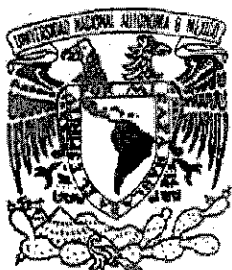
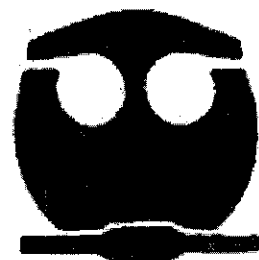


030883



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIOS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN
DE FITASAS EN *Raoultella terrigena* comb. nov.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A:
M. EN I. B. B. MARCELA ZAMUDIO MAYA**

ASESOR DE TESIS: DR. FERNANDO BASTARRACHEA AVILÉS

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Para Daniel, Andrés y Hugo
por ser mi fuente de inspiración.*

Agradezco a mis padres,
Emilio[†] y María de la Luz,
por todo el amor y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de la manera más sincera a las siguientes personas e instituciones:

Para el Doctor Fernando Bastarrachea Avilés y la Doctora Amelia Farrés González-Saravia mi más profundo agradecimiento por toda la ayuda, asesoría y paciencia que me brindaron y que hicieron posible la realización de este trabajo.

Para el Doctor Agustín López Munguía, mi mejor reconocimiento por la ayuda y asesoría brindada como miembro del comité tutorial y como miembro del sínodo final. Para los otros miembros del sínodo, Doctores Irma Bernal Lugo, Carmen Gómez Eichelmann, Sergio Sánchez Esquivel, María del Carmen Wachter Rodarte, Alicia González Manjares y Laura Kawasaki Watanabe, vaya también mi agradecimiento por sus comentarios y asesoría.

A las autoridades de la Universidad Autónoma de Yucatán, en especial de la Facultad de Ingeniería Química y particularmente, al I.Q. Jorge Antonio Lechuga Andrade por el apoyo y las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo. Al CONACYT por el apoyo otorgado a través de la Cátedra Patrimonial de Excelencia Nivel II para estudios de posgrado. A la Secretaría de Educación Pública por el apoyo otorgado a través del programa PROMEP. This work has been supported by the International Foundation for Science (grant E/2392-1).

Un agradecimiento especial para la Doctora Rossana Rodríguez Canul del CINVESTAV-IPN, Unidad Mérida, por brindarme apoyo y parte de su tiempo y experiencia para el análisis de PCR. Asimismo, a la Q.I. Wendy Díaz Osorio por el apoyo técnico al inicio de este trabajo y a la Q.I. Araceli González Burgos sin cuya amistad y apoyo técnico no hubiera sido posible la conclusión del trabajo experimental. A mis amigos todos, que me brindaron apoyo y comprensión. Por último, a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización de esta tesis.

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO I.- Introducción	1
CAPÍTULO II.- Antecedentes	
II.1 Generalidades de las fitasas	2
II.2 Mecanismo de acción de las fitasas	5
II.3 Fuentes de las fitasas	5
II.4 Aplicaciones de las fitasas	6
II.5 Fitasa de <i>Raoultella terrigena</i> comb. nov.	7
II.6 Fitasas en el metabolismo celular.	8
II.7 Regulación de la expresión de fitasas en microorganismos.	9
II.8 Referencias	11
CAPÍTULO III.- Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de la actividad de fitasa en células de <i>Raoultella terrigena</i> comb. nov.	
III.1 Introducción	16
III.2 Material y Métodos	
III.2.1 Microorganismo	18
III.2.2 Medios y condiciones de cultivo	18
III.2.3 Evaluación de la actividad de fitasa intracelular.	
III.2.3.1 Obtención del extracto enzimático	18
III.2.3.2 Ensayo enzimático	18
III.2.3.3 Cuantificación de proteína	19
III.3 Resultados	19
III.4 Discusión	21
III.5 Referencias	22
CAPÍTULO IV.- Efecto del AMPc y RpoS en la expresión de la fitasa de <i>Raoultella terrigena</i> comb. nov.	
IV.1 Introducción	25
IV.2 Material y Métodos	
IV.2.1 Microorganismos	27
IV.2.2 Medios de cultivo.	28
IV.2.3 Aislamiento de células de <i>Raoultella terrigena</i> comb. nov. sensibles al bacteriófago P1	28
IV.2.4 Ensayo de sobrevivencia.	29
IV.2.5 Ensayo de osmotolerancia	29

IV.2.6 Evaluación de la actividad de fitasa intracelular	29
IV.3 Resultados	
IV.3.1 Efecto de Cya en la expresión de fitasa.	30
IV.3.2 Efecto de RpoS en la expresión de fitasa	33
IV.4 Discusión	36
IV.5 Referencias	37
CAPÍTULO V.- Regulación y probable papel de la fitasa en el metabolismo celular de <i>R. terrigena</i> comb. nov.	
V.1 Introducción	39
V.2 Material y Métodos	
V.2.1 Microorganismos	40
V.2.2 Medios y condiciones de cultivo.	40
V.2.3 Evaluación de la actividad de fitasa intracelular.	
V.2.3.1 Obtención del extracto enzimático	41
V.2.3.2 Ensayo enzimático	41
V.2.3.3 Cuantificación de proteína	41
V.2.4 Obtención de mutantes <i>phy::Mud I1734</i> .	41
V.2.5 Selección de colonias mutantes sin actividad de fosfatasa ácida.	43
V.2.6 Evaluación de la actividad de β -galactosidasa.	43
V.2.7 Confirmación de la inserción del elemento <i>Mud I1734</i>	44
V.2.8 Amplificación del ADN	44
V.2.9 Aislamiento del ADN genómico	44
V.2.10 Secuenciación nucleotídica	44
V.3 Resultados	
V.3.1 Aislamiento de mutantes <i>phy::Mud I1734</i>	45
V.3.2 Confirmación de la inserción del <i>Mud I1734</i> en el gene de fitasa.	45
V.3.3.- Caracterización fenotípica de mutantes <i>phy::Mud I1734</i>	49
V.3.4 Expresión de β -galactosidasa en cepas <i>phy::Mud I1734</i>	51
V.4 Discusión	54
V.5 Referencias	57
CAPÍTULO VI.- Conclusiones generales	60
Anexo I.- Artículo "Regulation of <i>Raoultella terrigena</i> comb. nov. phytase expresión"	61

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro II.1.- Propiedades de algunas fitasas reportadas en la literatura	5
Cuadro II.2.- Especificidad relativa por sustrato de la fitasa de <i>Klebsiella terrigena</i> (<i>Raoultella terrigena</i> comb. nov.)	8
Cuadro III.1.- Actividad específica de fitasa en <i>R. terrigena</i> comb. nov. DSM2687 durante el crecimiento en medios ricos.	19
Cuadro III.2.- Actividad específica de fitasa en <i>R. terrigena</i> comb. nov. DSM2687 durante el crecimiento en medio mínimo MT con diferentes fuente de carbono.	21
Cuadro IV.1.- Bacterias y bacteriófagos utilizados en este estudio.	26
Cuadro IV.2.- Actividad específica de fitasa en diferentes mutantes de <i>R. terrigena</i> comb. nov. durante las fases exponencial y estacionaria de crecimiento en medios ricos.	31
Cuadro IV.3.- Actividad específica de fitasa en <i>R. terrigena</i> comb. nov. durante las fases exponencial y estacionaria de crecimiento en medios mínimos suplementados con glucosa y AMPc en condiciones de anaerobiosis	32
Cuadro IV.4.- Osmotolerancia de células de <i>R. terrigena</i> comb. nov. en medios ricos.	34
Cuadro IV.5.- Actividad específica de fitasa en <i>R. terrigena</i> comb. nov. DSM2687 en condiciones de estrés.	35
Cuadro IV.6.- Efecto de la condiciones de estrés (anaerobiosis y pH ácido) sobre la actividad específica de fitasa en <i>R. terrigena</i> MW27 (<i>rpoS::Tc^R</i>).	36
Cuadro V.1.- Bacterias y bacteriófagos utilizados en este estudio.	40
Cuadro V.2 . Actividad de β -galactosidasa y fitasa durante las fases exponencial y estacionaria de crecimiento de las mutantes <i>phy::MudI1734</i> en LB y LB con glucosa.	46
Cuadro V.3.- Osmotolerancia de células de <i>R. terrigena</i> en medios ricos.	51

