µl di substrato di reazione contenente fitato di sodio 3 mM/l in una soluzione tampone di sodio acetato 0.2 M/l (pH 4) (figura 3A);
- Incubazione a 37 e 44°C in due tempi: 45 minuti e 75 minuti (figura 3B);
- Blocco della reazione con l'aggiunta di 750 µl di acido tricloroacetico (15%);
- Aggiunta di 750 µl di reagente colorato preparato miscelando giornalmente 4 ml di molibdato di ammonio all'1.5% (p/v), 1 ml di acido solforico al 5.5% (v/v) ed 1 ml di solfato ferroso al 2.7% (p/v) (figura 3C);
- Prelievo della miscela (2 ml) e centrifugazione a 14000 rpm per 20 minuti (figura 3D);
- Misurazione dell'assorbanza (D.O.) a 700 nm (figura 3E).

Un'unità di fitasi è definita come l'ammontare di enzima richiesto per liberare 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ di fosforo inorganico in condizioni standardizzate (Sreeramulu et al., 1996).

Un'unità di fitasi può anche essere definita come l'ammontare di enzima richiesto per liberare 1 nmol di fosfato al minuto in condizioni standardizzate (De Angelis et al., 2003).

La conversione delle D.O. in μmol di fosfato si effettuava mediante l'interpolazione dei valori di D.O. in una curva di taratura ottenuta mediante la misurazione di una soluzione standard di fosfato inorganico opportunamente diluita.

Attività fitasica durante una lavorazione sperimentale di impasti ottenuti con farina raffinata ed integrale

Ceppi scelti come componenti degli starter

Dallo screening in substrato solido e liquido erano selezionati alcuni ceppi di batteri lattici sia fitasi positivi che negativi da impiegare nella preparazione di impasti operata in scala di laboratorio, al fine di valutarne l'effetto sulla solubilità di alcuni minerali, nutrizionalmente fondamentali nelle diete alimentari (ferro, zinco, manganese).

Preparazione dell'inoculo

I ceppi batterici erano inoculati in tubi da 10 ml di MRS brodo ed incubati a 30°C overnight, mentre il lievito era inoculato in Malt Broth ed incubato a 30°C per 24

ore. Dopo incubazione, la crescita microbica era quantificata mediante l'uso di camere di conta. Le brodocolture erano poi centrifugate a 6500 rpm per 10 minuti; i pellet raccolti ed impiegati in quantità tale da realizzare nell'impasto finale una concentrazione cellulare pari a circa 5×10^7 UFC g^{-1} .

Preparazione degli impasti

Gli impasti erano preparati miscelando i seguenti ingredienti:

500g di farina di tipo 00 ed integrale

280 ml di acqua

lievito e batteri: circa 5×10^7 UFC/g di impasto

Tali ingredienti erano miscelati con l'impastatrice automatica Kitchenaid Mixer Professional K5SSK PM5 per 5 minuti ad una velocità media. Gli impasti erano costituiti nel modo seguente:

- impasto con farina bianca 00 o farina integrale aggiunto di uno starter fitasi positivo composto da:

Leuconostoc gelidum A16

Enterococcus faecium A86

Lactobacillus plantarum H5

Lactobacillus plantarum L3

- impasto con farina bianca 00 o farina integrale aggiunto di uno starter fitasi negativo costituito da:

Leuconostoc gelidum LM249

Lactobacillus plantarum L8

Lactobacillus plantarum H19

In entrambi gli impasti era aggiunto il lievito fitasi negativo *Saccharomyces cerevisiae* T22, al fine di garantirne la lievitazione.

Gli impasti ottenuti erano distribuiti in contenitori di vetro graduati da 600 ml ed incubati a 30°. L'aumento volumetrico degli impasti era monitorato nel tempo ed a diversi tempi di lievitazione (t_0 , al doppio del volume iniziale, t_6 e t_{24}) si prelevavano 25-30g di impasto da congelare e poi successivamente liofilizzare.

Gli impasti lievitati erano sottoposti al conteggio in piastra e caratterizzati da un punto di vista chimico attraverso la determinazione del pH ed acidità titolabile totale (ATT).

Determinazione del pH

5g di impasto diluiti con 25 ml di H₂O distillata erano omogeneizzati per 2 minuti in Stomacher. Il pH era misurato con un elettrodo combinato (AAAC, 1975).

Determinazione dell'acidità titolabile totale

6.25g di campione erano omogeneizzati con 25 ml di H₂O distillata calda (60°) in Stomacher. L'omogenato era poi versato in un cilindro graduato e portato a 62.5 ml con H₂O distillata. 25 ml di tale soluzione erano titolati con NaOH N/4, usando la fenoftaleina come indicatore di viraggio (Arbeitsgemeinschaft Getreideforschung, 1978).

Conteggi in piastra

A diversi intervalli di tempo (t_0 , al doppio del volume iniziale, t_6 , t_{24}) erano effettuati conteggi in piastra, per verificare l'andamento della carica batterica e del lievito T22 durante il processo di lievitazione.

In particolare si pesavano 10g dei campioni e diluivano con Ringer 1/4 normale (Oxoid). Successivamente si procedeva allo spatolamento delle diluizioni sospensioni su piastre di Agar Chalmers modificato (Vanos & Cox, 1986), che erano poi incubate a 30°C per 5-7 giorni, fino allo sviluppo delle colonie. Di seguito si riporta la composizione della soluzione di Ringer ¼ N:

Soluzione di Ringer ¼ N:	composizione g/l
Cloruro di sodio	9,0
Cloruro di potassio	0,42
Cloruro di calcio	0,24
Bicarbonato di sodio	2,0

Determinazione dei sali minerali mediante assorbimento atomico

25g di impasto erano posti in falcon da 50 ml e liofilizzati. Dopo la liofilizzazione si procedeva all'estrazione dei minerali liberi.

Estrazione dei minerali liberi

Il protocollo di estrazione prevedeva le seguenti fasi:

- solubilizzare 5g dell'impasto liofilizzato;
- aggiungere 100 ml di una soluzione di HCl 0.65M;

- omogeneizzare meccanicamente per 4 ore a temperatura ambiente per ottenere l'estratto (figura 4A).
- centrifugare a 5000 rpm per 10 minuti a 20°C (figura 4B);
- prelevare 10 ml di supernatante e diluire a 50 ml con acqua bidistillata;
- porre a contatto il supernatante diluito con 5 grammi di una resina a scambio ionico (AG1-X8);
- agitare per 1 ora;
- centrifugare a 5000 rpm per 10 minuti a 20 °C;
- raccogliere il surnatante.

Incenerimento degli impasti e delle farine dopo estrazione

L'incenerimento degli impasti e delle farine serviva a mineralizzare la sostanza organica non completamente disgregata dalla digestione acida, che in lettura all'assorbimento atomico poteva creare problemi.

A tale scopo, le soluzioni acide erano trasferite in capsule di porcellana, previamente condizionate con HNO_3 0.3M. Successivamente erano portate a secco su un fornello elettrico (figura 5A) e poi in muffola a 450°C per 2 ore (figura 5B) e poi ancora per un'ora dopo aggiunta di circa 1ml di HNO_3 concentrato. L'operazione si ripeteva fino all'ottenimento di ceneri bianche, indice della completa mineralizzazione della matrice vegetale. Al termine del processo di incenerimento, le ceneri bianche erano raccolte in matracci tarati e portate a volume con una soluzione acida al 3% di acido nitrico.

Letture allo spettrofotometro per assorbimento atomico (AAS)

La lettura all'assorbimento atomico era effettuata per valutare la concentrazione libera di minerali cioè quella potenzialmente assorbibile dal nostro organismo. Tra i minerali considerati nutrizionalmente importanti nella dieta, erano scelti lo zinco, il ferro e il manganese.

Prima di leggere i campioni, erano preparati gli standard per ciascun minerale in esame e disegnata la retta di taratura. Circa 5 ml di campione erano versati nelle vials e poste nello spettrofotometro per assorbimento atomico Shimadzu – 6800 (figura 6). Oltre ai campioni, era letto anche un bianco, costituito dalla soluzione acida al 3% di acido nitrico che aveva subito il processo di incenerimento, al fine di eliminare il quantitativo dei minerali non provenienti dai campioni ma dai materiali utilizzati.

RISULTATI E DISCUSSIONI

Attività fitasica in substrato solido

Per selezionare ceppi in grado di idrolizzare il fitato, erano utilizzati i metodi in piastra di Volfova et al. (1994) e Bae et al. (1999), a cui erano apportate delle modifiche. Quindi era prima osservata la formazione di aloni di chiarificazione attorno alle colonie dovuti all'utilizzo del fitato di calcio da parte dei microrganismi, per poi confermare che gli aloni fossero realmente dovuti all'attività fitasica e non a quella acidificante. Infatti, inizialmente circa il 45% dei ceppi testati erano capaci di crescere su substrato contenente fitato di calcio,

mentre dopo aggiunta della soluzione di cloruro di cobalto e 3 giorni di incubazione a temperatura ambiente, la percentuale dei ceppi positivi si riduceva al 16%. In particolare, tra i ceppi di *Bacillus* testati, soltanto il 10% mostrava aloni di chiarificazione, con un diametro variabile da un minimo di 5 mm (ceppo S14) ad un massimo di 17 mm (ceppo RopeTT), entrambi appartenenti alla specie *Bacillus subtilis* (tabella 6).

Come mostrato in tabella 7, 6 ceppi appartenenti al genere *Enterococcus* isolati da feci di neonati erano fitasi positivi, con aloni di chiarificazione di diametro pari a 7-8 mm.

In figura 8 sono mostrati gli aloni di chiarificazione dovuti all'attività fitasica esibita da alcuni ceppi di enterococchi prima (figura 8A) e dopo trattamento con cloruro di cobalto (figura 8B). L'attività fitasica era più spinta in alcuni ceppi rispetto ad altri, come dimostrato dal diametro degli aloni di chiarificazione in piastra.

Dei ceppi probiotici isolati da salami soltanto il 9% risultava positivo; in particolare il ceppo EL7 appartenente alla specie *Lb. paracasei* sp. *paracasei* (6 mm) (tabella 7).

Come mostrato in tabella 8, tra i ceppi di batteri lattici isolati da sourdough ed impasti per pizza, il 21% risultava positivo con aloni di chiarificazione di diametro minimo di 3 mm, dovuti all'attività fitasica dei ceppi A27 (*Ln. mesenteroides*) e A12 (*Weissella paramesenteroides*) fino ad un valore massimo di 13 mm, riscontrato per il ceppo T211 appartenente alla specie *Lb. plantarum*.

Circa l'8% dei lieviti, isolati da sourdough ed impasti per pizza, era fitasi positivo con aloni di chiarificazione di diametro compreso tra 5 ed 8 mm, dovuti all'attività fitasica esibita dai ceppi R3 e R4, entrambi appartenenti alla specie *Candida pelliculosa* (tabella 8).

Tra i ceppi potenziali azotofissatori isolati da suolo, il 14% risultava positivo con aloni di diametro variabile da un minimo di 3 mm (ceppo 46) ad un massimo di 12 mm (ceppo 74) (tabella 9). Nessun ceppo isolato da compost mostrava attività fitasica in piastra.

Come mostrato in tabella 10, tra le muffe isolate da pane, il 14% mostrava positività con aloni di diametro minimo di 4 mm, mostrati dal ceppo 23 appartenente alle specie *Aspergillus flavus*, fino ad un valore massimo di 10 mm rilevato per i ceppi 16 e 39, appartenenti alle specie *Aspergillus flavus* ed *Aspergillus niger* rispettivamente.

Il meccanismo coinvolto nella formazione degli aloni di chiarificazione dopo trattamento con cloruro di cobalto non è ancora ben definito, ma si può ipotizzare che la capacità chelante del fitato nei confronti del cobalto, come di altri metalli, è pH dipendente (Maddaiah et al., 1964; Vohra et al., 1965), per cui in presenza di acidità si forma il complesso acido fitico-metallo con riformazione di torbidità del mezzo in corrispondenza dell'alone. Quindi, la persistenza dell'alone di chiarificazione dopo trattamento con cloruro di cobalto può essere dovuta solo ad un'effettiva attività enzimatica della fitasi e non ad acidità (Bae et al., 1999).

La fitasi è un'enzima che si ritrova nelle piante, in alcuni tessuti animali ed è prodotta da diverse specie microbiche (Konietzny & Greiner, 2002; Kerovuo,

2000). L'importanza di ricercare tale enzima è legata al fatto che catalizza l'idrolisi dell'acido fitico a mio-inositolo ed acido ortofosforico, rendendo disponibili cationi bivalenti e trivalenti (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}), nutrizionalmente importanti.

Attività fitasica in mezzo liquido

I ceppi che avevano mostrato un'attività fitasica più spinta, in termini di aloni di chiarificazione in substrato solido, erano testati per la produzione di fitasi in mezzo liquido. Il saggio veniva eseguito considerando diverse variabili: substrato di crescita dei microrganismi, temperatura di crescita dei microrganismi, temperatura di reazione e tempo di reazione.

Dai risultati ottenuti nei diversi esperimenti, si era giunti alla conclusione che l'attività fitasica in mezzo liquido doveva essere valutata in tutti e tre i substrati, con una temperatura di crescita dei microrganismi di 37°C , una temperatura di reazione di 37°C ed un tempo di reazione di 75 minuti. Con la metodologia applicata si verificava il quantitativo di fosfato inorganico liberato interpolando i valori di densità ottica allo spettrofotometro (D.O.) con una curva di taratura ottenuta con soluzioni di fosfato inorganico a differente concentrazione (figura 9).

Come si evince dalla tabella 11, tra i ceppi testati 8 esibivano attività fitasica in almeno uno dei tre mezzi di coltura considerati. In particolare, i ceppi A16 ed H5 liberavano una quantità di fosfato inorganico, in Chalmers brodo, pari a 47.49 e 53.42 μmol dopo 12 ore di incubazione a 37°C (0.79 e 0.89 U/ml di fitasi rispettivamente).

In Chalmers brodo con aggiunta di fitato di sodio invece, erano fitasi positivi i ceppi A86 e T211, liberando fosfato inorganico in quantità pari a 55.40 e 39.57 μmol (0.92 e 0.66 U/ml di fitasi rispettivamente). In Chalmers brodo con aggiunta di CaCl_2 soltanto il ceppo H10 mostrava attività, liberando una quantità di fosfato inorganico di 45.50 μmol (0.75 U/ml di fitasi).

L'attività fitasica extracellulare è abbastanza diffusa tra i bacilli e le muffe. Studi fatti da Jongbloed et al. (1992) hanno evidenziato la possibilità di utilizzare la fitasi prodotta da *Aspergillus ficuum* come additivo nell'alimentazione animale, incrementando quindi la biodisponibilità di fosfato e riducendo l'inquinamento in aree rurali di intenso allevamento di bestiame.

Diversamente da bacilli e muffe, non è semplice trovare ceppi di batteri lattici capaci di produrre fitasi extracellularmente. 19 ceppi di batteri lattici appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Streptococcus* sono stati screenati da Sreeramulu et al. (1996) per la produzione di fitasi extracellulare. Nove di questi ceppi erano fitasi positivi, in particolare il ceppo *Lactobacillus amylovorus* B4552 esibiva la massima attività. Batteri lattici utilizzati nei prodotti a base di latte come ceppi di *Lactobacillus* (*Lb.*) *acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. lactis*, *Lb. delbrueckii* e *Streptococcus* sp. producono fitasi in concentrazioni molto basse, mentre *Lactobacillus amylovorus* e *plantarum*, presenti in diversi ecosistemi microbici di origine vegetale, sembrano avere un'attività enzimatica elevata. In un ceppo di *Lactobacillus plantarum*, Zamudio et al. (2001) hanno caratterizzato un'attività acido-fosfatasica non specifica con la formazione di composti monofosforilati (acetil-fosfato).