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Fig. II.1.- Estructura del ácido fítico o hexafosfato de <i>myo</i> -inositol (IP6).	2
Fig. II.2.- Estructura tridimensional de la fitasa de <i>Escherichia coli</i> .	3
Fig. III.1 Actividad específica de fitasa durante el crecimiento de <i>R. terrigena</i> comb. nov. DSM2687 en medios ricos LB y LBG	19
Fig. III.2 Actividad específica de fitasa durante el crecimiento de <i>R. terrigena</i> comb. nov. DSM2687 en medios mínimos MT con glucosa e inositol como fuentes de carbono	20
Fig. IV.1.- Efecto de la adición de AMPc sobre el crecimiento de <i>Raoultella terrigena</i> MW29 (<i>cya::Km^R</i>) en medios mínimos con histidina e inositol como fuentes de carbono	30
Fig. IV.2.- Supervivencia de <i>Raoultella terrigena</i> MW27 (<i>rpoS::tn10</i>) durante la fase estacionaria de crecimiento en medio mínimo con glucosa	33
Fig. V.1.- Geles de agarosa de los productos de PCR	47

Fig. V.2.- Secuencia nucleotídica parcial del gene de fitasa de <i>R. terrigena</i> comb. nov. MW25. GeneBank AF427147	48
Fig. V.3.- Colonias de <i>R. terrigena</i> comb. nov. MW25 y cepas mutantes <i>phy::MudI1734</i> (MW49 and MW52) crecidas en LB glucosa.	49
Fig. V.4.- Crecimiento de cepas de <i>R. terrigena</i> : A) DSM2687, B) MW25, C) MW49 y D) MW52 en LB, LB glucosa y LB galactosa.	50
Fig. V.5.- Viabilidad de <i>R. terrigena</i> comb. nov. en LB glucosa: cepa progenitora MW25, cepas mutantes <i>phy::MudI1734</i> , MW49 y MW52	51
Fig. V.6.- Efecto del AMPc sobre la actividad de β -galactosidasa en cepas de <i>R. terrigena</i> comb. nov.	53
Fig. V.7.- Efecto de la anaerobiosis sobre la actividad específica de β - galactosidasa <i>R. terrigena</i> comb. nov. MW25 (cepa progenitora) y mutantes <i>phy::MudI1734</i> , MW49 y MW52	54

RESUMEN

Las fitasas son enzimas que pertenecen a un grupo especial de fosfatasas que son capaces de hidrolizar fitato (hexafosfato de *myo*-inositol) a polifosfatos de inositol. Su presencia en células bacterianas es muy interesante debido a que, hasta el momento, la actividad de la enzima no se ha relacionado con alguna vía metabólica. Se ha reportado que la actividad de fitasa en células de *Klebsiella terrigena*, ahora *Raoultella terrigena* comb. nov., aumenta significativamente durante la fase estacionaria de crecimiento y solamente la limitación de la fuente de carbono provocó dicha inducción. Determinaciones de actividad específica de fitasa de cultivos crecidos con diferentes fuentes de carbono y en mutantes *cya::Tn5* y *rpoS::Tn10*, sugirieron que la expresión de la actividad de fitasa estaba sujeta a una represión catabólica. En mutantes aisladas, carentes de actividad de fitasa (*phy::MudI1734*), la actividad de β -galactosidasa se incrementó durante la fase estacionaria, independientemente de la presencia de glucosa. La adición de AMPc provocó disminución de actividad de β -galactosidasa en una de las mutantes, sugiriendo un efecto negativo del AMPc sobre la expresión de fitasa durante la fase estacionaria. El efecto de RpoS no se determinó claramente. La baja tasa de crecimiento de las mutantes con fenotipo *phy*, aunado al comportamiento de alcanzar densidades ópticas muy bajas, formación de colonias pequeñas y de aumentar la sobrevivencia durante la fase estacionaria, sugirió que la mutación provocada por la inserción del *MudI1734* afectó el crecimiento de las células bacterianas adelantando la expresión de los fenotipos característicos de la fase estacionaria.

ABSTRACT

Phytases catalyze the release of phosphate from phytate (*myo*-inositol hexakisphosphate) to inositol polyphosphates. *Raoultella terrigena* comb.nov. phytase activity is known to increase markedly after cells reach the stationary phase. In this study, phytase activity measurements made on single batch cultures indicated that specific enzyme activity was subject to catabolite repression. Cyclic AMP (cAMP) showed a positive effect in expression during exponential growth and a negative effect during stationary phase. RpoS exhibited the opposite effect during both growth phases; the induction to stationary phase decreased twofold in the *rpoS::Tn10* mutant, but the effect of RpoS was not clearly determined. Two *phy::MudI1734* mutants, MW49 and MW52, were isolated. These formed small colonies in comparison with the MW25 parent strain when plated on Luria-Bertani (LB) or LB supplemented with glucose. They did not grow in minimal media or under anaerobiosis, but did grow aerobically on LB and LB glucose at a lower rate than did MW25. The β -galactosidase activity level in these mutants increased three to four fold during stationary growth in LB glucose and during anaerobiosis. Addition of cAMP during the exponential growth of MW52 on LB glucose provoked a decrease in β -galactosidase activity during the stationary phase, confirming its negative effect on phytase expression during stationary growth. The low growth rate, the low optical densities obtained, and the increase in survivor numbers during the stationary phase of the *phy::MudI1734* mutants indicate that the transposon insertion in the phytase gene effected cell growth by showing an early expression of the characteristic stationary phase phenotype.

CAPÍTULO I

Introducción

El ácido fítico (hexafosfato de *myo*-inositol) es la forma principal de almacén de fósforo en vegetales, representando del 18 al 88% del fósforo total. Dentro del contexto de la nutrición humana y animal, el ácido fítico tiene una gran importancia debido a que: i) el ácido fítico es un factor antinutricional, debido a que forma complejos con las proteínas y una gran variedad de iones metálicos o minerales, disminuyendo de esta manera la disponibilidad de estos nutrientes en el alimento; ii) los animales monogástricos, tales como las aves y los puercos, así como los humanos presentan muy bajos niveles de enzimas que degradan el fitato (forma de sal del ácido fítico) en su tracto intestinal, y como el ácido fítico no se absorbe, el alimento para puercos y aves se suplementa generalmente con fósforo inorgánico con el objeto de alcanzar los niveles de fósforo requeridos, contribuyendo de esta manera a los problemas de contaminación con fósforo en las áreas de intensa producción pecuaria; y iii) algunos isómeros de los diferentes ésteres de fosfato de *myo*-inositol están involucrados en el metabolismo del fosfatidilinositol como mensajeros secundarios intracelulares, de ahí que se consideren compuestos farmacológicos y de gran importancia para la producción de alimentos funcionales o más sanos. Debido a esto, existe un interés considerable en las enzimas que degradan el ácido fítico para reducir las cantidades de éste o producir sus derivados en los alimentos.

Las fitasas son enzimas que pertenecen a un grupo especial de fosfatasas que son capaces de hidrolizar fitato. Estas enzimas están presentes en plantas, microorganismos y ciertos tejidos animales. En los últimos años, han sido estudiadas intensamente por su gran importancia para reducir el contenido de fitatos en los alimentos de consumo animal y humano. Algunas de estas enzimas han sido purificadas, caracterizadas bioquímicamente e incluso clonadas y sobreexpresadas en diferentes microorganismos que podrían permitir su producción industrial. Su presencia en células bacterianas es muy interesante debido a que, hasta el momento, la actividad de la enzima no se ha relacionado con alguna vía metabólica. Este trabajo de tesis presenta algunos resultados sobre la regulación de la expresión de actividad de fitasa, que permiten suponer su probable relación con el metabolismo anfibólico de glucosa y galactosa y su probable papel como transductor secundario de señales en el metabolismo de *Raoultella terrigena* comb. nov.

CAPÍTULO II

Antecedentes

II.1 Generalidades de las fitasas

La fitasa es una enzima que hidroliza el ácido fítico o hexafosfato de *myo*-inositol (IP6) (Fig. II.1) hasta *myo*-inositol y ácido fosfórico mediante pasos de defosforilación formando intermediarios penta-, tetra-, tri-, bi- y monofosfato de *myo*-inositol (IP5, IP4, IP3, IP2, IP). Esta enzima también se conoce como *myo*-inositol hexakisfosfato 3-fosfohidrolasa (EC 3.1.3.8) y *myo*-inositol hexafosfato 6-fosfohidrolasa (EC 3.1.3.26) según el carbono del éster de fosfato que hidrolice primero.

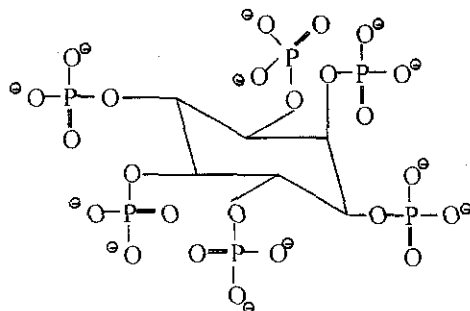


Fig. II.1.- Estructura del ácido fítico o hexafosfato de *myo*-inositol (IP6).

Las fitasas pertenecen a la familia de las fosfatasas ácidas y particularmente a la subfamilia de las fosfatasas ácidas de histidina (Mitchell, *et al.*, 1997) y se encuentran naturalmente en plantas y microorganismos. Este grupo de enzimas presenta actividad a un pH óptimo ácido y contienen la secuencia conservada de aminoácidos RHGXXRP en el sitio activo. A pesar de la falta de similitud en la secuencia de aminoácidos fuera del sitio activo, las estructuras de las fosfatasas ácidas prostáticas de los ratones y del humano son casi idénticas, mientras que las estructuras de las del hongo *Aspergillus niger* son muy similares más no idénticas. Este tipo de enzimas contiene un dominio α/β conservado y un dominio α variable. El sitio activo se localiza en la interfase entre los dos dominios (Fig. 2) (Lim *et al.*, 2000).

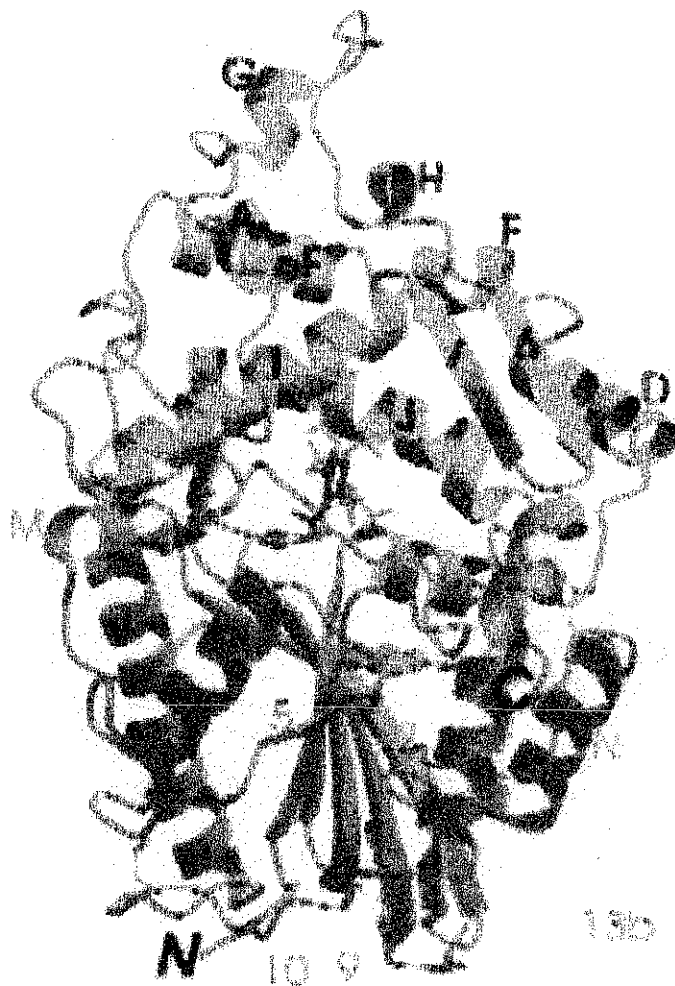


Fig. II.2.- Estructura tridimensional de la fitasa de *Escherichia coli*. Se muestra un modelo de ácido fítico con el 3-fosfato (rojo) en el sitio activo de la enzima. Esta cavidad central donde se encuentra el sitio activo (divide a la proteína en un dominio α (rosa) y un dominio α/β (azul). El dominio α/β contiene siete cadenas β -plegadas con dos α -hélices de cada lado de las β -plegadas. El dominio α está predominantemente formado por α -hélices, pero también contiene dos β -plegadas. Los extremos terminales de C y N están marcados como C y N, respectivamente en color rojo. Las hélices están marcadas con letras mayúsculas, mientras que las cadenas β -plegadas están marcadas con números.

Las fitasas fúngicas presentan una alta homología en la secuencia de aminoácidos, sin embargo sus propiedades catalíticas son muy diferentes (Wyss *et al.*, 1999b). Las actividades específicas con el hexafosfato de *myo*-inositol (ácido fítico) como sustrato se encuentran en un rango de 23-196 U por mg de proteína; los pH óptimos obtenidos con este mismo sustrato varían entre 5.5 y 7.0 (Cuadro II.1).

Las fitasas de *A. niger*, *Aspergillus terreus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella terrigena* son bastante específicas para el ácido fítico (Greiner, *et al.*, 1993; Greiner, *et al.*, 1997; Wyss *et al.*, 1999b), mientras que algunas de las preparaciones puras de fitasa no corresponden a una fosfatasa específica de fitato y tienen todas las características de fosfomonoesterasas ácidas con amplio espectro de especificidad por sustrato. Tal es el caso de las fitasas de *Lactobacillus plantarum* (Zamudio *et al.*, 2001), *Aspergillus fumigatus*, *Emmericella nidulans*, *Myceliophthora thermophila* (Wyss *et al.*, 1999b) que, además de mostrar una alta especificidad por el ácido fítico, también muestran actividad con un amplio rango de compuestos fosfatados como son: fenil fosfato, *p*-nitrofenil fosfato, fosfatos de azúcares, α y β -glicerofosfatos, fosfoenolpiruvato, 3-fosfoglicerato, ADP y ATP (Wyss, *et al.*, 1999b). Además, las fitasas de amplio espectro de especificidad degradan el ácido fítico a 2-monofosfato de *myo*-inositol sin acumulación importante de intermediarios y actúan sobre 1-monofosfato de *myo*-inositol. Mientras que las fitasas con especificidad restringida, además de ser bastante específicas por los fosfatos de *myo*-inositol, provocaron la acumulación de bi- y trifosfato de *myo*-inositol durante la degradación del ácido fítico, con una disminución progresiva en la tasa de liberación de fosfato, lo que sugirió que los fosfatos de inositol con menos de tres ésteres de fosfato eran peores sustratos que el ácido fítico y, por lo tanto, exhibieron mucho menores niveles de actividad con el 1-monofosfato de *myo*-inositol.

Las fitasas fúngicas que presentan especificidad por sustrato muy amplia presentan también actividad específica relativamente baja hacia el ácido fítico, comparada con aquellas de especificidad más restringida que presentan actividades específicas muy altas, como es el caso de las de *A. terreus* y *E. coli* (Cuadro II.1).

La fitasa de *E. coli*, con un peso molecular de 44 kDa, es muy específica para el ácido fítico y tiene la más alta actividad específica de cualquier enzima caracterizada. Su actividad específica es casi ocho veces mayor que la fitasa de *A. niger* que se vende comercialmente (Wodzinski y Ullah, 1996; Wyss, *et al.*, 1999b).

Las fitasas se inhiben con la presencia de altas concentraciones de sustrato y por arriba de una concentración crítica de fitato de sodio ocurre una disminución de la tasa de reacción. Esta concentración varía desde 0.3 mM hasta 20 mM como es el caso de las enzimas de *Aspergillus oryzae* y de soya, respectivamente (Zyta, 1992).

Todas las fitasas examinadas hasta el momento, son monoméricas y mientras la fitasa de *E. coli* no es glicosilada, los patrones de glicosilación de las fitasas fúngicas son muy variables, tanto entre las fitasas individuales, como para una fitasa determinada producida en diferentes sistemas de expresión (Wyss *et al.*, 1999a). Los distintos niveles de glicosilación de las fitasas, no mostraron ningún efecto en la actividad específica, o en las propiedades de renaturalización de las enzimas; sin

embargo, en algunos casos como la fitasa de *A. niger* expresada en *Saccharomyces cerevisiae* perdió el 40% de su termoestabilidad (Han, *et al.*, 1999).