Diversi studi hanno evidenziato un'attività fitasica extracellulare batterica molto bassa (Zamudio et al., 2001), mentre in altri da uno screening preliminare di 12 specie di batteri lattici da sourdough, si è visto che la produzione di fitasi era soltanto intracellulare (De Angelis et al., 2003).

Per quanto riguarda i conteggi microbici, come mostrato in tabella 12, i ceppi A86 che A16 crescevano meglio nei substrati in cui mostravano una maggiore attività fitasica, in termini di U/ml; in particolare A86 in Chalmers brodo con aggiunta di fitato di sodio raggiungeva una concentrazione di 5.6×10^8 UFC/g, di molto superiore rispetto agli altri due substrati, in cui la carica variava da 1.5 ad 1.8×10^8 UFC/g. Allo stesso modo A16 in Chalmers brodo raggiungeva una concentrazione di 4.06×10^8 UFC/g rispetto alle cariche che si rilevavano negli altri due substrati (da 1.8 a 2.8×10^8 UFC/g) (tabella 12).

Valutazione preliminare di impasti inoculati con starter microbici e determinazione dei minerali liberi mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico (AAS).

Le prove di lievitazione erano realizzate standardizzando tutti i parametri tecnologici (dough yield, acqua, quantità di inoculo microbico, temperatura e condizioni di processo), tranne la tipologia di starter microbico ed il tipo di farina utilizzata. Gli impasti erano incubati a 30°C e la concentrazione microbica realizzata nell'impasto era di circa 10^7 UFC/g, sia di lievito che di batteri. Sulla base dei conteggi microbici e delle attività fitasiche sia in mezzo liquido che solido erano scelti i ceppi batterici A86, A16, H5 ed L3, da utilizzare come starter fitasi

positivo nella preparazione degli impasti. Lo starter fitasi negativo invece era costituito da ceppi che non avevano dato attività (LM249, L8 e H19).

Il lievito (*Saccharomyces cerevisiae* T22) era presente in entrambe le lavorazioni in quanto capace di determinare un aumento volumetrico dell'impasto in tempi piuttosto brevi, anche se c'era una differenza sostanziale tra i diversi impasti nel raggiungere il doppio del volume iniziale, a seconda del tipo di farina utilizzata. Per gli impasti preparati con farina bianca occorrevano circa 3 ore e 30 minuti per raddoppiare di volume, mentre per la farina integrale 4 ore e 30 minuti. Il processo di lievitazione è essenzialmente condizionato dall'attività dei lieviti presenti nell'impasto, mentre gran parte delle caratteristiche organolettiche del prodotto finito sono influenzate dal metabolismo di altri gruppi microbici, soprattutto batteri lattici. Questi ultimi sono considerati responsabili di un ruolo fondamentale, influenzando l'elasticità, l'acidità e l'aroma dei prodotti da forno (Iorizzo et al., 1995).

Valutazione del pH ed acidità titolabile totale negli impasti.

Poiché le proprietà chelanti dell'acido fitico sono pH-dipendenti, nelle figure 10 e 11 sono riportati i valori di pH ed acidità titolabile totale (ATT) monitorati durante la fermentazione degli impasti, operata in scala di laboratorio.

Il pH, in primo luogo, condiziona direttamente le attività degli enzimi costitutivi della farina e di quelli apportati dai microrganismi; in secondo luogo, influenza la capacità di sviluppo e quindi l'evoluzione e la permanenza della microflora stessa.

Immediatamente dopo l'aggiunta dell'inoculo (t_0) gli impasti avevano un pH sub-basico, con valori simili in tutte e due le tipologie di starter e di farina utilizzati (figura 10 e 11). Al tempo di raddoppio volumetrico si notava che il pH rimaneva pressochè costante, ad eccezione dell'impasto preparato con farina integrale e lo starter fitasi negativo, in cui il pH si abbassava da 7.39 a 6.49 (figura 11). A partire dal tempo di raddoppio volumetrico iniziava la vera e propria azione acidificante negli impasti ad opera degli starter fitasi positivo e negativo. Infatti dopo 6 ore di incubazione si osservava una diminuzione del pH di circa 3 punti (4.90 negli impasti con farina integrale e 4.20-4.75 negli impasti con farina bianca). Dopo 24 ore dall'inoculo si raggiungevano valori di pH simili sia nel caso di impasti aggiunti dello starter fitasi positivo che fitasi negativo; in particolare nella farina bianca si raggiungeva un pH di 3.76 (starter fitasi positivo) e di 3.80 (starter fitasi negativo) (figura 10), mentre nella farina integrale un pH di 4.10 (starter fitasi positivo) e 4.06 (starter fitasi negativo) (figura 11).

I valori di acidità titolabile totale risultavano più alti dopo 24 ore negli impasti preparati con farina integrale: 10.8 (starter fitasi positivo) e 10.4 (starter fitasi negativo) (figura 11), mentre nella farina bianca si rilevavano valori di acidità più bassi: 2.4 (starter fitasi positivo) e 4.0 (starter fitasi negativo) (figura 10).

Generalmente un pH basso favorisce la degradazione dell'acido fitico; secondo Fretzdorff e Brummer (1992), il pH ottimale per l'idrolisi del fitato in impasti di grano e segale è di 4.5. L'uso di sourdough o "sponge" acidificati potrebbero quindi migliorare la disponibilità dei minerali degradando l'acido fitico. In un recente lavoro Lopez et al. (2001) hanno paragonato gli effetti del lievito,

sourdough e di entrambi sulla degradazione dell'acido fitico e valutato le conseguenze dell'idrolisi dell'acido fitico sulla solubilità del fosforo e magnesio durante la produzione di pane. Vari fattori contribuiscono alla degradazione del fitato nel pane, quali temperatura, pH, acqua e tempo di fermentazione (Nayini & Markakis, 1983). Anche diversi additivi possono influenzare il grado di idrolisi del fitato alterando il pH dell'impasto o determinando la precipitazione di complessi di fitato insolubili (Snider & Liebman, 1992; Turk et al., 1996). L'aggiunta del lievito nel sourdough sembra non avere influenza sulla degradazione del fitato, mentre nello stesso impasto con lievito e batteri lattici, la fermentazione è determinante nel ridurre la quantità di acido fitico presente. Inoltre i risultati mostrano che la fermentazione con farina di grano inoculata con lo starter *Lactobacillus plantarum* S18 e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* S50 migliora l'idrolisi dell'acido fitico. I cambiamenti nel pH e ATT mostrano che solo la fermentazione con sourdough riduce il pH. L'abbassamento di pH indotto dai batteri lattici può essere il pH ottimale per le fitasi endogene. Anche se le fitasi microbiche sembrano essere meno sensibili al pH ed attive in un range di pH abbastanza ampio rispetto alle fitasi endogene (Nayini & Markakis, 1986), la riduzione dell'acido fitico osservata nel pane fatto con sourdough sembra essere dovuta ad effetti sinergici di entrambe le fitasi. Il basso contenuto di calcio del pane, inoltre può contribuire alle condizioni ottimali delle fitasi. L'attività enzimatica è più efficiente quando l'acido fitico è in forma libera, non legato a cationi bivalenti. La formazione di complessi è favorita dal legame del calcio all'acido fitico (Wise, 1983). Quindi, la perdita di

calcio aggiunto nel pane permette una degradazione dell'acido fitico e la disponibilità del fosforo-fitato così come la solubilità dei minerali.

Valutazione dei minerali liberi letti all'ASS nei vari impasti.

In questo lavoro erano valutati gli effetti di uno starter fitasi positivo e negativo sulla solubilità di alcuni minerali essenziali (ferro, zinco e manganese) durante la fermentazione di impasti preparati con farina bianca ed integrale, mediante spettroscopia per assorbimento atomico. La metodologia di estrazione dei minerali liberi dagli impasti è stata quella utilizzata da Lopez et al. (2001), a cui erano apportate delle variazioni.

Come mostrato in figura 12, dopo l'aggiunta dello starter fitasi positivo (phy +) fino a quando l'impasto non raggiungeva il doppio del volume iniziale (t_3), la concentrazione del ferro si manteneva costante. Tra le 3 e 6 ore di fermentazione la solubilità del minerale diminuiva per poi aumentare verso la fine (t_{24}). Nell'impasto inoculato con lo starter fitasi negativo (phy -) invece, dopo 3 ore di fermentazione la solubilità del minerale diminuiva per poi aumentare dopo 6 ore di incubazione e mantenersi più o meno costante fino alla fine della fermentazione.

Per quanto riguarda il manganese, nella farina bianca era presente in quantità pari a 4.90 mg/kg, mentre nell'impasto tal quale in concentrazione pari a 7.91 mg/kg. Come mostrato in figura 13, le concentrazioni di manganese libero nei vari impasti immediatamente dopo la loro preparazione erano di 8.7 mg/kg (impasto con phy +) e 6.6 mg/kg (impasto con phy -). Al raggiungimento del doppio del volume (t_3) fino a t_6 nei due impasti la concentrazione di manganese libero diminuiva,

evidenziando probabilmente un ritorno dell'azione chelante dell'acido fitico (figura 13). Dopo 24 ore l'impasto con lo starter fitasi positivo esibiva una concentrazione di manganese di 8.1 mg/kg, mentre per lo starter fitasi negativo la concentrazione era di 7.0 mg/Kg.

Il contenuto di zinco nella farina bianca era di 11.87 mg/kg, mentre nell'impasto tal quale era di 18.26 mg/kg. Come mostrato in figura 14, è possibile notare che all'inizio della fermentazione non c'erano grandi differenze tra i due impasti. Dopo 3 ore fino alla fine della fermentazione, la solubilità dello zinco diminuiva nell'impasto con lo starter phy -, mentre dalle 6 alle 24 ore aumentava notevolmente nell'impasto con lo starter phy +. La percentuale di zinco libero a t_{24} era di 90% e 60% per gli starter phy + e phy - rispettivamente.

Diversamente da quanto sviluppato in questo lavoro di tesi, in letteratura molti studi valutano la capacità di starter fitasici di ridurre i livelli di acido fitico e quindi incrementare la solubilità dei minerali. Infatti Lopez et al. (2000) mostrarono che in un mezzo contenente farina bianca dopo 2 ore di incubazione a 30°C, alcuni ceppi di batteri lattici determinavano un forte rilascio di fosforo ed una degradazione significativa dell'acido fitico. Nessuna differenza si osservava nel grado di idrolisi dell'acido fitico tra i ceppi inoculati. Lopez et al. (2000) inoltre, osservarono che dopo 9 ore di incubazione quasi tutto l'acido fitico presente nel mezzo era degradato dal ceppo 38 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. La degradazione dell'acido fitico così come l'acidificazione portava ad una maggiore solubilità del calcio e magnesio.

Un altro studio legato ai batteri lattici isolati da sourdough mostrava l'idrolisi del fitato ad opera delle specie *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* in un mezzo contenente farina bianca (Lopez et al., 2000). Non c'erano grandi differenze nel grado di idrolisi dell'acido fitico, suggerendo quindi che gli enzimi erano simili tra i diversi batteri.

I microrganismi coinvolti nella fermentazione naturale dei cereali, come nei sourdough, sono essenzialmente la microflora presente sui semi. Questi giocano un doppio ruolo: acidificare e contribuire all'aroma del prodotto. Durante il processo di fermentazione ci sono 4 generi di batteri lattici che prevalgono: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactococcus*. L'acido lattico prodotto abbassa il pH del prodotto da 6.5-7.0 a 5.0. Quindi, la fermentazione determina condizioni di pH adatte per la degradazione del fitato. Svanberg et al. (1993) trovarono che la fermentazione lattica del mais o sorgo portava ad una maggiore disponibilità del ferro nella dieta. Il processo di fermentazione è considerato un fattore positivo sull'assorbimento del ferro, con la formazione di acidi organici.

Quindi, poichè i batteri lattici dei prodotti lievitati determinano acidificazione che attiva le fitasi endogene della farina, responsabili a loro volta della degradazione dell'acido fitico, la biodisponibilità dei minerali nei prodotti cerealicoli fermentati potrebbe essere maggiore rispetto a prodotti non lievitati.

Nel caso degli impasti preparati con farina integrale, per quanto riguarda il ferro la concentrazione rilevata era di 40.48 mg/kg e di 46.45 mg/kg, nella farina ed impasto tal quali rispettivamente. Come mostrato in figura 15, si evidenziava fortemente l'attività fitasica dello starter phy + rispetto al phy -. All'inizio della

fermentazione la concentrazione di ferro diminuiva abbastanza rapidamente, mentre tra t_3 e t_6 aumentava significativamente con lo starter phy +, fino alla fine della fermentazione (t_{24}). La concentrazione finale di ferro libero era di 45.6 mg/kg (phy +) e 19.4 mg/kg (phy-), con percentuali di ferro libero di 98% e 42% rispettivamente. Ancora una volta si evidenziava l'azione della fitasi prodotta dallo starter phy +. Sia l'impasto inoculato con phy + che con phy - , alla fine della fermentazione avevano un valore simile di pH pari a 4.10 e 4.06 rispettivamente. Con lo stesso potere acidificante, nell'impasto inoculato con phy + il ferro era quasi totalmente (98%) libero grazie all'azione dello starter microbico.

Nella farina integrale la concentrazione di manganese rilevato era di 30.84 mg/kg, mentre nell'impasto tal quale era di 35.60 mg/kg. Come mostrato in figura 16 le concentrazioni di manganese libero dopo l'aggiunta dell'inoculo erano di 35.2 mg/kg e 32.0 mg/kg in phy + e phy - rispettivamente. Quando l'impasto raggiungeva il doppio del volume iniziale si osservava una notevole diminuzione della concentrazione di manganese negli impasti inoculati con gli starter phy + (16.8 mg/kg) e phy - (5.0 mg/kg). Un'ulteriore diminuzione di concentrazione per tutte e due le tipologie di impasto si verificava a t_6 : phy + (14.6mg/kg) e phy - (3.4 mg/kg). A t_{24} , eccetto per il phy -, che aveva un valore di concentrazione di 7.0 mg/kg, la solubilità del manganese aumentava notevolmente nell'impasto con lo starter phy + (40.9 mg/Kg). In definitiva l'impasto con phy + rilasciava una concentrazione di manganese libero (40.9 mg/kg) più alta rispetto all'altro.

Per lo zinco, nella farina integrale la concentrazione rilevata era di 24.26 mg/kg, mentre nell'impasto tal quale era di 25.20 mg/kg. Come mostrato in figura 17 le

concentrazioni di zinco libero a t_0 erano di 33.2 mg/Kg e 31.2 mg/Kg in phy + e phy - rispettivamente. A t_3 le concentrazioni diminuivano: 16.0 mg/kg per phy + e 5.2 mg/kg per phy -. A t_6 la concentrazione di zinco si manteneva piuttosto costante in phy + ed aumentava in phy -. Alla fine della fermentazione la concentrazione di zinco libero aumentava leggermente in phy +, mentre in phy - diminuiva. Le percentuali di zinco libero a t_{24} erano di 65% (phy +) e 40% (phy -). Anche in questo caso lo starter phy + esibiva un'attività fitasica più forte, con una percentuale di zinco libero maggiore.

Dai dati ottenuti si evidenziava l'attività fitasica degli starter microbici durante la fermentazione degli impasti preparati sia con farina raffinata che integrale. Il consumo di cereali e legumi si sta sempre più diffondendo, proprio per gli effetti benefici che determinano. Nutrizionalmente sono fonte di carboidrati, proteine, fibre, vitamine e minerali. Recenti ricerche epidemiologiche hanno evidenziato un ruolo protettivo, specialmente nel caso di cereali integrali, contro diverse malattie occidentali come l'obesità, il diabete o malattie cardiovascolari (Jacobs et al., 1998; Liu et al., 2000; Pereira et al., 2002). Le interazioni però che si creano tra i minerali e l'acido fitico presente ne limitano il valore nutrizionale, in quanto i minerali essenziali non possono essere assorbiti dall'organismo umano. La degradazione dell'acido fitico assume quindi un'importante valenza nutrizionale, poiché la rimozione dei gruppi fosfato dall'anello di inositolo determina una minore forza di fissazione del fitato nei confronti dei minerali, aumentandone la solubilità e quindi la biodisponibilità (Sandberg & Andlid, 2002).