Cuadro II.1.- Propiedades de algunas fitasas reportadas en la literatura.

Origen	pH óptimo	Temperatura a óptima (°C)	Km (μ M)	Actividad específica (U/mg)
<i>Aspergillus Niger</i> ^a	5.5	53	<5	102.5
<i>Aspergillus terreus</i> 9A1 ^a	5.5	-	10.6	141.6
<i>Aspergillus terreus</i> CBS ^a	5.5	-	23.2	195.8
<i>Aspergillus fumigatus</i> ^a	5.5	-	<10	26.5
<i>Emericella nidulans</i> ^a	7.0	55	-	28.6
<i>Miceliophthora thermophila</i> ^a	6.0	55	-	41.8
<i>Klebsiella terrigena</i> ^b	5.0	58	300	-
<i>Escherichia coli</i> ^c	4.5	55	130	-
<i>Escherichia coli</i> ^a	4.5	55	-	811.2

^a Wyss, *et al.*, 1999b; ^b Greiner, *et al.*, 1997; ^c Greiner, *et al.*, 1993.

II.2 Mecanismo de acción de las fitasas

Las fosfatasas son una clase diversa de enzimas, que de acuerdo con una clasificación se pueden distinguir los siguientes tipos: fosfatasas alcalinas, fosfatasas moradas ácidas, fosfatasas ácidas de alto peso molecular, fosfatasas ácidas de bajo peso molecular y fosfatasas de proteínas (Vincent *et al.*, 1992). Estas clases de enzimas difieren en su pH óptimo, sus requerimientos de iones metálicos, sus especificidades por diferentes sustratos y probablemente, por sus mecanismos de acción. La mayoría de las fitasas pertenecen a una subfamilia de fosfatasas ácidas de histidina y de alto peso molecular. El mecanismo de reacción de las fitasas es un proceso de dos pasos, que consiste en el ataque nucleofílico de la histidina del sitio activo en el átomo de fósforo, seguido de la hidrólisis del grupo fosfato unido covalentemente a la histidina como intermediario obligatorio de la reacción (Ostanin, *et al.*, 1992). Este mecanismo se apoya en estudios de mutagénesis (Ostanin, *et al.*, 1993) y estructuras cristalinas de complejos de estado de transición (Lindqvist *et al.*, 1994), que también han demostrado que el residuo de ácido aspártico es el donador de protones al grupo de oxígeno que se libera.

Por otro lado, el producto final de las reacciones con fitasas fúngicas probadas y la de *E. coli* fue principalmente el mismo, el 2-monofosfato de *myo*-inositol (Wyss *et al.*, 1999b). Esto demuestra

que todas las fitasas tienen una fuerte estereoespecificidad y preferencia por los grupos fosfato ecuatoriales del *myo*-inositol (Fig. II.1), mientras que son casi incapaces de atacar los grupos fosfato axiales. Sin embargo, el hecho de que los productos finales sean idénticos no significa que los pasos de degradación sean necesariamente idénticos para todas las fitasas. Las fitasas de las plantas y de *E. coli* son 6-fosfohidrolasas y dan lugar preferentemente a 1,2,3,4,5 pentafofosfato de L- *myo*-inositol como el primer intermediario, mientras que la mayoría de las fitasas microbianas son 3-fosfohidrolasas, que dan lugar al 1,2,4,5,6 pentafofosfato de D- *myo*-inositol (Cosgrove, 1980; Greiner *et al.*, 1993; Greiner *et al.*, 1997; Wyss *et al.*, 1999b).

II.3 Fuentes de las fitasas

Se ha reportado la presencia de fitasas en bacterias como *Klebsiella aerogenes* (Tambe, *et al.*, 1994), *K. terrigena* (Grenier, *et al.*, 1997) ahora *Raoultella terrigena* comb. nov., *E. coli* (Grenier, *et al.*, 1993), *Bacillus subtilis* (Powar y Jagganathan, 1982; Shimizu, 1992; Kerovuo, *et al.*, 1998) y *L. plantarum* (Zamudio *et al.*, 2001) así como en levaduras: *S. cerevisiae*, y en hongos como *Aspergillus ficuum*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *E. nidulans*, *M. thermophila*, *Talaromyces thermophilus* y *Rhizopus oligosporus* (Zyta, 1992; Wyss *et al.*, 1999a). En plantas las fitasas se encuentran presentes en cereales, leguminosas, varias clases de semillas y polen. En animales también se ha observado su presencia en eritrocitos y plasma de varias especies de vertebrados (Zyta, 1992). Craxton y colaboradores (1997) reportaron el aislamiento de ADNc de 2.3 Kb de una fosfatasa múltiple de polifosfato de inositol (MIPP) de una célula hepática de rata. La predicción de la secuencia de aminoácidos presenta una homología del 60% con el dominio catalítico de una fitasa fúngica (PhyA). Dentro de esta secuencia homóloga se encuentra también la secuencia conservada RHGXRRP de la familia de fosfatasas ácidas de histidina. En todos los tejidos de rata se presentaron transcritos de 2.5 Kb de ARNm de MIPP, sin embargo se observó mayor expresión en riñón e hígado.

II.4 Aplicaciones de las fitasas

El ácido fítico o hexafofosfato de *myo*-inositol (IP6) y sus sales, los fitatos, son componentes comunes de los tejidos vegetales relacionados con productos alimenticios. Los seis grupos reactivos de la molécula IP6 hacen de ésta un agente fuertemente quelante que se une a minerales tales como Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{3+} y que, bajo las condiciones de pH gastrointestinales, se forman complejos insolubles de metal-fitato (Gifford y Clydesdale, 1990) que hacen al metal inaccesible para su absorción en el tracto intestinal de animales y humanos (Kratzer y Vohra, 1986). En los animales monogástricos, cuya flora carece de fitasas, la solución se busca mediante la producción biotecnológica de fitasa microbiana

(Tamminga, 1990). Los fitatos reducen la digestibilidad de proteínas (Knuckles, *et al.*, 1989), almidón (Yoon, *et al.*, 1983) y lípidos (Nyman y Björck, 1989).

Las fitasas tienen un papel muy importante en el mejoramiento de la calidad nutricional de alimentos mediante la disminución del contenido de fitatos en fermentados de leguminosas y cereales (Wood, 1985), en harinas de algodón y soya (Han y Wilfred, 1989) y en aislados de proteína de soya (Zyta, *et al.*, 1989). En la preparación de pan con harina integral, además de mejorar la calidad nutricional del alimento, mejora las cualidades reológicas de las proteínas de la masa (Harland y Harland, 1980; Zyta, 1992).

Las fitasas son productos de incalculable valor para la industria pecuaria, pues pueden contribuir a la disminución del fósforo en los efluentes, mediante un mejor aprovechamiento de los fitatos de leguminosas y cereales, evitando o disminuyendo el fósforo inorgánico como aditivo. La suplementación de fitasa microbiana, en dietas de maíz y soya en cerdos y aves, mejora efectivamente la utilización de P en estos animales y reduce la excreción fecal de este compuesto hasta un 50% (Lei, *et al.*, 1993).

Las fitasas con amplio espectro de especificidad son más adecuadas para propósitos de nutrición animal que las fitasas de especificidad restringida, ya que cuando las actividades iniciales son las mismas, las fitasas de amplio rango liberan inmediatamente los cinco grupos equatoriales de fosfato del ácido fítico. Desafortunadamente, estas enzimas de amplio rango están generalmente acopladas con bajos niveles de actividad específica (Wyss *et al.*, 1999b).

Las fitasas tienen también un potencial económico especial en la obtención de productos derivados del ácido fítico (Greiner y Konietzny, 1996). Algunos isómeros de los diferentes ésteres de fosfato de *myo*-inositol están involucrados en el metabolismo del fosfatidilinositol como mensajeros secundarios intracelulares, de ahí que se consideren compuestos farmacológicos y de gran importancia para la producción de alimentos funcionales (Greiner *et al.*, 2000).

II.5 Fitasa de *Raoultella terrigena* comb. nov.