I minerali sono importanti in quanto coinvolti nell'attivazione di enzimi intra ed extracellulari, nella regolazione di livelli di pH critici nei fluidi corporei e nell'equilibrio osmotico tra la cellula e l'ambiente circostante. Una carenza di un qualsiasi minerale essenziale può determinare disordini metabolici gravi e compromettere la salute dell'organismo.

Il ferro è un micronutriente essenziale per quasi tutti gli organismi, in quanto, esistendo in due stati redox (Fe^{2+} / Fe^{3+}), può agire come molecola catalitica in numerose reazioni biochimiche (Minihane & Rimbach, 2002). Anche il manganese è implicato nell'attivazione di numerosi enzimi in vitro; inoltre è costituente di alcuni metalloenzimi (arginasi, piruvato carbossilasi, glutamina sintetasi e superossido dismutasi mitocondriale) (Hurley & Keen, 1987; Keen, 1990). Lo zinco invece svolge attività antiossidante, prevenendo la perossidazione lipidica e riducendo la formazione di radicali liberi (Bray & Bettiger, 1990). È necessario per la formazione di ossa e muscoli e può, in caso di carenza, diventare un nutriente limitante per tale sintesi.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

La fitasi è un'enzima che si ritrova nelle piante, in alcuni tessuti animali ed è prodotta da diverse specie microbiche (Konietzny & Greiner, 2002; Kerovuo, 2000). Le fitasi assumono un ruolo importante, sia perché degradano il fitato nel corso della preparazione degli alimenti, che per la sua idrolisi nel tratto gastrointestinale, che porta alla formazione di mio-inositolo ed acido ortofosforico.

Tale degradazione rende quindi biodisponibili cationi bivalenti e trivalenti (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}), nutrizionalmente importanti.

Nella prima parte di questo lavoro di tesi si è cercato di ottenere in vitro ceppi microbici produttori di fitasi, isolati da differenti ecosistemi.

Successivamente si è messo a punto un metodo di separazione della frazione insolubile degli impasti, costituita dai fitati legati ai minerali e sono state studiate le capacità pronutrizionali dei ceppi testati, ricercando una metodologia in grado di evidenziarne l'effetto sulla solubilità di minerali nutrizionalmente importanti nella dieta, durante la fermentazione di impasti operata in scala di laboratorio.

La possibilità quindi di ottenere alimenti aggiunti di starter microbici fitasi positivi è una valida alternativa soprattutto in paesi in cui le diete sono principalmente a base di cereali e legumi.

Ricerche future sono necessarie per utilizzare questi ceppi come colture starter pronutrizionali per la produzione di nuovi prodotti da forno. Inoltre, studi sono in corso per caratterizzare, a livello biochimico e molecolare, le fitasi prodotte dai ceppi selezionati.

BIBLIOGRAFIA

- AAAC. (1975). Cereal Laboratory Methods 44-15A. Am. activity. Assoc. Cereal Chem. Inc., St. Paul, MN, 39, 17-22.
- Adeola, O. & Sands, J.S. (2003). Does supplemental dietary microbial phytase improve amino acid utilization? A perspective that it does not. *J. Anim. Sci.* **81**, E78-E85.
- Aggett, P.J. (1989a). Severe zinc deficiency. In: Mills CF (ed.) Zinc in human biology, Springer Verlag, London, pp. 259-279.
- Agte, V., Chiplonkar, S., Joshi, N. & Paknikar, K. (1994). Apparent absorption of copper and zinc from composite vegetarian diets in young Indian men. *Ann. Nutr. Metab.* **38**, 13-19.
- Anderson, R.J. (1914 a). *J. Biol. Chem.* **17**, 141-150.
- Anderson, R.J. (1914 b). *J. Biol. Chem.* **17**, 151-163.
- Anderson, R.J. (1914 c). *J. Biol. Chem.* **17**, 165-170.
- Anderson, R.J. (1914 d). *J. Biol. Chem.* **17**, 171-190.
- Andon, M.B., Kanerva, R.L., Schulte, M.C. & Smith, K.T. (1993). Effect of age, calcium source, and radiolabeling method on whole body ⁴⁷Ca retention in the rat. *American Journal of Physiology* **265**, E554-E558.
- Anonimo. (1988). Manganese deficiency in humans: fact or fiction? *Nutr. Rev.* **46**, 348-52.
- Anonimo. (1989). Does zinc supplementation improve growth in children who fail to thrive? *Nutr. Rev.* **47**, 356-358.
- Aquilanti, L., Favilli, F. & Clementi, F. (2004). Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biology & Biochemistry* **36**, 1475-1483.
- ARBEITSGEMEINSCHAFT GETREIDEFORSCHUNG. (1978). Standard-Methoden für Getreide Mehl und Brot, Aufl.-Detmold, Schafer.
- Bae, H.D., Yanke, L.J., Cheng, K.J. & Selinger, L.B. (1999). A novel staining method for detecting phytase activity. *Journal of Microbiology Methods* **39**, 17-22.

- Bales, C.W., Disilvestro, R.A. et al. (1994). Marginal zinc deficiency in older adults: responsiveness on zinc status indicators. *J. Am. Coll. Nutr.*, **13**, 455-62.
- Beal, L. & Mehta, T. (1985). Zinc and phytate distribution in peas. Influence of heat treatment, germination, pH, substrate, and phosphorus on pea phytate and phytase. *Journal of Food Science* **50**, 96-100.
- Beisel, W.R. (1982). Single nutrients and immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* **35**, 417-68.
- Bianchetti, R. & Sartirana, M. L. (1967). The mechanism of the repression by inorganic phosphate of phytase synthesis in the germinating wheat embryo. *Biochimica et Biophysica Acta*. **145**, 485-490.
- Bjorck, I.M. & Nyman, M.E. (1987). In vitro effects of phytic acid and polyphenols on starch digestion and fiber degradation. *Journal of Food Science* **52**, 1588-1594.
- Bjorn-Rasmussen, E., Hallberg, L., Isaksson, B. & Arvidsson, B. (1974). Food iron absorption in man. Application of the two-pool extrinsic tag method to measure heme and nonheme iron absorption from the whole diet. *J.Clin.Invest.* **52**, 247-55.
- Blank, G. E., Pletcher, J. & Sax, M. (1971). The structure of mio-inositol hexaphosphate, dodecasodium salt octahydrate: a single crystal x-ray analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 319-325.
- Bloemberg, G.V. & Lugtenberg, B.J.J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 343-350.
- Bray, T.M. & Bettiger, W.J. (1990). The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radicals in Biology and Medicine* **8**, 281-92.
- Cappelloni, M., Adorisio, S., Saba, A. & Turrini, A. (1992). *Ricostruzione delle diete di riferimento*, Rapporto del Sottoprogetto 4 RAISA C.N.R., Volterra, Vol.II, p. 1079.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology). (2002). Animal diet modification to decrease the potential for nitrogen and phosphorus pollution. *Issue Paper* **21**, 1-16.
- Cheryan, M. (1980). Phytic acid interactions in food systems. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 297-335.

- Choi, Y.M., Suh, H.J. & Kim, J.M. (2001). Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *J. Prot. Chem.* **20**, 287-292.
- Comi, D. (1991). Importanza degli oligoelementi nella nutrizione. *Clin. Dietol.* **18**, 371-80.
- Cook, J.D. & Monsen, E.R. (1976). Food iron absorption in human subjects III. Comparison of the effect of animal proteins on nonheme iron absorption. *Am.J.Clin.Nutr.* **29**, 859-67.
- Coppola S., Pepe O., Masi P. & Sepe M. (1996). Characterisation of leavened doughs for Pizza in Naples. *Advances in Food Science* **18**, 160-162.
- Cordano, A. (1974). The role played by copper in the physiopathology and nutrition of the infant and the child. *Ann. Nestle* **33**, 1-16.
- Cordano, A., Beartl, J.M. & Graham, G.G. (1964). Copper deficiency in infancy. *Pediatrics* **34**, 324-36.
- Costello, A. J. R., Glonek, T. & Myers, T. C. (1976). Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance – pH titration of hexaphosphate (phytic acid). *Carbohydr. Res.* **46**, 156-171.
- Coudray, C., Richard, M.J. et al. (1992). Superoxide dismutase activity and zinc status: a study in animals and men. *J. Nutr. Med.* **3**, 13-26.
- Cousin, R.J. (1989) Nutritional regulation of host-defense system: emphasis on trace minerals. *In: Bales CW (ed:) Mineral Homeostasis in the Elderly*, Alan R Liss, New York, pp. 171-99.
- Cousins, R.J. (1985). Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* **65**, 238-309.
- Dalal, R.C. (1977). Soil organic phosphorus. *Adv Agron.* **29**, 83-117.
- Danks, D.M. (1988). Copper deficiency in humans. *Ann. Rev. Nutr.* **8**, 235-57.
- Davidsson, L., Almgren, A., Juillerat, M. A. & Hurrel, R.F. (1995). Manganese absorption in humans: the effect of phytic acid and ascorbic acid in soy formula. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 984-987.

- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M.R., McSweeney, P.L.H., Faccia, A., Giovine, M. & Gobbetti, M. (2003). Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: Purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Int. J. Food Microbiol.* **87**, 259-270.
- de Boland, A.R., Garner, G.B. & O'Dell, B.L. (1975). Identification and properties of "phytate" in cereal grains and oilseed products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **23**, 1186-1189.
- Deshpande, S.S. & Cheryan, M. (1984). Effects of phytic acid, divalent cations, and their interactions on alpha-amylase activity. *J. Food Sci.* **49**, 516-519.
- Dvořáková, J. (1998). Phytase: sources, preparation and exploitation. *Folia Microbiol.* **42**, 323-338.
- Eastwood, D. & Laidman, D.L. (1971). The metabolization of macronutrient elements in the germinating wheat grain. *Phytochemistry.* **10**, 1275-1284.
- Eeckhout, W. & de Paepe, M. (1994). Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **47**, 19-29.
- Egli, I., Davidsson, L., Juillerat, M.A., Barclay, D. & Hurrell, R.F. (2002). The influence of soaking and germination on the phytase activity and phytic acid content of grains and seeds potentially useful for complementary feeding. *J. Food Sci.* **67**, 3484-3488.
- Ellis, R., Kelsay, J.L., Reynolds, R.D., Morris, E.R., Moser, P.B. & Frazier, C.W. (1987). Phytate: Zinc and phytate:calcium: zinc millimolar ratio in self-selected diets of Americans, Asian Indians and Nepalese. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 1043-47.
- Ferguson, I. B. & Bollard, E. G. (1976). The movement of calcium in germinating pea seeds. *Ann. Bot. (London)* **40**, 1047-1051.
- Finch, C.A. & Cook, J.D. (1984). Iron deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* **39**, 471-77.
- Findenegg, G.R. & Nelemans, J.A. (1993). The effect of phytase on the availability of P from *myo*-inositol hexaphosphate (phytate) for maize roots. *Plant Soil* **154**, 189-196.

- Fredlund, K., Asp, N.G., Larsson, M., Marklinder, I. & Sandberg, A.S. (1997). Phytate reduction in whole grains of wheat, rye, barley and oats after hydrothermal treatment. *J. Cereal Sci.* **25**, 83-91.
- Fredrikson, M., Biot, P., Larsson Alminger, M., Carlsson, N.G. & Sandberg, A.S. (2001). Production process for high-quality pea-protein isolate with low content of oligosaccharides and phytate. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1208-1212.
- Fretzdorff, B. & Brummer, J.M. (1992). Reduction of phytic acid during breadmaking of whole-meal breads. *Cereal Chemistry* **69**, 266-270.
- Fujita, J., Shigeta, S., Yamane, Y., Fukuda, H., Kizaki, Y., Wakabayashi, S. & Ono, K. (2003). Production of two types of phytase from *Aspergillus oryzae* during industrial koji making. *J. Biosci. Bieng.* **95**, 460-465.
- Fujita, M., Itakura, T. et al. (1989). Copper deficiency during total parenteral nutrition: clinical analysis of three cases. *J. Pediatr.* **113**, 421-24.
- Galan, P., Preziosi, P., Durlach, V. et al. (1997). Dietary magnesium intake in a French adult population. *Magnesium Research.* **10**, 321-328.
- Gargova, S., Roshkova, Z. & Vancheva, G. (1997). Screening of fungi for phytase production. *Biotechnology Techniques.* **11**, 221-224.
- Gibson, R.S., Vanderkooy, P.D.S., MacDonald, A.C., Goldman, A., Ryan, B.A. & Berry, M. (1989). A growth limiting, mild zinc-deficiency syndrome in some Southern Ontario boys with low height percentiles. *Am. J. Clin. Nutr.* **49**, 1266-73.
- Gillooly, M., Bothwell, T.H., Torrance, J.D., MacPhail, A.P., Derman, D.P., Bezwoda, W.R., Mills, W. & Charlton, R.W. (1983). The effects of organic acids, phytates, and polyphenols on the absorption of iron from vegetables. *Br. J. Nutr.* **49**, 331-42.
- Golovan, S., Wang, G., Zhang, J. & Forsberg, C. W. (2000). Characterization and overproduction of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Canadian Journal of Microbiology*, **46**, 59-71.
- Graf, E. (1986). In "Phytic Acid: Chemistry and Applications" (E. Graf, ed.), 1-21.

- Greiner, R. & Konietzny, U. (1999). Improving enzymatic reduction of *myo*-inositol phosphates with inhibitory effects on mineral absorption in black beans. *J. Food Process. Preserv.* **23**, 249-261.
- Greiner, R., Konietzny, U. & Jany, K. D. (1993). Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 107-113.
- Guthrie, B.E. (1975). Cr, Mn, Cu, Zn and Cd content of New Zealand foods. *NZ. Med. J.* **82**, 418-24.
- Hallberg, L., Rossander, L. & Skanberg, A.B. (1987). Phytates and the inhibitory effect of bran on iron absorption in man. *Am. J. Clin. Nutr.* **45**, 988-96.
- Hallberg, L., Rossander-Hulten, L., Brune, M. & Glerup, A. (1992). Calcium and iron absorption: mechanisms of action and nutritional importance. *Eur J. Clin. Nutr.* **46**, 317-27.
- Han, O., Failla, M.L., Hill, A.D., Morris, E.R. & Smith Jr., J.C. (1994). Inositol phosphates inhibit uptake and transport of iron and zinc by a human intestinal cell line. *J. Nutr.* **124**, 580-587.
- Han, Y. & Lei, X.G. (1999). Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phy A) in *Pichia pastoris*. *Arch. Biochim. Biophys.* **364**, 83-90.
- Haros, M., Rosell, C.M. & Benedito, C. (2001). Fungal phytase as a potential breadmaking additive. *Eur. Food Res. Technol.* **213**, 317-322.
- Hayes, J. E., Simpson, R. J. & Richardson, A. E. (2000). The growth and phosphorus utilization of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. *Plant and Soil* **220**, 165-174.
- Hirose, M., Ozaki, K., Takaba, K., Fukushima, S., Shirai, T. & Ito, N. (1991). Modifying effects of the naturally occurring antioxidants gamma-oryzanol, phytic acid, tannin acid and n-tritriacontane-16,18-dione in a rat wide-spectrum organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis*, **12**, 1917-1921.