La fitasa de *Raoultella terrigena* comb. nov. (antes *Klebsiella terrigena*) ha sido purificada, como algunas otras fitasas, utilizando cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel (Greiner *et al.*, 1997). Su peso molecular es de aproximadamente 40 kd, es monomérica, tiene un pH óptimo de actividad de 5.0 y es virtualmente inactiva a pH de 8.0. Su máxima actividad la presenta a 58 °C, mientras que a 60 °C presenta una drástica disminución. Durante un período de 5 horas con temperaturas de incubación en un rango de 30 a 50 °C no se observa pérdida de la actividad, sin embargo a 60°C la enzima es prácticamente inactiva. La enzima purificada fue inhibida por una concentración de sustrato mayor a 2.0 mM.

La enzima es relativamente específica para el fitato. Las actividades relativas con otros sustratos se presentan en el cuadro II.2.

Esta fitasa hidroliza el fitato de una manera escalonada: el hexafosfato de *myo*-inositol (IP6) es rápidamente degradado a pentafosfato- (IP5), el cual es un intermediario de vida media muy corta. El tetrafosfato- (IP4) es hidrolizado más rápido que el trifosfato- (IP3). De ahí que el IP3 fuera el primer producto de degradación acumulado durante el proceso de hidrólisis (Greiner, *et al.*, 1997).

Cuadro II.2.- Especificidad relativa por sustrato de la fitasa de *Klebsiella terrigena* (*Raoultella terrigena* comb. nov.)

Sustrato	Actividad relativa (%)
Fitato	100.0
p-nitrofenol fosfato	24.2
glucosa-6-fosfato	2.1
fructosa -1,6-difosfato	11.9
fructosa-6-fosfato	7.2
1-naftol fosfato	5.6
2-naftol-fosfato	0.6
glicerofosfato	4.9
fosfoserina	0
NADP	57.2
AMP	10.3
ADP	11.0
ATP	8.0
GTP	0
piridoxal fosfato	0
Na ₂ H ₂ -pirofosfato	13.7

Greiner, *et al.*, 1997.

II.6 Fitasas en el metabolismo celular.

Existe evidencia de que el recambio de fosfatidilinositol puede regular la degradación del ácido fitico durante la germinación de semillas, por lo que es posible, que la fitasa, además de ser la encargada de proveer el fosfato durante la germinación de éstas, podría estar actuando también en

conexión con el abastecimiento de *myo*-inositol para la biosíntesis de los constituyentes de la membrana celular (Scott y Loewus, 1986).

Este tipo de enzimas es el único medio conocido, hasta el momento, que permite disminuir las pozas intracelulares del pentafosfato de 1,3,4,5,6-inositol y de hexafosfato de inositol, cuyos niveles celulares varían significativamente durante eventos fisiológicos importantes (Shears, 2001) como son: durante el proceso del ciclo celular (Balla *et al.*, 1994); durante la transformación de los fibroblastos de rata con el oncogene *v-src* (Mattingly *et al.*, 1991); y durante la invasión de *Salmonella* en las células epiteliales (Zhou *et al.*, 2001).

Las cepas virulentas de *Salmonella dublin* perturban el metabolismo de fosfatos de inositol dentro de los primeros 30 min de infección de las células epiteliales con un fuerte aumento en los niveles del tetrafosfato de 1,4,5,6-inositol. La proteína SopB secretada por *S. dublin* es esencial para su enteropatogenicidad y presenta una secuencia homóloga a las 4-fosfohidrolasas de polifosfato de inositol en mamíferos y muestra actividad *in vitro* de fosfatasa de fosfatos de inositol. Esta proteína hidroliza el pentafosfato de 1,3,4,5,6-inositol para dar lugar al tetrafosfato 1,4,5,6-inositol, molécula transductora de señales que aumenta la secreción de cloro indirectamente antagonizando el efecto del trifosfato de 3,4,5-fosfatidilinositol permitiendo el aumento de diarrea (Norris *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 2001).

La participación de las fitasas en el estado metabólico de las bacterias aún no ha sido bien estudiada. Sin embargo, en otros microorganismos se han reportado probables funciones de fitatos o sus derivados asociados al metabolismo celular, que muy probablemente involucre alguna enzima fosfatasa ácida con actividad de fitasa (Ciulla, *et al.*, 1994 y Smith, *et al.*, 1994). La acumulación de hierro a través del complejo Fe-IP6 en *Pseudomonas aeruginosa* muestra muchas de las características de procesos mediados por sideróforos, y dada la ubicuidad del IP6 y su afinidad por el hierro (III), sugiere una estrategia atractiva para que las células adopten su utilización como sideróforo. Hasta este momento, no es claro como se libera el hierro del complejo Fe-IP6. Estudios de adsorción que han realizado con membranas aisladas a 37 °C indicaron que podría haber alguna degradación del ligando marcado radioactivamente. *P. aeruginosa* produce una fosfatasa pero no parece expresarse fuertemente bajo las condiciones de exceso de fosfato utilizadas.

II.7 Regulación de la expresión de fitasas en microorganismos.

Como se mencionó anteriormente, la función de las fitasas en las bacterias no ha sido aún estudiada y por lo tanto, tampoco lo ha sido su regulación biosintética. Sin embargo, debido a que la actividad de fitasas involucra la hidrólisis de los ésteres fosfato del hexafosfato de *myo*-inositol y por analogía con su función durante la germinación de semillas, es muy probable, que la regulación de su

biosíntesis o su actividad esté muy relacionada con el metabolismo de la asimilación del fosfato inorgánico.

Los compuestos fosforilados entran al periplasma de las bacterias a través de poros proteicos conocidos como OmpC, OmpF y de la proteína PhoE de la membrana externa, cuya síntesis se induce durante la limitación con fósforo inorgánico. La mayoría de los compuestos fosforilados no pueden cruzar la barrera de la membrana citoplásmica y son desfosforilados por proteínas secretadas al periplasma (nucleotidasas, fosfatasas y en mayor cantidad, fosfatasas alcalinas AP). Una vez que el fosfato inorgánico es liberado en el periplasma, es atrapado o capturado por proteínas de alta afinidad, PstS, que lo transfieren al citoplasma por el canal PstA-PstC en la membrana citoplásmica. El transporte energético de fósforo inorgánico está probablemente mediado por la proteína PstB (Torriani-Gorini, 1994).

En *E. coli* se han identificado cuatro fosfatasas ácidas en el espacio periplásmico. Estas enzimas pueden distinguirse entre sí por su pH óptimo y sus especificidades por sustrato (Dassa, *et al.*, 1982). Entre estas fosfatasas, los niveles de la fosfatasa ácida de hexosas de pH óptimo 4.5 (fosfomonoesterasa EC 3.1.3.2) no se ven afectados por los niveles de Pi y está sujeta a una represión catabólica (Touati *et al.*, 1986) mientras que, la fosfatasa ácida de pH óptimo 2.5 que es el producto del gene *appA*, identificada como una fosfohidrolasa ácida de fosfoanhidrido EC 3.6.1.11 (Dassa y Boquet, 1985) y que, últimamente ha sido confirmada su actividad de fitasa en *E. coli* (Rodríguez *et al.*, 1999; Golovan *et al.*, 2000), está sujeta aparentemente a una regulación más compleja. Esta última enzima se sintetiza como respuesta a diversos estímulos ambientales, aparentemente no relacionados como son: limitación de oxígeno, limitación de fosfato inorgánico, o inicio de la fase estacionaria de crecimiento aeróbico (Dassa *et al.*, 1982 y Touati *et al.*, 1987).

La actividad de fitasa en *B. subtilis* se detecta durante la fase de crecimiento activo, sin embargo el nivel máximo se presenta durante la fase estacionaria. El Ca^{2+} , la D-manosa y la limitación de fósforo inorgánico estimulan la producción de la enzima (Shimizu, 1992; Kerovu, 1998).