- Hurley, L.S. & Keen, C.L. (1987). Manganese. *In: Mertz W (ed.) Trace elements in human and animal nutrition*, 5a ed., Academic Press, San Diego, vol. I, pp. 185-223.
- Hurrell, R.F., Reddy, M.B., Burri, J. & Cook, J.D. (2000). An evaluation of EDTA compounds for iron fortification of cereal-based foods. *Br. J. Nutr.* **84**, 903-910.
- Hurrell, R.F. (2003). Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *J. Nutr.* **133**, 2973-2977.
- Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H. et al. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promotig effect. *Microbiology* **148**, 2097-2109.
- Iorizzo, M., Coppola, R., Sorrentino, E. & Grazia, L. 1995. Caratterizzazione microbiologica di paste acide molisane. *Industrie Alimentari*, XXXIV, 1290-1294.
- Irving, G.C.J. & Cosgrove, D.J. (1971). Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. Some properties of a partially purified bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. *Austr. J. Biol. Sci.* **24**, 547-557.
- Jackson, M.J. (1989). Physiology of zinc: general aspects. *In: Mills CF (ed.), Zinc in Human Biology*, London, Springer Verlag, pp. 1-14.
- Jacobs, D., Meyer, K., Kushi, L. & Folsom, A. (1998). Whole-grain intake may reduce the risk of ischemic heart disease death in post-menopausal wome: the lowa womens's health study. *American Journal of Clinical Nutrition* **68**, 248-257.
- Jog, S.P., Garchow, B.G., Mehta, B.D. & Murthy, P.P.N. (2005). Alkaline phytase from lily pollen: investigation of biochemical properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **440**, 133-140.
- Johnson, L.F. & Tate, M.E. (1969). The structure of *myo*-inositol pentaphosphates. *Ann. A.N. Acad. Sci.* **165**, 526-532.
- Jongbloed, A.W., De Longe, L., Kemme, P.A., Mroz, Z. & Kies, A.K. (1997). Phytates, phytase, protein and performance in pigs. *Proc. 6th Forum on Anim. Nutr.*, BASF, Ludwigshafen, Germany, pp.92-106.
- Jongbloed, A.W., Mroz, M. & Kemme, P.A. (1992). The effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent

digestibility of dry matter, total phosphorus, and phytic acid in different sections of the alimentary tract. *J Anim Sci* **70**, 1159-1168.

Keen, C.L. (1990). Manganese. In: Brown ML (ed.), *Present knowledge of nutrition*, 6th ed, International Life Sciences Institute Nutrition Foundation, Washington DC, pp. 279-286.

Kerovuo, J. (2000). A novel phytase from *Bacillus*. Characterization and production of the enzyme. Tesi di Laurea. Faculty of Science, Helsinki, Finland.

Kerovuo, J. Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkinnen, N. & Apajalahti, J. (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2079-2085.

Khalil, A.H. & Mansour, E.H. (1995). The effect of cooking, autoclaving and germination on the nutritional quality of faba beans. *Food Chemistry* **54**, 177-182.

Kim, Y.O., Kim, H.K., Bae, K.S., Yu, J.H. & Oh, T.K. (1998). Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microbial Technol.* **22**, 2-7.

Kim, Y.O., Lee, J.K., Kim, H.K., Yu, J.H. & Oh, T.K. (1998b). Cloning of the thermostable phytase gene (*phy*) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**, 185-191.

Klevay, L. M. (1973). Hypercholesterolemia in rats produced by an increase in the ratio of zinc to copper ingested. *American Journal of Clinical Nutrition.* **26**, 1060-1068.

Klevay, L.M., Inman, L., Johnson, L.K., Lawler, M., Mahalko, J.R. & Milne, D.B. (1984). Increased cholesterol in plasma in a young man during experimental copper depletion. *Metabolism* **33**, 1112-18.

Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. & Schroth, M.N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* **268**, 885-886.

Knuckles, B.E., Kuzmicky, D.D., Gumbmann, M.R. & Betschart, A.A. (1989). Effect of myo-inositol phosphate esters on in vitro and in vivo digestion of protein. *Journal of Food Science* **54**, 1348-1350.

- Konietzny, U. & greiner, R. (2002). Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci. technol.* **37**, 791-812.
- Konietzny, U. & Greiner, R. (2004). Bacterial phytase: potential application, *in vivo* function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology* **35**, 11-18.
- Kvist, S., Carlsson, T., Lawther, J.M. & DeCastro, F.B. (2005). Process for the fractionation of cereal brans. *US patent application US 20050089602*.
- Larsson, M. & Sandberg, A.S. (1991). Phytate reduction in bread containing oat flour, oat bran or rye bran. *Journal of Cereal Science* **14**, 141-149.
- Lease, J.G. (1966). The effect of autoclaving sesame meal on its phytic acid content and on the availability of its zinc to the chick. *Poultry Science* **45**, 237-241.
- Leenhardt, F., Levrat-Verny, M.A., Chanliaud, E. & Remesy, C. (2005). Moderate decrease of pH by sourdough fermentation is sufficient to reduce phytate content of whole wheat flour through endogenous phytase activity. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 98-102.
- Lei, X.G. & Porres, J.M. (2003). Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters* **25**, 1787-1794.
- Liu, S., Manson, J., Stampfer, M., Hu, F., Giovannucci, E., Colditz, G., Hennekens, C. & Willett, W. (2000). A prospective study of whole-grain intake and risk of type 2 diabetes mellitus in US women. *American Journal of Public Health* **90**, 1409-1415.
- Lopez, H.W., Krespine, V., Guy, C., Messenger, A., Demigne, C. & Remesy, C. (2001). Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and increases soluble magnesium. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2657-2662.
- Lopez, H.W., Leenhardt, F., Coudray, C. & Remesy, C. (2002). Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition? *International J. of Food Science and Technol.* **37**, 727-739.
- Lopez, H.W., Ouvry, A., Bervas, E., Guy, C., Messenger, A., Demigne, C. & Remesy, C. (2000). Strains of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs

- degrade phytic acid and improve calcium and magnesium solubility from whole wheat flour. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2281-2285.
- Maddaiah, V.T., Kurnick, A.A. & Reid, B.L. (1964). Phytic acid studies. *P.S.E.B.M.* **115**, 391-393.
- Maenz, D.D. (2001). Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds. *Enzymes in Farm animal Nutrition*. M. R. Bedford and G. G. Partridge, ed. CABI Publishing, New York, NY. 61-84.
- Maga, J. A. (1982). Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *J. Agric. Food Chem.* **30**. 1-9.
- McClain, C.J. & Stuart, M.A. (1990) Zinc metabolism in the elderly. *In: Morely JE, Glick Z & Rubenstein LZ (eds.), Geriatric nutrition*, Raven Press, New York, pp. 161-69.
- McKenzie-Parnell, J.M. & Davies, N.T. (1986). Destruction of phytic acid during home breadmaking. *Food Chemistry* **22**, 181-192.
- Minihane, A.M. & Rimbach, G. (2002). Iron absorption and the iron binding and anti-oxidant properties of phytic acid. *International Journal of Food Science and Technology* **37**, 741-748.
- Monsen, E.R., Hallberg, L., Layrisse, M., Hegsted, M., Cook, J.D., Hertz, W. & Finch, C.A. (1978). Estimation of available iron. *Am. J. Clin. Nutr.* **31**, 134-41.
- Mosha, T.C., Gaga, H.E., Pace, R.D., Laswai, H.S. & Mtebe, K. (1995). Effect of blanching on the content of antinutritional factors in selected vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition* **47**, 361-367.
- Navert, B., Sandstrom, B. & Cederblad, A. (1985). Reduction of the phytate content of bran by leavening in bread and its effect on zinc absorption in man. *Br. J. Nutr.*, **53**, 47-53.
- Nayini, N.R. & Markakis, P. (1983). Effect of fermentation time on the inositol phosphates of bread. *J. Food Sci.* **48**, 262-263.
- O'Dell, B.L. (1992). Zinc plays both structural and catalytic roles in metalloproteins. *Nutr. Rev.*, **50**, 48-50.

- Okubu, K., Meyers, D.V. & Iacobucci, G.A. (1976). Binding of phytic acid to glycinin. *Cereal Chem.* **53**, 513-524.
- Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A. & Soccol, A.T. (2001). Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technol.* **7**, 203-214.
- Pasamontes L., Haiker M., Wyss M., Tesseir & Van Loon A. P. (1997). Gene cloning, purification, and characterization of a heatstable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1696-1700.
- Pennacchia C., Ercolini D., Blaiotta G., Pepe O., Mauriello G. & Villani F. (2004). Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science.* **67**, 309-317.
- Pepe O., Blaiotta G., Anastasio M., Moschetti G., Ercolini D. & Villani F. (2004). Technological and molecular diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sourdoughs. *System Appl Microbiol.* **27**, 443-453.
- Pepe O., Blaiotta G., Moschetti G., Greco T. & Villani F. (2003). Rope-producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology* **69**, 2321-2329.
- Pepe O., Villani F. & Coppola S. (2001). Differential viable count of mixed starter cultures of lactic acid bacteria in doughs by using modified Chalmers medium. *Microbiological Research.* **155**, 351-354.
- Pereira, M., Jacobs, D., Pins, J., Raatz, S., Gross, M., Slavin, J. & Seaquist, E. (2002). Effect of whole grains on insulin sensitivity in overweight hyperinsulinemic adults. *American Journal of Clinical Nutrition* **75**, 848-855.
- Plimmer, R.H.A. (1913). *Biochem. J.* **7**, 72-80.
- Powar, V. K. & Jagannathan, V. (1982). Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **151**, 1102-1108.
- Prasad, A.S. (1989). Trace element in the elderly. In: Bales CW (ed.) *Mineral Homeostasis in the Elderly*, Alan R Liss, New York, pp. 69-105.
- Prasad, A.S. et al. (1963). Zinc metabolism in patients with syndrome of iron deficiency anemia hypogonadism and dwarfism. *J. Lab. Clin. Med.* **61**, 537-49.

- Prohaska, J.R. (1988). Biochemical functions of copper in animals. *In: Prasad A (ed.) Essential and toxic trace elements in human health and disease*, Alan R Liss, New York, 105-24.
- Ravindran, V., Cabahug, S., Bryden, W.L. & Selle, P.H. (1999). The influence of microbial phytase on the bioavailability of protein and energy in broiler chickens. *In: Coelho MB, Kornegay ET (eds) Phytase in animal nutrition and waste management*, 2nd rev edn. BASF, Mexico, pp.573-584.
- Reddy, N.R. & Pierson, M.D. (1994). Reduction in antinutritional and toxic components in plant foods by fermentation. *Food Research International* **27**, 281-290.
- Reddy, N.R., Pierson, M.D., Sathe, S.K. & Salukhe, D.K. (1989). Influence of processing technologies on phytate. Cooking. *In: Phytates in Cereals and Legumes. Advances in Food Research* **28**, 111-135.
- Richardson, A.E. (2001). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust J Plant Physiol* **28**, 897-906.
- Richardson, A.E., Hadobas, P.A. & Hayes, J.E. (2000). Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum L.*) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. *Plant Cell Environ* **23**, 397-405.
- Richardson, A.E., Hadobas, P.A., Hayes, J.E., O'Hara, C.P. & Simpson, R.J. (2001b). Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositolhexaphosphate is enhanced by the presence of soil micro-organisms. *Plant Soil* **229**, 45-56.
- Rodehutsord, M. & Pfeffer, E. (1995). Effects of supplemental microbial phytase on P digestibility and utilization in rainbow trout. *Wat. Sci. Tech.* **31**, 143-147.
- Rodriguez, E., Porres, J.M., Han, Y. & Lei, X.G. (1999). 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*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **365**, 262-267.

- Sandberg, A. S., Hulthen, L. R. & Turk, M. (1996). Dietary *Aspergillus niger* phytase increases iron absorption in humans. *J. Nutr.* **126**, 476-480.
- Sandberg, A.S. & Andersson, H. (1988). The effect of dietary phytase on the digestion of phytate in the stomach and small intestine of human. *Journal of Nutrition.* **118**, 469-473.
- Sandberg, A.S. & Andlid, T. (2002). Phytogenic and microbial phytases in human nutrition. *International Journal of Food Science and Technology* **37**, 823-833.
- Sandberg, A.S., Andersson, H., Carlson, N.G. & Sandstrom, B. (1987). Degradation products of bran phytate formed during digestion in the human small intestine: effect of extrusion cooking on digestibility. *J. Nutr.* **117**, 2061.
- Sandberg, A.S., Brune, M., Carlsson, N.G., Hallberg, L., Skoglund, E. & Rossander-Hulthen, L. (1999). Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 240-246.
- Sandstrom, B. & Cederblad, A. (1980). Zinc absorption from composite meals II. Influence of the main protein source. *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 1778-83.
- Sandstrom, B., Almgren, A., Kivisto, B. & Cederblad, A. (1989). Effect of protein level and protein source on zinc absorption in human. *J. Nutr.*, **119**, 48-53.
- Sebastian, S., Touchburn, S.P. & Chavez, E.R. (1998). Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition: a review. *World's poult Sci. J.* **54**, 27-47.
- Shah, B. & Belouje, B. (1981). Bioavailability of zinc in beef with and without plant protein. *Fed. Proc.*, **40**, 885-89.
- Shamsuddin, A.M. (1995). Inositol phosphates have novel anticancer function. *Journal of Nutrition.* **125**, 725S-732S.
- Sharma, C., Goel, M. & Irshad, M. (1978). Myoinositol hexaphosphate as a potential inhibitor of α -amylases. *Phytochemistry* **17**, 201-204.
- Sharma, R. D. (1986). Phytate and the epidemiology of hearth disease, renal calculi and colon cancer. In: Graf, E. (Ed), "*Phytic Acid: Chemistry and Applications*" 161-172.

- Shieh, T.R. & Ware, J.H. (1968). Survey of microorganism for production of extracellular phytase. *Appl. Microb.* **16**, 1348-1351.
- Shieh, T.R., Wodzinski, R.J., & Ware, J.H. (1969). *J. Bacteriol.* **100**, 1161-1165.
- Shimizu, M. (1992). Purification and characterization of a phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1266-1269.
- Shirai, K., Revah-Moiseev, S., Garcia-Garibay, M. & Marshall, V.M. (1994). Ability of some strains of lactic acid bacteria to degrade phytic acid. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**, 366-369.
- Simell, M., Turunen, M., Piironen, J. & Vaara, T. (1989). Feed and food applications of phytase. Lecture at 3rd Meet. *Industrial Applications of Enzymes*, Barcelona, Spain.
- Simon, O. & Igbasan, F. (2002). In vitro properties of phytases from various microbial origins. *International Journal of Food Science and Technology.* **37**, 813-822.
- Sirkka, P. (1997). Myoinositol phosphates: Analysis, content in food and effects in nutrition. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **30**, 633-647.
- Snider, M. & Liebman, M. (1992). Calcium additives and sprouted wheat effects on phytate hydrolysis in whole wheat bread. *Journal of Food Science* **57**, 118-120.
- Solomons, N.W. (1982). Biological availability of zinc in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, **35**, 1048-75.
- Sreeramulu, G., Srinivasa, D.S., Nand, K. & Joseph, R. (1996). *Lactobacillus amylovorus* as a phytase producer in submerged culture. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**, 385-388.
- Stahl, C.A., Roneker, K.R., Thornton, J.R., Lei & X.G. (2000). A new phytase expressed in yeast effectively improves the bioavailability of phytate phosphorus to weanling pigs. *J. Anim. Sci.* **68**, 668-674.
- Sturniolo, G.C., D'Inca, R. et al. (1994). Zinc metabolism and immune function in healthy elderly people. *Clin. Nutr.*, **13**, 280-85.
- Suzuki, U., Yoshimura, K., & Takaishi, M. (1907). *Tokyo Imp. Univ. Coll. Agr. Bull.* **7**, 503-512.