Greiner y col. (1997) reportaron que *K. terrigena* (ahora *Raoultella terrigena* comb. nov.; Drancourt *et al.*, 2001) produce cantidades importantes de fitasa en presencia de fitato que, después de sustituirlo por citrato, acetato o D-glucosa solamente se observa una cantidad limitada de actividad de fitasa. Durante el crecimiento *R. terrigena* muestra una actividad de fitasa poco detectable, sin embargo, la actividad aumentó sensiblemente cuando las células alcanzaron la fase estacionaria. La síntesis de la enzima empezó tan pronto como el crecimiento empezó a disminuir. Se estudió la influencia de varios tipos de limitación de crecimiento sobre la producción de fitasa. Los efectos de la limitación de Pi se estudiaron sustituyendo la peptona y K_2HPO_4 por 0.5% D-glucosa y 0.5 % de bacto-peptona que contiene el Pi suficiente para soportar el crecimiento de 3 o 4 generaciones de la

bacteria. La reducción de la tasa de crecimiento observada con la limitación del Pi no provocó una síntesis importante de fitasa. La sustitución de la glucosa al 0.05% por peptona provocó una disminución del crecimiento y la síntesis inmediata de fitasa como se esperaría si se acabara la fuente de carbono. Un cambio de condiciones aeróbicas a anaeróbicas impuestas en el curso de la fase estacionaria temprana colocando aceite de parafina en la superficie del medio de cultivo y parando la agitación, no provocó una síntesis importante de fitasa.

La fitasa de la bacteria entérica *R. terrigena* comb. nov. podría ser una fitasa novedosa, ya que muestra parámetros cinéticos diferentes a los de *E. coli* y además, a diferencia de ésta, solamente la limitación de carbono provocó la expresión de la enzima.

Las causas y los mecanismos de la regulación de la expresión de fitasa en *R. terrigena* comb. nov. aún se desconocen, de ahí que para enriquecer el conocimiento en este sentido se realizó el siguiente estudio.

II.8 Referencias

- Balla, T., Nakanishi, S. y Catt, K.J. (1994). Cation sensitivity of inositol 1,4,5-trisphosphate production and metabolism in agonist-stimulated adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.* 269:16101-16107
- Ciulla, R.A., Burggraf, S., Stetter, K.O. y Roberts, M.F. (1994) Occurrence and role of di-myoinositol-1,1'-phosphate in *Methanococcus igneus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(10):3660-3664.
- Cosgrove, D. J. (1980) Inositol phosphates. Their chemistry, biochemistry and physiology. *Studies in organic chemistry*, vol. 4. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, The Netherlands.
- Craxton, A., Caffrey, J.J., Burkhart, W., Safrany, T.S., y Shears, B.S. (1997) Molecular cloning and expression of a rat hepatic multiple inositol polyphosphate phosphatase. *Biochem. J.* 328:45-81.
- Dassa, E., Cahu, M., Desjoyaux-Cherel, B. y Boquet, P.L. (1982) The acid phosphatase with optimum pH of 2.5 of *Escherichia coli*, physiological and biochemical study. *J. Biol. Chem.* 257:6669-6676.
- Dassa, E. y Boquet, P.L. (1985) Identification of the appA for the acid phosphatase (pH optimum 2.5) of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 200:68-73.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A. y Rousselier, P. (2001) Phylogenetic analysis of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of

Raoultella ornithinolytica comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 925-932.

- Feng, Y., Wentz, R.S., Majerus, W.P. (2001) Overexpression of the phosphatase SopB in human 293 cells stimulates cellular chloride influx and inhibits nuclear mRNA export. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98(3):845-879.
- Gifford, S.R. y Clydesdale, F.M. (1990) Interactions among calcium, zinc and phytate with three protein sources. J. Food Sci. 55(6):1720-1724.
- Golovan, S., Wang, G., Zhang, J. y Forsberg, C.W. (2000). Characterization and overproduction of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. Can. J. Microbiol. 46: 59-71.
- Grenier, R., Konietzny, U., Jany, K.D. (1993) Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys., 303(1):107-113.
- Greiner, R. y Konietzny, U. (1996) Construction of a bioreactor to produce special breakdown products of phytate. J. Biotechnol. 48:153-159.
- Grenier, R., Haller, E., Konietzny, U. and Jany, K.D. (1997) Purification and characterization of *Klebsiella terrigena* phytase. Arch. Biochem. Biophys. 341(2)201-206.
- Greiner, R., Carlsson, N. y Alminger, M.L. (2000). Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. J. Biotechnol. 84: 53-62.
- Han, Y.W. y Wilfred, A.G. (1989) Phytate hydrolysis in soybean and cottonseed meals by *Aspergillus ficuum* phytase. J. Agric. Food Chem. 36(2):259-262.
- Han, Y., Wilson, D.B. y Lei, X.G. (1999) Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (*phyA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 65(5):1915-1918.
- Harland, B.F. y Harland, J. (1980) Fermentative reduction of phytate in rye, white and whole wheat breads. Cereal Chem., 57(3):226-229.
- Kerovuo, J., Laureus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N. y Apajalahti, J. (1998) Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 64(6):2079-2085.
- Knuckles, B.E., Kuzmicky, D.D., Gumbmann, M.R. y Betschart, A.A. (1989) Effect of myo-inositol phosphate esters on in vitro and in vivo digestion of protein. J. Food Sci. 54:1348-1350.
- Kratzer, F. y Vohra, P. (1986) Role of phytic acid and other phosphates as chelating agents. In Chelates in Nutrition, CRC Press, Boca Raton, FL. P.49-61.

- Lei, X.G., Ku, P.K., Miller, E.R., y Yokohama, E.T. (1993) Supplementing corn-soybean diets with microbial phytase linearly improves phytate P utilization by weanling pigs. *J. Animal Sci.* 71:3359-3367.
- Lim, D., Golovan, S., Forsberg, C.W. y Jia, Z. 2000. Crystal structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. *Nature Struct. Biol.* 7:108-113.
- Lindqvist Y, Schneider G y Vihko P. (1994) Crystal structures of rat acid phosphatase complexed with the transition-state analogs vanadate and molybdate. Implications for the reaction mechanism. *Eur J Biochem.* 221(1):139-42.
- Mattingly, R.R., Stephens, L.R., Irvine, R.F. y Garrison, J.C. 1991. Effects of transformation with the *v-src* oncogene on inositol phosphate metabolism in rat-1 fibroblasts. D-*myo*-inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate is increased in *v-src*-transformed rat-1 fibroblasts and can be synthesized from D-*myo*-inositol 1,3,4-trisphosphate in cytosolic extracts. *J. Biol. Chem.* 266:15144-15153.
- Mitchell, D.B., Vogel, K., Weimann, B., Pasamontes, L. y van Loon, A.P.G.M. (1997) The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes of two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* *Myceliophthora thermophila*. *Microbiol.* 143, 245-252.
- Norris, F.A., Wilson, M.P., Wallis, T.S. y Galyov, E.E. 1998. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 14057-14059.
- Nyman, M.E. y Björck, I.M. (1989) *In vivo* effects of phytic acid and polyphenols on the bioavailability of polysaccharides and other nutrients. *J. Food Sci.* 54(5):1332-1335.
- Ostanin, K., Harms, E.H., Stevis, P.E., Kuciel, R., Zhou, M.M. y van Etten, R.L. (1992) Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* 267:22830-22836.
- Ostanin K y Van Etten RL. (1993) Asp304 of *Escherichia coli* acid phosphatase is involved in leaving group protonation. *J. Biol. Chem.* 268(28):20778-84.
- Powar, V.K. y Jagganathan, V. (1982) Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 151(3):1102-1108.