- Svanberg, U., Lorri, W. & Sandberg, A.S. (1993). Lactic acid fermentation of non-tannin and high-tannin cereals: effects on in vitro estimation of iron availability and phytate hydrolysis. *Journal of Food Science* **58**, 408-412.
- Tangkongchitr, U, Seib, P.A. & Hosney, R.C. (1981). Phytic acid. II. Its fate during breadmaking. *Cereal Chemistry* **58**, 229-234.
- Tangkongchitr, U, Seib, P.A. & Hosney, R.C. (1982). Phytic acid. III. Two barriers to the loss of phytate during breadmaking. *Cereal Chemistry* **59**, 216-221.
- Tarafdar, J.C. & Claassen, N. (1988). Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher-plants through the activity of phosphates produced by plant-roots and microorganisms. *Biol Fert Soils* **5**, 308-312.
- Thompson, L.U. & Yoon, J.H. (1984). Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *Journal of Food Science* **49**, 1228-1229.
- Thompson, L.U. (1986). Phytic acid: a factor influencing starch digestibility and blood glucose response. In: GRAF, E. (Ed), *Phytic acid. Chemistry and applications*. Minneapolis: Pilatus Press, pp. 173-194.
- Turk, M. & Sandberg, A.S. (1992). Phytate degradation during breadmaking: Effect of phytase addition. *Journal of Cereal Science* **15**, 281-294.
- Turk, M., Carlsson, N.G. & Sandberg, A.S. (1996). Reduction in the levels of phytate during wholemeal bread making; effect of yeast and wheat phytases. *J. Cereal Sci.* **23**, 257-264.
- Turland, J.R., Durkin, N. et al. (1986). Stable isotope studies of zinc absorption and retention in young and elderly men. *J. Nutr.* **116**, 1239-47.
- Turlund, J.R., Keyes, W.R., Anderson, H.L. & Acord, L.L. (1989). Copper absorption and retention in young man at three levels of dietary copper by use of the stable isotope ⁶⁵Cu. *Am. J. Clin. Nutr.* **49**, 870-78.
- Uauy, R.C., Castillo-Duran, M. et al. (1993). Red cell superoxide dismutase activity as an index of human copper nutrition *J. Nutr.* **115**, 1650-55.
- Ullah A. H. J. & Dischinger H. C. Jr. (1993). *Aspergillus ficuum* phytase: Complete primary structure elucidation by chemical sequencing. *Biochem, Biophys. Res. Commun.* **192**, 754-759.

- Vallee, B.L. & Falchuk, K.H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* **73**, 79-118.
- Vanos, V. & Cox, L. (1986). Rapid routine method for the detection of lactic acid bacteria among competitive flora. *Food Microbiol.* **3**, 223-234.
- Vielma, J., Lall, S.P., Koskela, J., Schonert, F.J. & Mattila, P. (1998). Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **163**, 309-323.
- Viveros, A., Centeno, C., Brenes, A., Canales, R. & Lozano, A. (2000). Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4009-4013.
- Vohra, A. & Satyanarayana, T. (2003). Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **23**, 29-60.
- Vohra, A.P., Gray, G.A. & Kratzer, F.H. (1965). Phytic acid-metal complexes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **120**, 447.
- Volfova, O., Dvorakova, J., Hanzlikova, A. & Jandera, A. (1994). Phytase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiology* **36**, 481-484.
- Wang, H.L., Swain, E.W. & Hesseltine, C.W. (1980). Phytase of molds used in oriental food fermentation. *J. Food Sci.* **45**, 1262-1266.
- Wheeler, E.L. & Ferrel, R.E. (1971). A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. *Cereal Chemistry* **48**, 312-320.
- Whipps, J.M. (1990). Carbon economy. In: *The Rhizosphere*. Lynch, J.M. (ed.). John Chichester, West Sussex, UK: Wiley & Son, pp. 59-97.
- Wise, A. & Gilbert, D.J. (1982). Phytate hydrolysis by germ-free and conventional rats. *Applied and Environmental Microbiology*. **43**, 753.
- Wise, A. (1983). Dietary factors determining the biological activities of phytate. Review in clinical nutrition. *Nutr. Abstr. Rev.* **9**, 791-806.
- Wodzinski, R.J. & Ullah, A.H.J. (1996). Phytase. *Advances in Applied Microbiology*, **42**, 263-302.
- www.123bio.net

www.phytase.net

Wyss M., Brugger R., Kronenberger A., Rémy R., Fimbel R., Oeterhelt G., Lehmann M. & Van Loon, A.P.G.M. (1999a). Biochemical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): catalytic properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 367-373.

Wyss, M., Pasamontes, L., Friedlein, A., Remy, R., Tessier, M., Kronenberger, A., Middendorf, A., Lehmann, M., Schnoebelen, L., Röthlisberger, U., Kuszniir, E., Wahl, G., Muller, F., Lahm, H. W., Vogel, K., & Van Loon, A. P. G. M. (1999b). Biophysical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 359-366.

Wyss, M., Pasamontes, L., Remy, R., Kohler, J., Kuszniir, E., Gadiant, M., Muller, F. & Van Loon, A. P. G. M. (1998). Comparison of the thermostability properties of three acid phosphatases from molds: *Aspergillus fumigatus* phytase, *A. niger* phytase, and *A. niger* pH 2.5 acid phosphatase. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4446-4451.

Yang, W.J., Matsuda, Y., Sano, S., Masutani, H. & Nakagawam H. (1991). Purification and characterization of phytase from rat intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* **1075**, 75-82.

Yi, Z., Kornegay, E.T. & Denbow, D.M. (1996). Supplemental microbial phytase improves zinc utilization in broilers. *Poult Sci.* **75**, 540-546.

Yoon, J.H., Thompson, L.U. & Jenkins, D.J.A. (1983). The effect of phytic acid in vitro rate of starch digestibility and blood glucose response. *Am. J. Clin. Nutr.* **38**, 835-42.

Zamudio, M., Gonzalez, A. & Medina, J.A. (2001). *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**, 181-184.

Zhang, Z.B., Kornegay, E.T., Radcliffe, J.S., Wilson, J.H. & Veit, H.P. (2000). Comparison of phytase from genetically engineered *Aspergillus* and canola in weanling pig diets. *J Anim Sci* **78**, 2868-2878.

TABELLE E FIGURE

Tabella 1. Contenuto dell'acido fitico (g/100 g peso secco) in alcuni alimenti (Fonte INRAN).

Pane integrale	0.60
Farina di frumento tipo 00	0.29
Riso soffiato da prima colazione	0.23
Cornflakes	0.06
Mais	0.24
Grano	0.27
Orzo	0.27
Avena	0.29
Sorgo	0.24
Riso non raffinato	0.27
Fagioli borlotti	1.20
Fave	0.84
Piselli	0.80
Lenticchie	0.42
Cassava	0.04
Patate dolci	0.05
Arachidi tostate	1.70
Nocciole secche	0.98
Noci secche	0.76
Fichi secchi	0.40
Mele annurche fresche	0.06
Latte e yogurt	Assente
Uova	Assente
Oli e grassi	Assente

(Haefner et al., 2005).

Tabella 2. Stime dell'assunzione di fitato nelle diete di diverse nazioni.

Nazione	Dettagli di studio	Fitato (mg/giorno)
U.S.A.	assunzione media	750
U.S.A.	uomini	746
U.S.A.	donne	631
U.S.A.	donne 18-24 anni	395
ITALIA	assunzione media	219
NIGERIA	assunzione media	2100
SVEZIA	assunzione media	180
CANADA	ragazzi onnivori	320
CANADA	ragazze onnivore	250
NUOVA GUINEA	bambini, vegetariani + pesce	569
MALAWI	bambini, vegetariani + pesce	1890
GHANA	bambini onnivori	578
GRAN BRETAGNA	assunzione media	600-800

(Sirikka, 1997).

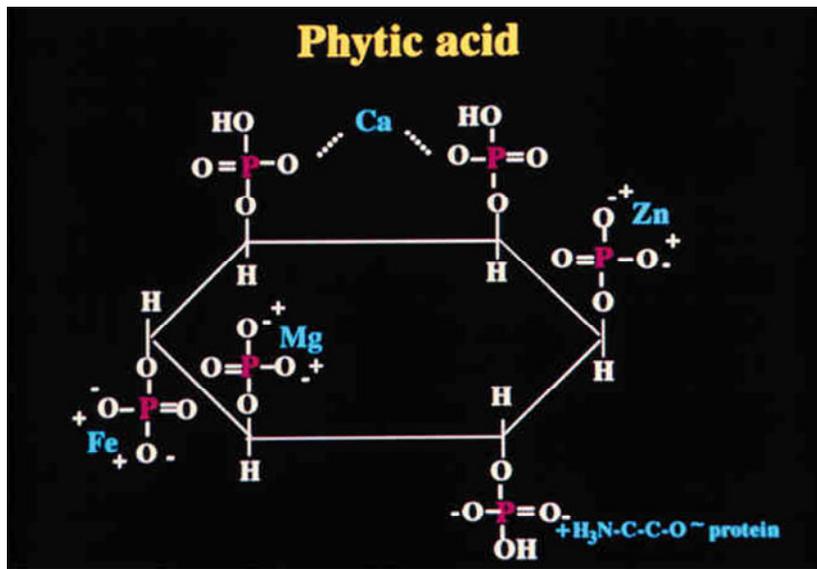


Figura 1. Struttura biochimica dell'acido fitico legato a cationi bivalenti e proteine.

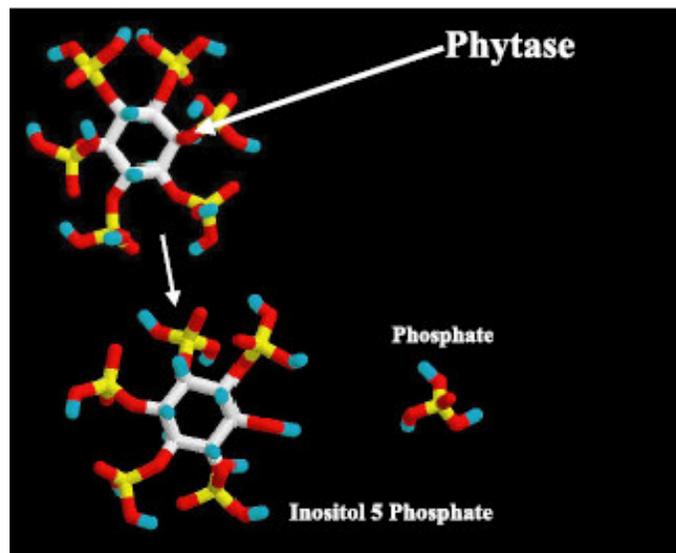


Figura 2. Idrolisi dell'acido fitico ad opera delle fitasi.

Tabella 3. Proprietà catalitiche delle fitasi di origine microbica e vegetale.

Fonte Fitasi	K_m (μmol)	k_{cat} (s^{-1})	Energia di attivazione di Arrhenius (kJ/mol)	Specificità del substrato
<i>A. terreus</i>	11-23	-	-	Abbastanza specifica
<i>A. fumigatus</i>	<10	114	-	Ampia
<i>A. oryzae</i>	330	-	43.2	Ampia
<i>E. nidulans</i>	-	-	-	Ampia
<i>M. thermophila</i>	-	-	-	Ampia
<i>T. lanuginosus</i>	110	-	-	-
<i>P. simplicissimum</i>	-	-	-	Ampia
<i>S. castelli</i>	38	-	39.3	Ampia
<i>E. coli</i>	130-630	1744	58.5	Abbastanza specifica
<i>K. terrigena</i>	300	180	35.0	Media
<i>K. aerogenes</i>	62, 114	-	37.8	-
<i>B. subtilis</i>	50-500	-	48.6	Abbastanza specifica
<i>B. amyloliquefaciens</i>	550	-	-	Abbastanza specifica
Grano PHY1	0.48	-	-	Media
Grano PHY2	0.77	-	-	Media
Farro D21	400	368	52.9	Ampia
Segale	300	358	26.6	Ampia
Avena	30	356	25.1	Ampia
Orzo P1	72	136	27.5	Ampia
Orzo P2	190	<10	42.0	Ampia
Radice di Mais	24-43	<10	-	-
Pianta di Mais	117	<10	-	-
Soia	48	-	35.3	-
Fagioli Mung	650	-	-	Ampia
Foglie di porro	200	-	-	Ampia
Fava	148	704	-	Ampia
Lupino L11	80	523	-	Ampia
Lupino L12	300	589	-	Ampia
Lupino L2	130	533	-	Ampia
Radici di pomodoro	38	-	-	Ampia
Intestino di ratto	210	-	-	Ampia

(Konietzny & Greiner, 2002).

Tabella 3 (continua). Proprietà catalitiche delle fitasi di origine microbica e vegetale.

Fonte Fitasi	pI	pH ottimale	Temperatura ottimale (°C)	Attività specifica a 37 °C (U mg)
<i>A.terreus</i>	5.0	5.0-5.5	70	142-196
<i>E. nidulans</i>	5.3	6.5	-	29-33
<i>M. thermophila</i>	4.8	5.5	-	42
<i>T. lanuginosus</i>	5.4	6.0	65	110
<i>P.simplicissimum</i>	5.8	4.0	55	3
<i>S. castelli</i>	-	4.4	77	418 (70 °C)
<i>K. terrigena</i>	5.5	5.0	58	205
<i>K. aerogenes</i>	3.7,10.5	4.5,5.2	68	-
<i>B. subtilis</i>	6.3-6.5	6.0-7.5	55-60	9-15
Grano PHY1	-	6.0	45	127
Grano PHY2	-	5.0	50	242
Farro D21	-	6.0	45	262
Segale	-	6.0	45	517
Avena	-	5.0	38	307
Orzo P1	-	5.0	45	117
Orzo P2	-	6.0	55	43
Radice di Mais	4.8-5.0	5.0-5.1	35-40	5.7
Pianta di Mais	-	4.8	55	2.3
Fagioli Mung	-	7.5	58	0.5
Foglie di porro	-	5.5	57	500
Fava	-	5.0	51	636
Lupino L11	-	5.0	50	539
Lupino L12	-	5.0	50	607
Lupino L2	-	5.0	50	498
Radici di pomodoro	5.5	4.3	50	205
Intestino di ratto	-	7.0,7.5-8.0	45	-

(Konietzny & Greiner, 2002).

Tabella 4. Proprietà molecolari di fitasi di origine microbica e vegetale.

Fonte fitasi	Massa molecolare (kDa) da dati sequenziati	Massa molecolare (kDa) da SDS-PAGE	Massa molecolare (kDa) da Gel filtrazione	Numero di subunità
<i>A.terreus</i>	48	60-82	79-115	1, 6
<i>A.oryzae</i>	-	60	-	2
<i>E. nidulans</i>	49	66	77-86	1
<i>M. thermophila</i>	50	62	73	1
<i>T. lanuginosus</i>	51	60	-	1
<i>P.simplicissimum</i>	-	65-67	65	1
<i>S. castelli</i>	-	70-125	490	3+1
<i>E. coli</i>	45	42-47	39-43	1
<i>K. aerogenes</i>	-	-	700	1
<i>B. subtilis</i>	-	38-42	36	1
Grano PHY1	-	68	71	1
Grano PHY2	-	66	66	1
Farro D21	-	68	65	1
Segale	-	68	67	1
Avena	-	68	67	1
Orzo P1	-	66	67	1
Orzo P2	-	66	67	1
Radice di Mais	-	38	71	2
Pianta di Mais	-	38	76	2
Soia	-	59-60	50	1
Fagioli Mung	-	70-72	130	2
Foglie di porro	-	72	-	1
Fava	-	67	65	1
Lupino L11	-	57	58	1
Lupino L12	-	57	58	1
Lupino L2	-	64	65	1
Radici di pomodoro	-	82	164	2
Intestino di ratto	-	70-90	-	1+1

(Konietzny & Greiner, 2002).

Tabella 5. Fitasi di origine microbica e vegetale.

Fonte fitasi	Posizione
<i>A. niger</i> NRRL 3135	EX
<i>A. flavus</i>	EX
<i>A. terreus</i>	EX
<i>A. carneus</i>	EX
<i>A. oryzae</i>	EX
<i>A. fumigatus</i>	EX
<i>Mucor</i> sp.	EX
<i>Penicillium</i> spp.	EX
<i>Penicillium caseoicolum</i>	EX
<i>Rhizopus oligosporus</i>	IN e EX
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EX
<i>Schwanniomyces castelii</i>	EX
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	EX
<i>Candida tropicalis</i>	EX
<i>Torulopsis candida</i>	EX
<i>Debaryomyces castelii</i>	EX
<i>Bacillus subtilis</i>	EX
<i>B. subtilis</i> (natto)	EX
<i>B. amyloliquefaciens</i>	EX
<i>Echerichia coli</i>	IN ^a
<i>Klebsiella aerogenes</i>	IN
<i>K. terrigena</i>	IN
<i>K. oxytoca</i>	IN
<i>Pseudomonas</i> sp.	EX
<i>Enterobacter</i> sp.	EX
<i>Citrobacter freundii</i>	IN
Semi di soia	IN
Semi di legumi	IN
<i>Typha latifolia</i>	IN
Ratti, mucosa intestinale	IN
Ratti, fegato	IN ^b
<i>Paramecium</i>	N ^b

EX: Extracellulare

IN: Intracellulare

^a Spazio periplasmatico

^b Reticolo endoplasmatico

(Kerovuo, 2000).

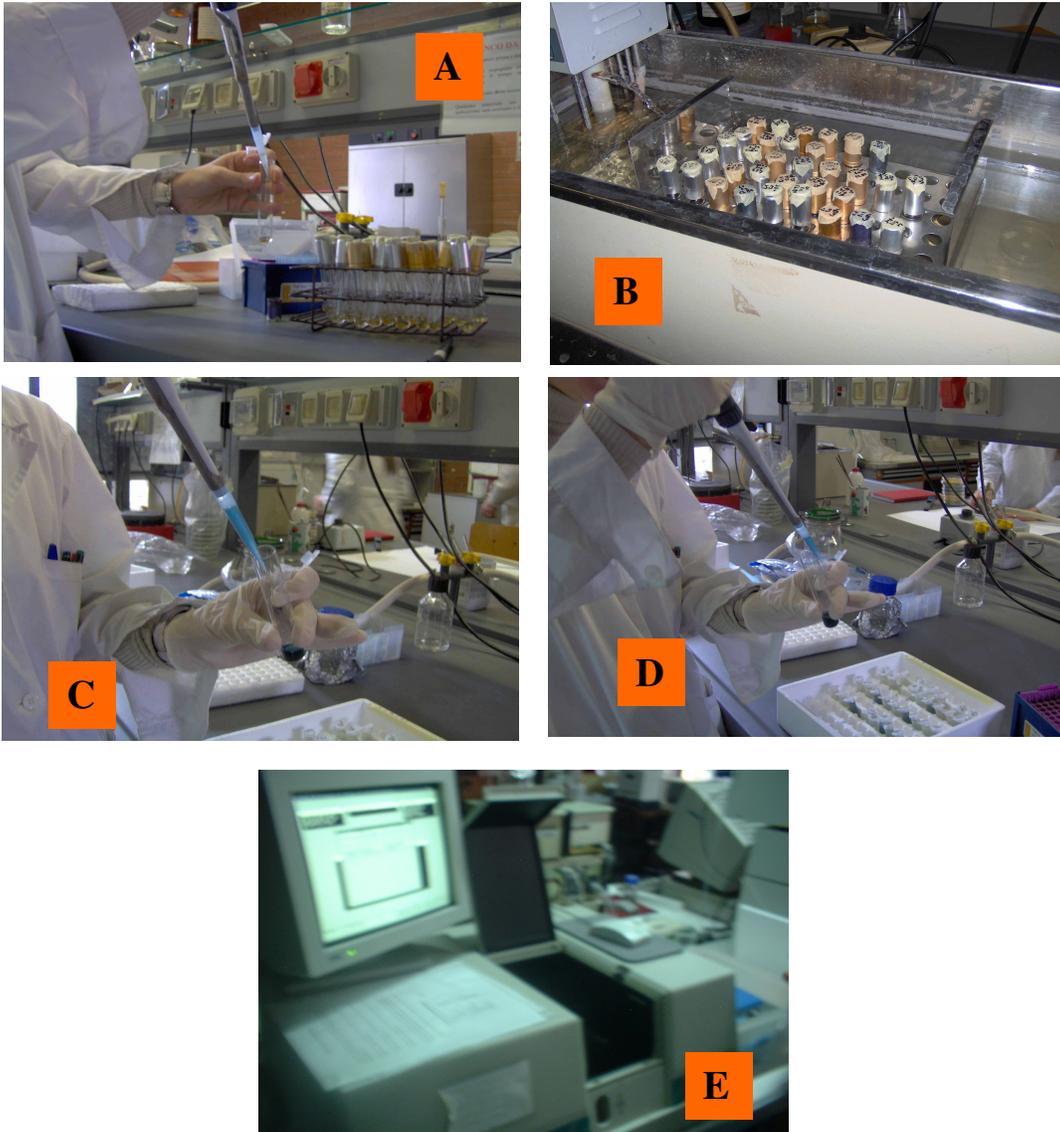


Figura 3. Saggio di produzione delle fitasi in mezzo liquido: **A** (aggiunta del substrato di reazione); **B** (incubazione a 37°C); **C** (aggiunta del reagente colorato); **D** (prelievo della miscela); **E** (misurazione dell'assorbanza a 700 nm).



Figura 4. Alcune fasi dell'estrazione dei minerali liberi: **A** (omogeneizzazione meccanica per 4 ore a temperatura ambiente); **B** (centrifugazione a 5000 rpm per 10 minuti a 20°C).

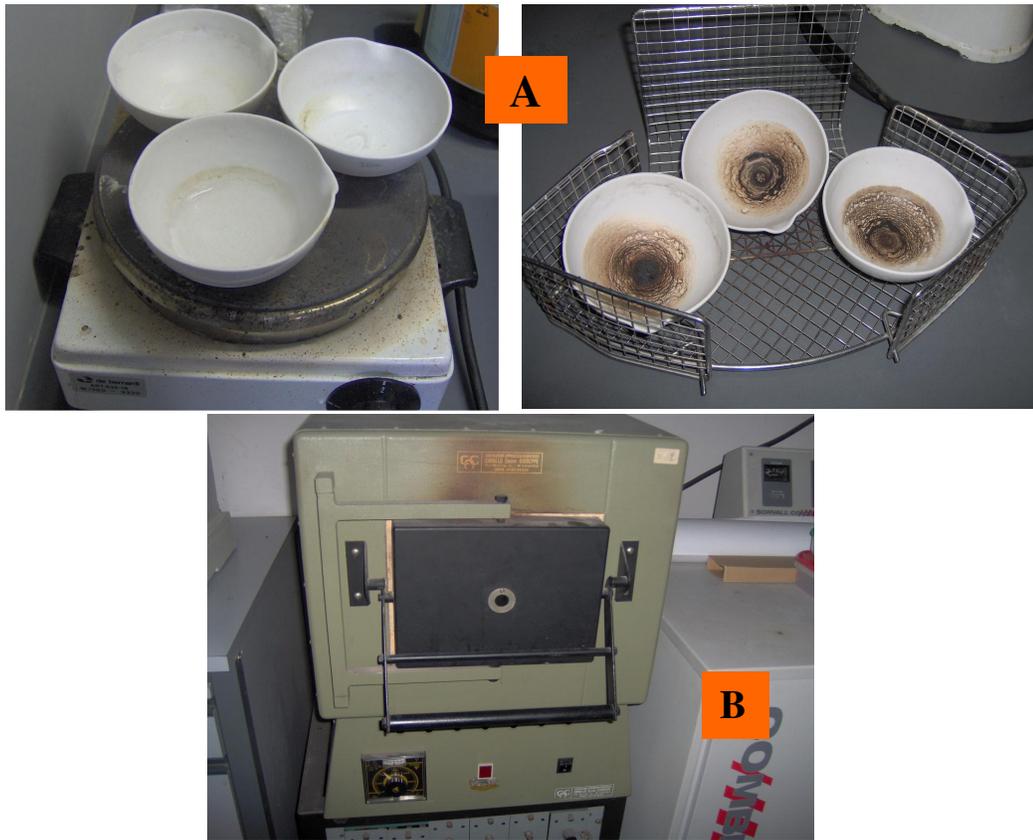


Figura 5. Capsule di porcellana a secco su piastra (A) durante il processo di incenerimento effettuato in muffola a 450°C (B).



Figura 6. Lettura all'assorbimento atomico Shimadzu – 6800.

Tabella 6. Attività fitasica in substrato solido di ceppi di *Bacillus* isolati da pane.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio		Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24h	48 h			
A1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	+ 10mm
A2	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	+/-	-	-
A3	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
A4	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	+/-	-
A5	<i>Bacillus</i> spp.	+/-	+	-	-	+ 12mm
B1	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	/	-	-	.
B2	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	/	-	+	+ 7mm
C1	<i>Bacillus subtilis</i>	+/-	+	-	-	-
C2	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	+/-	-	-
C3	<i>Bacillus</i> spp.	+	/	-	-	-
C4	<i>Bacillus</i> spp.	+	/	-	-	-
C5	<i>Bacillus</i> spp.	+	/	-	-	-
C7	<i>Bacillus</i> spp.	+	/	-	-	-
D1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
E1	<i>Bacillus</i> spp.	non cresciuto		/	/	/

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 6. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi di *Bacillus* isolati da pane.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio		Attività* fitasica	Attività† fitasica	Attività# fitasica (mm alone)
		24 h	48 h			
F1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
G1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
G2	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
G3	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	+	-	-
I1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
L1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	+ 11mm
L2	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	+ 9mm
BM1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
N1	<i>Bacillus</i> spp.	-	+	-	-	-
P2	<i>Bacillus subtilis</i>	+/-	+	-	-	-
P4	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	+/-	-	-
P5	<i>Bacillus subtilis</i>	No cresc.in Ch.brodo		/	/	/
P6	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
Q1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
Q2	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 6. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi di *Bacillus* isolati da pane.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio		Attività* fitasica	Attività† fitasica	Attività# fitasica (mm alone)
		24 h	48 h			
R1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
T1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
U1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
U2	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
V1	<i>Bacillus</i> spp.	+	/	-	-	-
K1	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-	-	-
K2	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
S1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
S5	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	+/-	-	-
S6	<i>Bacillus subtilis</i>	+/-	+	-	-	-
S9	<i>Bacillus</i> spp.	+	/	-	-	-
S12	<i>Bacillus</i> spp.	+	/	-	-	-
S13	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	+/-	-	-
S14	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	+ 5mm
S17	<i>Bacillus</i> spp.	+	/	-	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 6. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi di *Bacillus* isolati da pane.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio		Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h			
S19	<i>Bacillus</i> spp.	+	/	-	-	-
MP-3T30	<i>Bacillus</i> spp.	+	/	-	-	-
RopeTT	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	+/-	-	+ 17mm
P36	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
V25	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
O37	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	+/-	-
Rope T1	<i>Bacillus subtilis</i>	+/-	+	-	+	-
BB3	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
S8	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
S2	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
S15	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
S3	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-	-	-
S11	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	+/-	-
S10	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
S20	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 6. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi di *Bacillus* isolati da pane.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio		Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h			
RRin47	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-	-	-
RopeC/18	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-	-	-
Pancarrè58	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	+/-	-	-
R456	<i>Bacillus subtilis</i>	+	/	-	-	-
M1/13	<i>Bacillus subtilis</i>	+/-	+	-	-	-
R2Rin30	<i>Bacillus</i> spp.	+/-	+	-	-	-
M1	<i>Bacillus</i> spp.	+/-	+	-	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 7. Attività fitasica in substrato solido di ceppi appartenenti al genere *Enterococcus* e di probiotici isolati da feci di neonati e salami rispettivamente.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio		Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h			
OS14	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	/	+	+ 6mm	-
OS17	<i>Ent. faecalis</i>	+	/	+	+ 6mm	-
PS23	<i>Ent. faecalis</i>	+	/	+	-	-
TS57	<i>Ent. faecalis</i>	+	/	+	-	-
US69	<i>Ent. faecalis</i>	+	/	+	+ 10mm	+ 8mm
ZS71	<i>Ent. faecalis</i>	+	/	+	+ 6mm	-
NS10	<i>Ent. faecium</i>	+	/	+	+ 7mm	+ 7mm
ES3	<i>Ent. faecium</i>	+	/	+	+ 8mm	+ 8mm
NS11	<i>Ent. faecium</i>	+	/	+	+ 8mm	+ 8mm
NS9	<i>Ent. faecium</i>	+	/	+	+ 8mm	+ 8mm
ES5	<i>Ent. faecium</i>	+	/	+	+ 8mm	+ 8mm
GL3	<i>Lactobacillus brevis</i>	+	/	-	-	-
GL2	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	-	-	-
CL9	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	-	-	-
AL2	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	-	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 7. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi appartenenti al genere *Enterococcus* e di probiotici isolati da feci di neonati e salami rispettivamente.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio		Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h			
AL5	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	-	-	-
CL6	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	-	-	-
CL5	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	-	-	-
FL2	<i>Lb. pentosus</i>	+	/	-	-	-
EL7	<i>Lb. paracasei sp. paracasei</i>	+	/	+	+ 6mm	+ 6mm
DL6	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	-	-	-
BL6	<i>Lb. brevis</i>	+	/	-	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 8. Attività fitasica in substrato solido di ceppi di batteri lattici e lieviti isolati da sourdough ed impasti per pizza.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	72 h			
M42	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
T231	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	+/- 3 mm	-
M230	<i>Lc. sp.</i>	+	/	/	+	-	-
M178	<i>Lc. sp.</i>	+	/	/	+	-	-
T229	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	+	/	/	+	-	-
T9	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	+ 4 mm
T73	<i>Lb. sakei</i>	-	-	-	-	-	-
G11	<i>Lb. paracasei</i>	-	-	-	-	-	-
LM204b	<i>Lc. sp.</i>	-	-	-	-	-	-
G18	<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	-	-	-	-	-
E1	<i>Lb. paracasei</i>	-	-	-	-	-	-
T34	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	+ 7 mm
T65	<i>Lb. sakei</i>	+	/	/	+	-	-
G15	<i>Weissella paramesenteroides</i>	+	/	/	+	-	-
T201	<i>Lc. sp.</i>	+	/	/	+	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 8. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi di batteri lattici e lieviti isolati da sourdough ed impasti per pizza.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	72 h			
T64	<i>Lb. sakei</i>	+	/	/	-	-	-
T211	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	+ 13 mm
T43	<i>Weissella paramesenteroides</i>	+	/	/	+	-	+ 10 mm
E7	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
M39	<i>Ln. gelidum</i>	+	/	/	+	-	-
LM55	<i>Lc. lactis sub. cremoris</i>	+	/	/	+	+/- 3 mm	-
LM208	<i>Ln. pseudomonas</i>	+	/	/	+	-	-
G14	<i>Weissella paramesenteroides</i>	+	/	/	+	+/- 3 mm	+ 7 mm
LM51	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	+	/	/	+	+/- 3 mm	-
M77	<i>Lb. sakei</i>	+	/	/	-	-	-
G33	<i>Weissella paramesenteroides</i>	+	/	/	+	+ 7 mm	+ 8 mm
E10	<i>Lb. pentosus</i>	+	/	/	+/-	-	-
LM47	<i>Lb. sakei</i>	+	/	/	+	-	-
LM10	<i>Lc. garviae</i>	+	/	/	+	+ 8 mm	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 8. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi di batteri lattici e lieviti isolati da sourdough ed impasti per pizza.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività† fitasica	Attività# fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	72 h			
LM249	<i>Ln. gelidum</i>	+	/	/	-	-	-
LM177	<i>Lb. alimentarius</i>	+	/	/	+	+ 5 mm	+ 5 mm
LA17	<i>Ln. carnosum</i>	+	/	/	+	+ 7 mm	-
LA20	<i>Lc. lactis</i>	+	/	/	+	+ 5 mm	-
LA23	<i>Lc. spp.</i>	+	/	/	+	+ 7 mm	-
LA18	<i>Lb. viridescens</i>	+	/	/	+	+/- 5 mm	+ 8 mm
LA14	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	+	/	/	+	+ 5 mm	-
A28	<i>Ln. dextranicum</i>	+	/	/	+	-	-
Q3	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
K22	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
K14	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	+/- 6mm
H22	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
H19	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
H7	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
L5	<i>Lb. curvatus</i>	+	/	/	+/-	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 8. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi di batteri lattici e lieviti isolati da sourdough ed impasti per pizza.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	72 h			
A3	<i>Ln. gelidum</i>	+	/	/	+	+ 5 mm	-
A27	<i>Ln. mesenteroides</i>	+	/	/	+	-	+/- 3 mm
T238	<i>Lb. pentosus</i>	+	/	/	+	+ 5 mm	+ 5 mm
LM8	<i>Lb. alimentarius</i>	+	/	/	+/-	-	-
LM197	<i>Lc. sp.</i>	+	/	/	+	-	-
LM6	<i>Lc. garviae</i>	+	/	/	+	-	-
LM196	<i>Lc. lactis</i>	+	/	/	+	-	+ 9 mm
LM215	<i>Lb. paracasei</i>	+	/	/	+	-	-
LM227	<i>Lb. sakei</i>	+	/	/	+	-	+ 10 mm
T228	<i>Lb. paracasei</i>	+	/	/	+	+/- 3 mm	-
E4	<i>Lb. pentosus</i>	+	/	/	+	-	-
T258	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	-	-	-	/	/	/
T40	<i>Lc. sp.</i>	+	/	/	+	-	-
E6	<i>Lc. sp.</i>	+	/	/	+/-	-	-
E2	<i>Lb. sakei</i>	-	-	-	/	/	/