- Rodríguez, E., Han, Y. y Lei, X.G. (1999) Cloning, sequencing and expresión of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase gene (*appA2*) isolated from pig colon. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 257:117-123.
- Scott, J.J. y Loewus, F.A. (1986) A calcium activated phytase from pollen of *Lilium longiflorum*. *Plant Physiol.* 82:333-335.
- Shears, S.B. 2001. Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate. *Cell Signal* 13:151-158.
- Shimizu, M. (1992) Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (*natto*) N-77. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(8): 1266-1269.
- Smith, W.A., Poyner, D.R., Hughes, H.K. y Lambert, P.A. (1994) Siderophore activity of myo-inositol hexakisphosphate in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176(2):3455-3459.
- Tambe, S.M., Kaklij, G.S., Kelkar, S.M., Parekh, L.J. (1994) Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: evidence for unusually small active enzyme peptide. *J. Ferm. Bioeng.* 77, 23-27.
- Tamminga, S. (1990) Biotechnology and improvement of animal nutrition. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.*, 55(4):1373-1382.
- Torriani-Gorini, A., Yagil E. y Silver, S. (eds.) (1994) Phosphate in microorganisms. *Cellular and Molecular Biology.* ASM, Washington, D.C. 347p.
- Touati, E., Dassa, E. y Boquet, P.L. (1986) Pleiotropic mutations in *appR* reduce pH 2.5 acid phosphatase expression and restore succinate utilisation in CRP-deficient strains of *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* 202:257-264.
- Touati, E., Dassa, E., Dassa, J. y Boquet, P.L. (1987) Acid phosphatase (pH 2.5) of *Escherichia coli* : regulatory characteristics. In: Torriani-Gorini, A., Rothman, F.G., Silver, S., Wright, A., Yagil, Y. (eds.) 1987 Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms. ASM, Washington, D.C., pp 31-40.
- Vincent, J.B., Crowder, M.W. y Averill, B.A. (1992) Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends Biochem. Sci.* 17:105-110.
- Wodzinski y Ullah (1996) Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42:263-302.
- Wood, B.J.B. (1985) *Microbiology of fermented foods.* Vol. 2, Elsevier, London, p.228.
- Wyss, M., Pasamontes, L., Friedlein, A., Rémy, R., Tessier, M., Kronenberger, A., Middendorf, A., Lehmann, M., Schnoebelen, L., Röthlisberger, U., Kusznir, E., Wahl, G., Müller, F., Lahm, H.W., Vogel, K. y van Loon, A.P.G.M. (1999a) Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases):

molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(2):359-366.

- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Rémy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M., y van Loon, A.P.G.M. (1999b) Biochemical characterization of fungal phytases (*myo*-Inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(2):367-373.
- Yoon, J.H., Thompson, L.U. y Jenkins, D.J.A. (1983) The effect of phytic acid on in vitro rate of starch digestibility and blood glucose response. *Am. J. Clin. Nutr.* 38:835-842.
- Zamudio, M., González, A. y Medina, J.A. (2001) *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Lett. Appl. Microbiol.* 32:181-184.
- Zhou, D., Chen, L.M., Hernández, L., Shears, S.B. y Galan, J.E. 2001. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol. Microbiol.* 39:248-259.
- Zyta, K., Koreleski, J. y Kujwaski, M. (1989) Dephosphorylation of phytate compounds by means of acid phosphatase from *Aspergillus niger*. *J. Sci. Food Agric.* 49:315-324.
- Zyta, K. (1992) Mould phytases and their application in the food industry. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8:467-472.

CAPÍTULO III

Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de la actividad de fitasa en células de

Raoultella terrigena comb. nov.

III.1 INTRODUCCIÓN

Con excepción de algunos tejidos vegetales y animales, no se ha estudiado la relación de las fitasas con el metabolismo celular. Aún no se ha detectado la presencia de ácido fítico o fitatos en células bacterianas, ni su relación con alguna vía metabólica. Uno de los primeros pasos para establecer la función que desempeña un compuesto o sustancia en el metabolismo celular, es determinar el momento y/o estado fisiológico de la célula en el que se produce. En la mayoría de las bacterias, la expresión de fosfatasas está generalmente controlada por la limitación de Pi (Torriani-Gorini, *et al.*, 1987). Entre las fosfatasas ácidas de *E. coli*, los niveles de la fosfatasa ácida de hexosas de pH óptimo 4.5 (fosfomonoesterasa EC 3.1.3.2) no se ven afectados por los niveles de Pi, pero están sujetos a represión catabólica (Touati, 1986); mientras que la fosfatasa ácida de pH óptimo 2.5 que es el producto del gene *appA*, identificada como una fosfohidrolasa ácida de fosfoanhídrido EC 3.6.1.11 (Dassa y Boquet, 1985) y que, últimamente ha sido confirmada su actividad de fitasa en *E. coli* (Golovan *et al.*, 2000), está sujeta aparentemente a una regulación más compleja. Esta última enzima se sintetiza como respuesta a diversos estímulos ambientales, aparentemente no relacionados como son: limitación de oxígeno, limitación de fosfato inorgánico, o inicio de la fase estacionaria de crecimiento aeróbico (Dassa *et al.*, 1982 y Touati *et al.*, 1987). Greiner y col. (1997) reportaron que, durante el crecimiento, *K. terrigena* muestra una actividad de fitasa poco detectable, sin embargo la actividad aumentó sensiblemente, cuando las células alcanzaron la fase estacionaria. La síntesis de la enzima empezó tan pronto como el crecimiento empezó a disminuir. De las condiciones estudiadas, solamente la limitación de la fuente de carbono provocó una síntesis importante de fitasa.

Los estudios realizados por Greiner y col. (1997) solamente compararon los niveles de actividad con los datos que se tenían al inicio de la fase estacionaria y no tomaron en cuenta el comportamiento de la expresión de actividad a lo largo de curvas de crecimiento. El haberlo hecho de esta manera, hubiera reflejado el estado fisiológico de la célula en el cual se expresa la fitasa. La carencia o limitación de una fuente preferencial de carbono conlleva a la utilización de fuentes alternativas. Si la expresión de la fitasa está regulada por la limitación de la fuente de carbono, es muy probable que en medios de cultivo con fuentes de carbono no preferenciales, la expresión de la enzima se inicie antes de la fase estacionaria. Por tal motivo, en este estudio se evaluó el efecto de diferentes

fuentes de carbono sobre la expresión de fitasa a lo largo de las curvas de crecimiento de *R. terrigena* comb. nov DSM2687.

III.2 MATERIAL Y MÉTODOS

III.2.1 Microorganismo

Para este estudio se utilizó *Roultella terrigena* comb. nov. DSM2687 (antes *Klebsiella terrigena*). Esta cepa fue adquirida de la colección microbiana “Deutsche Sammlung für Mikroorganismen Collection”.

III.2.2 Medios y condiciones de cultivo.

Medio rico LB (g/l): Bactotripton 10.0, extracto de levadura 5.0, NaCl 5.0. LBG: Lb suplementado con glucosa

Medio mínimo MT (Tambe *et al.*, 1994) (g/l): K_2HPO_4 7.0, KH_2PO_4 2.0, NH_4NO_3 0.5, $MgSO_4$ 0.2, extracto de levadura 0.25, pH 7.2-7.4.

Las fuentes de carbono utilizadas como glucosa e inositol se adicionaron en una concentración de 2.5 g/l; el succinato de sodio y el acetato de sodio se adicionaron con una concentración final de 0.138 M. En condiciones de limitación las fuentes de carbono en medio mínimo MT, la glucosa y el inositol se adicionaron en una concentración de 0.25 g/l. El fitato de Na se adicionó con una concentración de 15 g/l. En condiciones de limitación de fósforo o sustitución de K_2HPO_4 y KH_2PO_4 por fitato de sodio se adicionaron 40 ml de MOPS 1.0 M pH 7.4 por litro de medio.

Los medios de cultivo (50 ml en matraces erlenmeyer de 250 ml) se inocularon con 100 μ l del precultivo. El inóculo o precultivo se preparó tomando 100 μ l de los cultivos en glicerol de la cepa mantenida a -15 °C e inoculando 25 ml de medio LB en matraces erlenmeyer de 125 ml. Tanto los precultivos como los cultivos se incubaron a 37 °C y 150 rpm. Los precultivos se dejaron en incubación toda la noche (aproximadamente 16 h). El crecimiento se evaluó por densidad óptica a una longitud de onda de 590 nm. Se definió como fase exponencial a aquellos puntos donde se observa una alta velocidad de crecimiento en la gráfica, y como fase estacionaria cuando la velocidad de crecimiento se hizo constante.

III.2.3 Evaluación de la actividad de fitasa intracelular.

Todas las evaluaciones se realizaron por duplicado.

III.2.3.1 Obtención del extracto enzimático (Greiner *et al.*, 1997).

Las células de 1 ml del cultivo se lavaron dos veces con NaCl 0.1 M y se resuspendieron en una solución de Tris 0.1 M pH 7.5, EDTA 0.02 M y lisozima 5 mg/ml. Se mantuvieron en reposo de 15 a 60 min a temperatura ambiente y durante este tiempo se sonicaron por 5 min. Se centrifugaron

las muestras en tubos eppendorf a 10,000 rpm, 10 min, 4 °C. El sobrenadante se utilizó para el ensayo enzimático.