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 8. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi di batteri lattici e lieviti isolati da sourdough ed impasti per pizza.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	72 h			
LA15	<i>Lc. sp.</i>	-	-	-	/	/	/
A4	<i>Ln. oenos</i>	+	/	/	+/-	-	-
A58	<i>Weissella paramesenteroides</i>	+	/	/	+	+/- 6 mm	+ 5 mm
A93b	<i>Ln. gelidum</i>	+	/	/	+	+/- 6 mm	+ 5 mm
A78	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	+	/	/	-		
T33	<i>Lc. lactis</i>	+	/	/	+	+ 5 mm	+ 6 mm
G17	<i>Lc. sp.</i>	+	/	/	+	-	
G35	<i>Weissella</i>	-	-	-	/	/	/
G12	<i>Lb. rhamnosus</i>	+/-	+	/	+	-	-
G13a	<i>Lb. minor</i>	-	-	-	/	/	/
K13	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	+/- 3 mm	+ 7 mm
H10	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	-	-	-
H8	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	-	-	-
T56	<i>Lb. sakei</i>	+	/	/	+	-	-
H6	<i>Lb. brevis</i>	+	/	/	+	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 8. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi di batteri lattici e lieviti isolati da sourdough ed impasti per pizza.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	72 h			
LA21	<i>Lc. lactis sub. cremoris</i>	+	/	/	+	-	-
A23	<i>Ln. sp.</i>	+	/	/	+	-	-
E30	<i>Lc. lactis sub. raffinolactis</i>	+	/	/	+	-	-
LM264a	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	-	+	/	+	-	-
T58	<i>Lb. sakei</i>	-	-	+	+	-	-
A64	<i>Weissella paramesenteroides</i>	+	/	/	+	-	-
A32	<i>Lb. confusus</i>	+	/	/	+	-	-
A35	<i>Lb. confusus</i>	+	/	/	+	-	-
A39	<i>Lb. confusus</i>	+	/	/	+	-	-
A24	<i>Ln. mesenteroides</i>	+	/	/	+	-	-
H14	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+/-	-	+/- 8mm
K21	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	+/- 12mm
H5	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	+ 7 mm	+ 11 mm
L3	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	+ 10 mm
Q2	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	+/- 5 mm	+ 9 mm

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 8. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi di batteri lattici e lieviti isolati da sourdough ed impasti per pizza.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	72 h			
M40	<i>Lc. sp.</i>	+	/	/	+	-	-
A16	<i>Ln. gelidum</i>	+	/	/	+	+/- 7 mm	+/- 7 mm
A65	<i>Ln. mesenteroides</i>	+	/	/	+	+/- 5 mm	+/- 8 mm
A72	<i>Ln. gelidum</i>	+	/	/	+	-	-
A7	<i>Ln. dextranicum</i>	+	/	/	+	+/- 5 mm	-
LA25	<i>Lc. sp.</i>	+	/	/	-	-	-
LM66	<i>Lc. garviae</i>	+	/	/	+	-	-
A31	<i>Ln. dextranicum</i>	+	/	/	+	-	-
A8	<i>Ln. gelidum</i>	+	/	/	+	-	-
A90	<i>Ln. dextranicum</i>	+	/	/	+	+ 6 mm	-
A57	<i>Ln. mesenteroides</i>	+	/	/	+	-	-
A43	<i>Ln. gelidum</i>	+	/	/	+	-	-
A49	<i>Ln. gelidum</i>	+	/	/	+	-	-
A30	<i>Ln. gelidum</i>	+	/	/	+	-	-
A9	<i>Ln. oenos</i>	+	/	/	-	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 8. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi di batteri lattici e lieviti isolati da sourdough ed impasti per pizza.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	72 h			
A51	<i>Weissella paramesenteroides</i>	+	/	/	+	+/- 6 mm	+ 7 mm
A12	<i>Weissella paramesenteroides</i>	+	/	/	+	+ 7 mm	+/- 3 mm
A52	<i>Ln. mesenteroides</i>	+	/	/	+	-	-
A86	<i>Enterococcus faecium</i>	+	/	/	+	+ 6 mm	+ 7 mm
A269	<i>Weissella paramesenteroides</i>	+	/	/	+	-	-
A40	<i>Lb. confusus</i>	+	/	/	+/-	-	-
H13	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
L2	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
H12	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
H2	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
H16	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
H11	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
H3	<i>Lb. plantarum</i>	-	+	/	+	-	-
H20	<i>Lb. plantarum</i>	-	+	/	+	-	-
H9	<i>Lb. plantarum</i>	-	+	/	+	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 8. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi di batteri lattici e lieviti isolati da sourdough ed impasti per pizza.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività† fitasica	Attività# fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	72 h			
L6	<i>Lb. plantarum</i>	-	+	/	+	-	+/- 6mm
H4	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	-	-	-
M47	<i>Lc. sp.</i>	+	/	/	-	-	-
LM210	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	+	/	/	+/-	-	-
E5	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+/-	-	-
G16	<i>Weissella paramesenteroides</i>	+	/	/	+	-	-
A29	<i>Ln. amelibiosum</i>	+	/	/	+	-	-
M207	<i>Lb. sanfranciscensis</i>	+	/	/	+	-	-
L8	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
H21	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
A21	<i>Ln. amelibiosum</i>	+	/	/	+	-	-
H17	<i>Lb. plantarum</i>	+	/	/	+	-	-
A19	<i>Lc. sp.</i>	+	/	/	+	-	-
E3	<i>Lb. sp.</i>	+	/	/	+	-	-
A25	<i>Ln. gelidum</i>	+	/	/	-	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 8. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi di batteri lattici e lieviti isolati da sourdough ed impasti per pizza.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	72 h			
A93a	NI	-	-	-	/	/	/
E28	NI	-	-	-	/	/	/
A13	NI	-	-	-	/	/	/
A36	NI	-	-	-	/	/	/
A68	<i>Candida</i> sp.	+	/	/	-	-	-
M15b	<i>S. cerevisiae</i>	+	/	/	-	-	-
LM266	<i>Dekkera intermedia</i>	+	/	/	-	-	-
T23	<i>Candida versatilis</i>	+	/	/	-	-	-
G271	<i>Candida krusei</i>	+	/	/	-	-	-
T226	<i>S. cerevisiae</i>	+	/	/	-	-	-
K7	<i>Candida sphaerica</i> 2	+	/	/	-	-	-
R9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2	+	/	/	-	-	-
S3	<i>S. cerevisiae</i>	+	/	/	-	-	-
F3	<i>Candida</i> sp.	+	/	/	+	+/- 5 mm	-
R2	<i>Candida</i> sp.	+	/	/	/	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 8. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi di batteri lattici e lieviti isolati da sourdough ed impasti per pizza.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	72 h			
H1	<i>Candida pelliculosa</i>	+	/	/	-	-	-
K1	<i>Candida sphaerica 2</i>	+	/	/	+/-	-	-
R4	<i>Candida pelliculosa</i>	+	/	/	+	+ 9mm	+/- 5mm
C1	<i>Candida pelliculosa</i>	+	/	/	-	-	-
P2	<i>Rhodotorula mucillaginosa</i>	+	/	/	-	-	-
Z2	<i>S. cerevisiae</i>	+	/	/	-	-	-
D3	<i>Candida sp.</i>	-	+	/	+	-	-
PP3	<i>S. cerevisiae</i>	+	/	/	+/-	-	-
L4	<i>Candida versatilis</i>	+	/	/	-	-	-
T22	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	/	/	-	-	-
K5	<i>Candida pelliculosa</i>	+	/	/	-	-	-
F4	<i>Rhodotorula mucillaginosa</i>	+	/	/	-	-	-
Z5	<i>Candida sp.</i>	+	/	/	-	-	-
D4	<i>Candida pelliculosa</i>	+	/	/	-	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 8. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi di batteri lattici e lieviti isolati da sourdough ed impasti per pizza.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	72 h			
R7	<i>Candida pelliculosa</i>	+	/	/	-	-	-
LM262	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	/	/	-	-	-
G23	<i>Candida pelliculosa</i>	+	/	/	-	-	+/- 6mm
R3	<i>Candida pelliculosa</i>	+	/	/	+	+ 9mm	+ 8mm
L1	<i>Pro. Wicker.</i>	+	/	/	-	-	-
K10	<i>Saccharomyces cerevisiae 2</i>	+	/	/	-	-	-
L2	<i>Candida zeylanoides</i>	+	/	/	-	-	-
R1	<i>Candida sp.</i>	+	/	/	-	-	-
F2	<i>S. cerevisiae</i>	+	/	/	-	-	-
F1	<i>Saccharomyces cerevisiae 2</i>	+	/	/	-	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 9. Attività fitasica in substrato solido di ceppi potenziali azotofissatori isolati da suolo e compost.

Ceppi	Origine	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	> 48 h			
73D	Suolo	-	+	/	-	-	-
60A	Suolo	-	+	/	-	-	-
64	Suolo	-	+	/	-	-	-
27	Suolo	-	+	/	+	+ 4mm	+ 9mm
48B	Suolo	-	+	/	+	+ 11mm	+ 11mm
76A	Suolo	-	+	/	-	-	-
30C	Suolo	-	+	/	-	-	-
47A	Suolo	-	+	/	+	+ 4mm	+ 10mm
72A	Suolo	-	+	/	+	+ 5mm	+ 5mm
74	Suolo	-	+	/	+	+ 5mm	+ 12mm
50	Suolo	-	+	/	-	-	-
51C	Suolo	-	+	/	-	-	-
43	Suolo	-	+	/	-	-	-
56	Suolo	-	+	/	-	-	-
51A	Suolo	-	+	/	-	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 9. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi potenziali azotofissatori isolati da suolo e compost.

Ceppi	Origine	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	> 48 h			
58	Suolo	-	+	/	-	-	-
55	Suolo	-	+	/	-	-	-
53	Suolo	-	+	/	-	-	-
67B	Suolo	-	+	/	-	-	-
59B	Suolo	-	+	/	-	-	-
30B	Suolo	-	+	/	-	-	-
57	Suolo	-	+	/	-	-	-
52	Suolo	-	+	/	-	-	-
59C	Suolo	-	+	/	-	-	-
70B	Suolo	-	+	/	-	-	-
59A	Suolo	-	+	/	-	-	-
30A	Suolo	-	+	/	-	-	-
77B	Suolo	-	+	/	-	-	-
47B	Suolo	-	+	/	+	+ 4mm	+ 4mm
42	Suolo	-	+	/	+	+ 4mm	+ 4mm

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 9. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi potenziali azotofissatori isolati da suolo e compost.

Ceppi	Origine	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	> 48 h			
54	Suolo	-	+	/	+	+ 9mm	+ 9mm
45	Suolo	-	+	/	-	-	-
51B	Suolo	-	+	/	-	-	-
46	Suolo	-	+	/	+	+ 4mm	+ 3mm
79	Suolo	-	+	/	-	-	-
39B	Suolo	-	+	/	-	-	-
20	Compost	-	-	+	-	-	-
28	Suolo	-	-	+	+	-	-
14	Compost	-	-	+	-	-	-
11	Compost	-	-	+	-	-	-
29	Suolo	-	-	+	-	-	-
15	Compost	-	-	+	-	-	-
13	Compost	-	-	+	-	-	-
67A	Suolo	-	-	+	-	-	-
77A	Suolo	-	-	+	-	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 9. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi potenziali azotofissatori isolati da suolo e compost.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	> 48 h			
78B	Suolo	-	-	+	-	-	-
31	Suolo	-	-	+	-	-	-
34	Suolo	-	-	+	+	-	-
8	Compost	-	-	+	+	-	-
32	Suolo	-	-	+	-	-	-
25	Compost	-	-	+	+	-	-
18	Compost	-	-	+	-	-	-
76B	Suolo	-	-	+	-	-	-
6	Compost	-	-	+	+	-	-
22	Compost	-	-	+	+	-	-
33	Suolo	-	-	+	-	-	-
26	Compost	-	-	+	-	-	-
63	Suolo	-	-	+	-	-	-
19	Compost	-	-	+	-	-	-
12	Compost	-	-	+	-	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 9. (continua) Attività fitasica in substrato solido di ceppi potenziali azotofissatori isolati da suolo e compost.

Ceppi	Specie	Crescita in Chalmers brodo con fitato di sodio			Attività* fitasica	Attività [†] fitasica	Attività [#] fitasica (mm alone)
		24 h	48 h	> 48 h			
9	Compost	-	-	+	-	-	-
17	Compost	-	-	+	-	-	-
66	Suolo	-	-	+	-	-	-
30	Suolo	-	-	+	-	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 10. Attività fitasica in substrato solido di muffe isolate da pane.

Ceppi	Specie	Attività* fitasica	Attività† fitasica	Attività# fitasica (mm alone)
25	<i>Mucor</i> spp.	-	-	-
26	<i>Mucor</i> spp.	-	-	-
34	<i>Mucor</i> spp.	-	-	-
13	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-
10	<i>Aspergillus niger</i>	+	+ 6mm	-
31	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-
24	<i>Mucor</i> spp.	-	-	-
36	<i>Mucor</i> spp.	-	-	-
40	<i>Mucor</i> spp.	-	-	-
3	<i>Aspergillus niger.</i>	+	+ 2mm	+ 6mm
29	<i>Mucor</i> spp.	-	-	-
35	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-
33	<i>Aspergillus niger</i>	+	+ 4.5mm	-
18	<i>Aspergillus niger</i>	+	+ 3mm	-
27	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-
28	<i>Penicillium</i> spp.	-	-	-
38	<i>Aspergillus niger</i>	+	+ 8mm	+ 8mm
4	<i>Mucor</i> spp.	-	-	-
23	<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	+/- 4mm

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

Tabella 10. (continua) Attività fitasica in substrato solido di muffe isolate da pane.

Ceppi	Specie	Attività* fitasica	Attività† fitasica	Attività# fitasica (mm alone)
12	<i>Mucor</i> spp.	-	-	-
14	<i>Penicillium</i> spp.	-	-	-
15	<i>Mucor</i> spp.	-	-	-
16	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+ 9mm	+ 10mm
2	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-
20	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-
21	<i>Penicillium</i> spp.	-	-	-
19	<i>Mucor</i> spp.	-	-	-
39	<i>Aspergillus niger</i>	+	+ 6mm	+ 10mm
37	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-
32	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-
17	<i>Penicillium</i> spp.	-	-	-
22	<i>Penicillium</i> spp.	-	-	-
9	<i>Mucor</i> spp.	-	-	-
5	<i>Mucor</i> spp.	-	-	-
8	<i>Mucor</i> spp.	+	-	-

* = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio prima del trattamento con CoCl₂.

† = Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo trattamento con CoCl₂.

= Attività fitasica in Agar-Chalmers con fitato di calcio dopo tre giorni di incubazione a temperatura ambiente.

Sono mostrati solo i ceppi microbici che hanno dato attività.

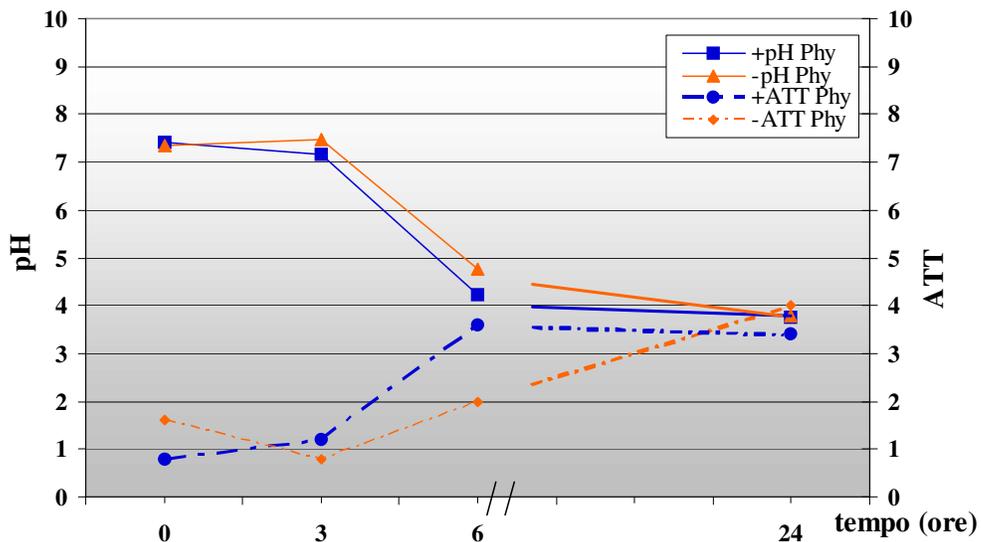


Figura 10. Acidità titolabile totale e pH di impasti preparati con farina bianca e starter microbici.

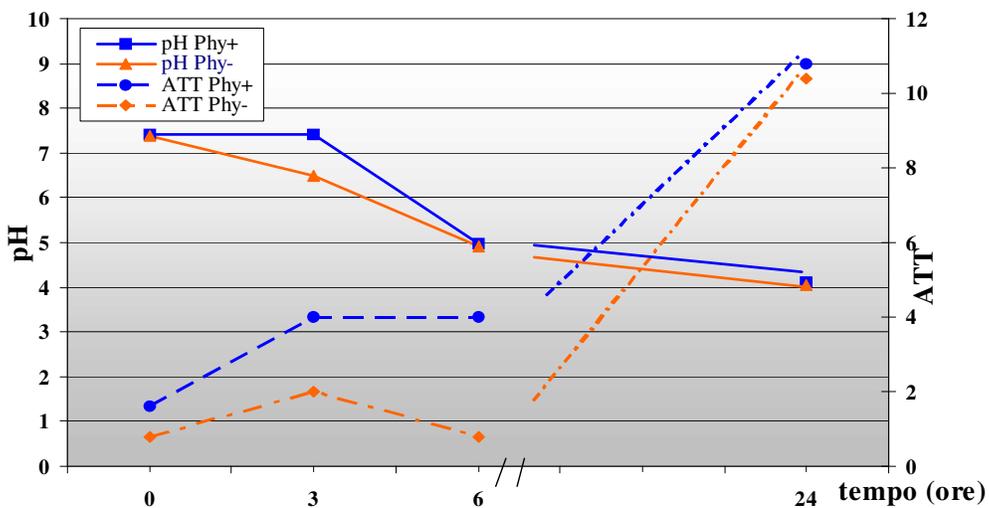


Figura 11. Acidità titolabile totale e pH di impasti preparati con farina integrale e starter microbici.

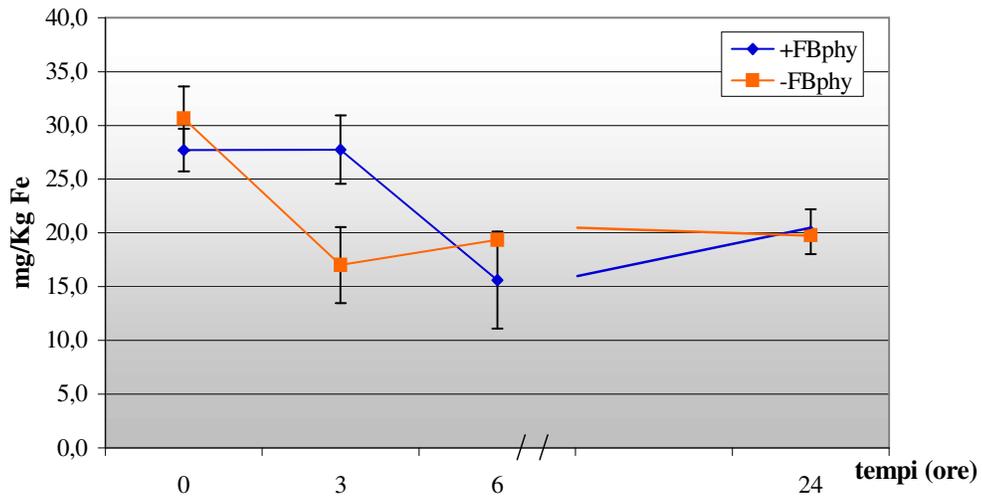


Figura 12. Effetto di uno starter fitasi positivo e negativo sulla solubilità del ferro durante la fermentazione di impasti preparati con farina bianca

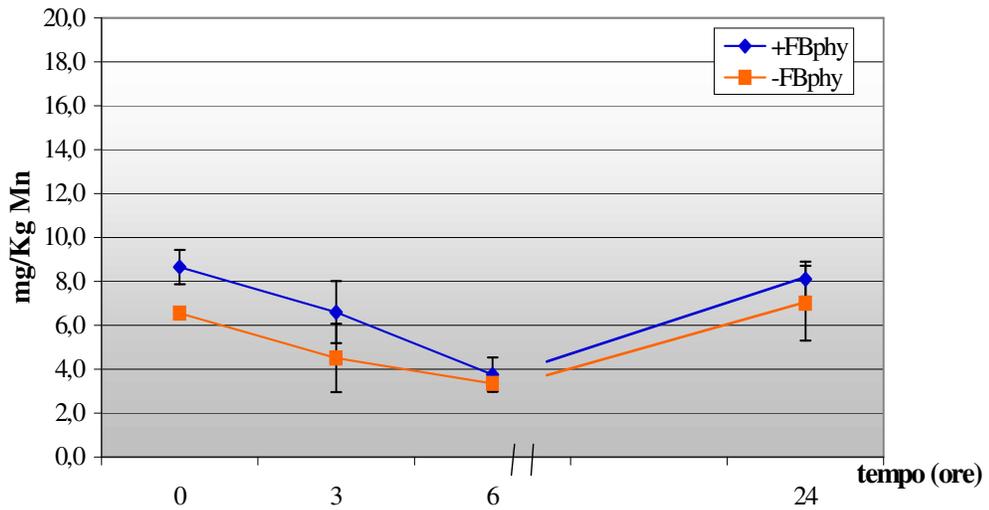


Figura 13. Effetto di uno starter fitasi positivo e negativo sulla solubilità del manganese durante la fermentazione di impasti preparati con farina bianca.

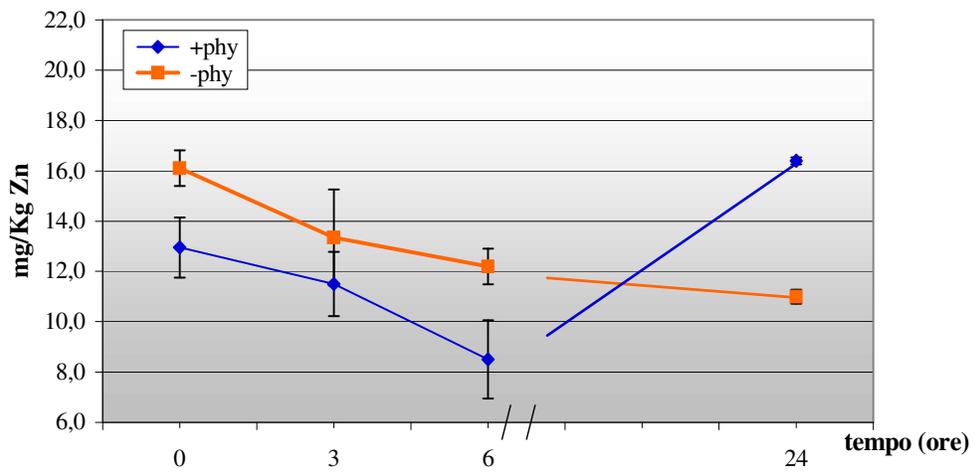


Figura 14. Effetto di uno starter fitasi positivo e negativo sulla solubilità dello zinco durante la fermentazione di impasti preparati con farina bianca.

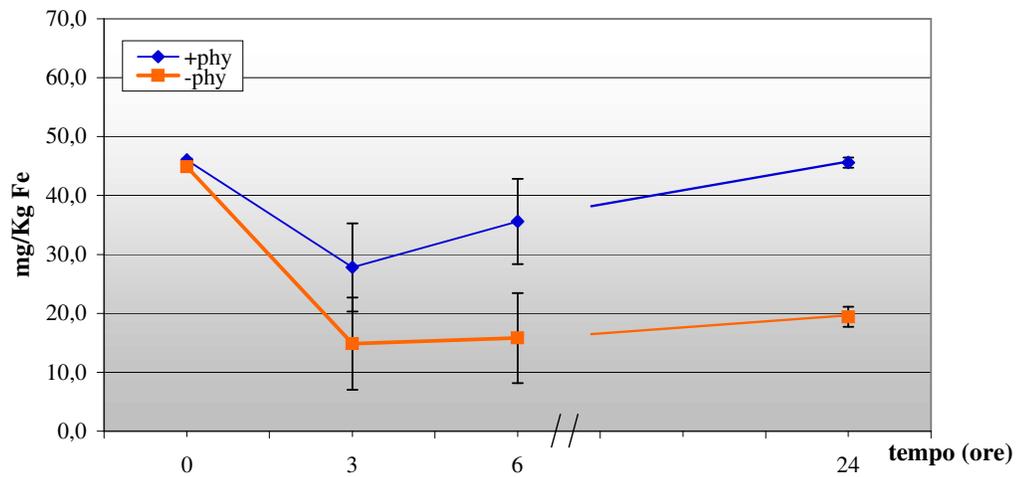


Figura 15. Effetto di uno starter fitasi positivo e negativo sulla solubilità del ferro durante la fermentazione di impasti preparati con farina integrale.

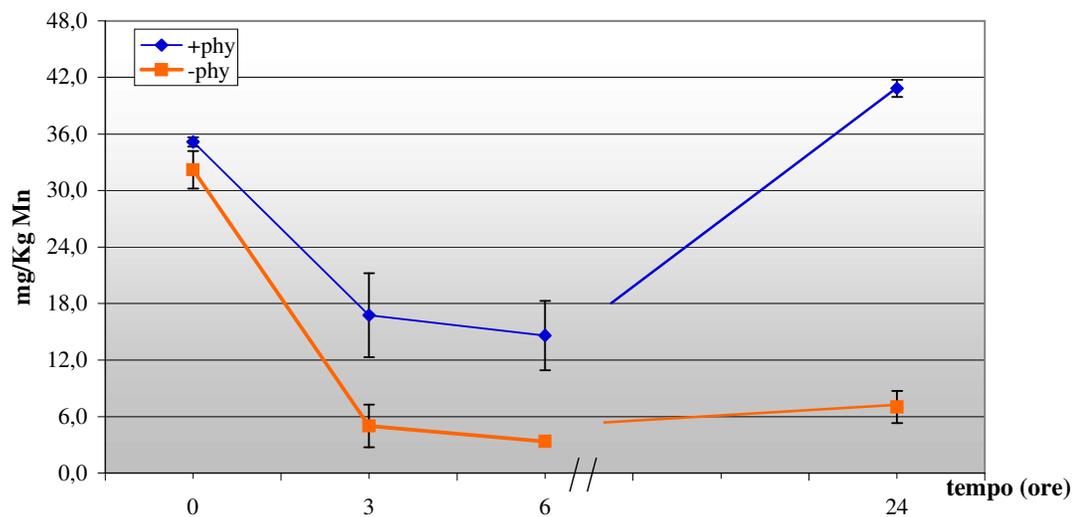


Figura 16. Effetto di uno starter fitasi positivo e negativo sulla solubilità del manganese durante la fermentazione di impasti preparati con farina integrale.

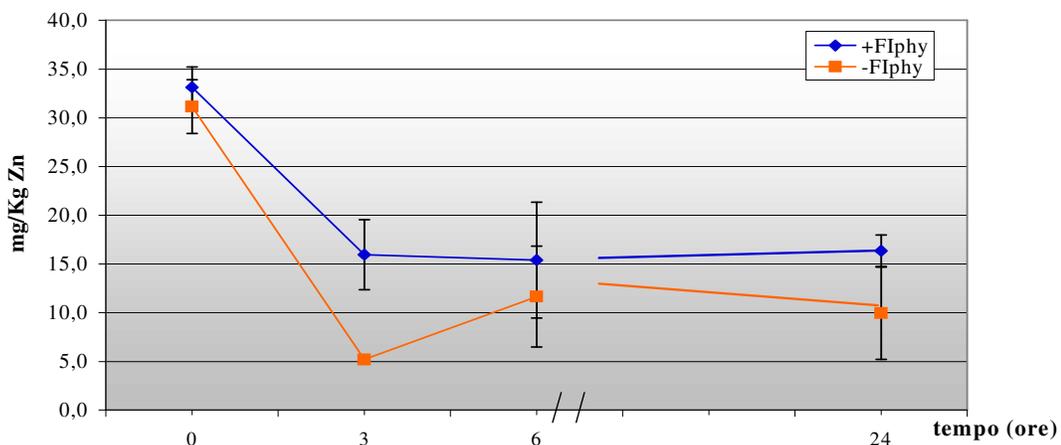


Figura 17. Effetto di uno starter fitasi positivo e negativo sulla solubilità dello zinco durante la fermentazione di impasti preparati con farina integrale.