III.2.3.2 Ensayo enzimático

Se adicionaron 50 µl del extracto enzimático a 350 µl de una solución amortiguadora de acetatos 0.1 M pH 4.5 con 0.5 µmoles de fitato de Na en tubos nuevos eppendorf. La reacción se llevó a cabo a 37 °C y se cuantificó la liberación de Pi mediante un método modificado de Heinonen y Lahti (Greiner *et al.*, 1993), que consiste en añadir 1.5 ml de una solución de molibdato de amonio 0.01M:acetona:H₂SO₄ 5N (1:2:1) y 0.1 ml de ácido cítrico 1.0 M leyendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 355 nm. Se utiliza una curva estandar de 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15 y 0.2 µmoles de K₂HPO₄. Una unidad de actividad de enzima (U) es la cantidad de enzima que libera 1 µmol de Pi del ácido fítico por minuto.

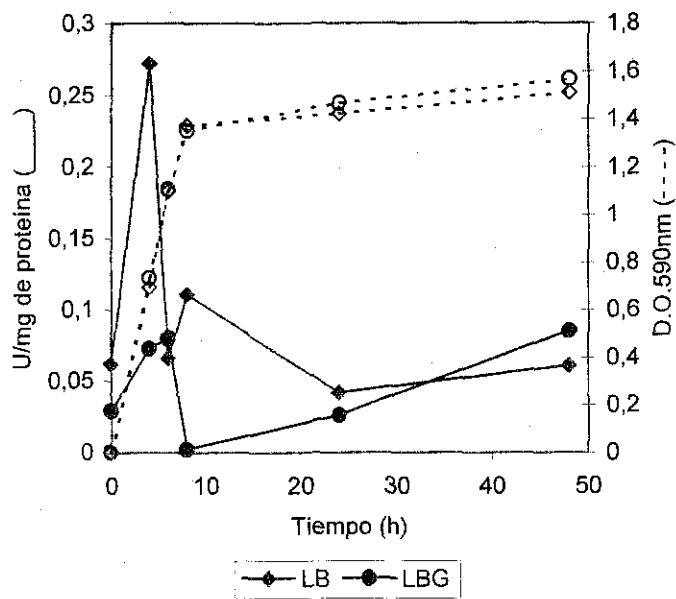
III.2.3.3 Cuantificación de proteína

Las células de 1 ml del cultivo se lavaron dos veces con NaCl 0.1 M y se resuspendieron en buffer de fosfatos 0.1 M. La concentración de proteína se determinó por el método de azul de Coomassie G-250 utilizando albúmina sérica bovina como sustancia de referencia (Bradford, 1976).

III.3 RESULTADOS

Con el objeto de establecer las condiciones que regulan la presencia de actividad de fitasa en las células de *Raoultella terrigena* comb. nov., se evaluó la actividad de fitasa a lo largo de curvas de crecimiento en diferentes medios de cultivo.

En medio LB suplementado con glucosa como fuente de carbono, se observó un discreto aumento en la actividad específica de fitasa al inicio del crecimiento. Esta actividad disminuye a lo largo de la fase exponencial presentando un ligero incremento durante la fase estacionaria (Fig. III.1). En LB (Fig. III.1 y Cuadro III.1) el aumento en la actividad al inicio del crecimiento exponencial fue mayor que el que se presentó con glucosa.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Fig. III.1 Actividad específica de fitasa durante el crecimiento de *R. terrigena* comb. nov. DSM2687 en medios ricos LB (◆) y LBG (●). Los símbolos cerrados indican actividad específica y los abiertos crecimiento evaluado por densidad óptica.

Cuadro III.1.- Actividad específica de fitasa en *R. terrigena* comb. nov. DSM2687 durante el crecimiento en medios ricos.

Medio de cultivo	Actividad específica de fitasa U/ mg de proteína		Factor de regulación ^a
	Fase exponencial	Fase estacionaria	
LB	0.272 ± 0.069	0.144 ± 0.031	0.53
LB glucosa	0.073 ± 0.005	0.085 ± 0.056	1.16
LB IP6	0.545 ± 0.325	0.0017	0.003
LB glucosa IP6	0.053 ± 0.03	0.361 ± 0.158	6.81

^a Factor de regulación = Actividad en fase estacionaria/ actividad en fase exponencial

En medios mínimos de cultivo MT con fuentes de carbono cuya utilización está sujeta a represión catabólica por glucosa, como son el inositol, el succinato de sodio y el acetato de sodio (Fig. III.2 y Cuadro III.2) se observó también un incremento importante en la actividad durante el crecimiento exponencial igual que en LB. En condiciones de limitación de las fuentes de carbono (Cuadro III.2) no se observó el incremento de la actividad durante el crecimiento exponencial, mientras que si se observó un incremento importante durante la fase estacionaria.

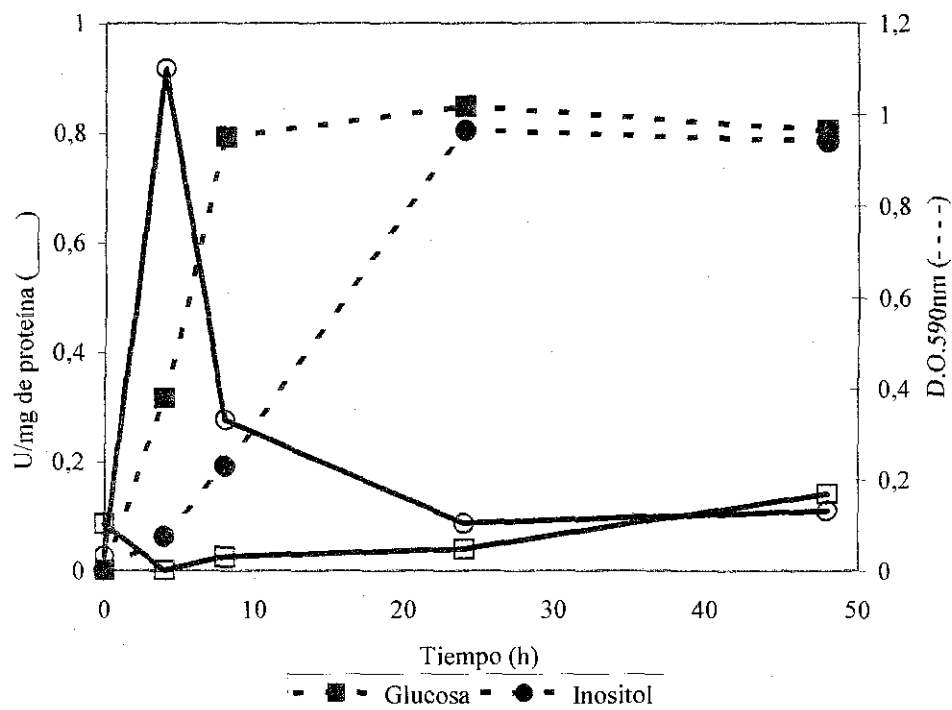


Fig. III.2 Actividad específica de fitasa durante el crecimiento de *R. terrigena* comb. nov. DSM2687 en medios mínimos MT con glucosa (■) e inositol (●) como fuentes de carbono. Los símbolos cerrados indican crecimiento evaluado en densidad óptica y los abiertos actividad específica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro III.2.- Actividad específica de fitasa en *R. terrigena* comb. nov. DSM2687 durante el crecimiento en medio mínimo MT con diferentes fuente de carbono.

Fuente de carbono	Actividad específica de fitasa		Factor de regulación ^a
	U/ mg de proteína		
	Fase exponencial	Fase estacionaria	
Glucosa	0.064 ± 0.03	0.105 ± 0.04	1.64
Glucosa + inositol	0.109	0.055 ± 0.01	0.5
Inositol	0.764 ± 0.26	0.072 ± 0.03	0.09
Succinato de sodio	2.7	0.07	0.026
Acetato de sodio	1.31	0.49	0.37
Limitación de glucosa	0.01 ± 0.008	0.147 ± 0.062	14.7
Limitación de inositol	0.054 ± 0.08	0.167 ± 0.02	3.09

^a Factor de regulación = Actividad en fase estacionaria/ actividad en fase exponencial

III.4 DISCUSIÓN

La actividad de fitasa intracelular podría ser el resultado de una o varias fosfatasa ácidas actuando en forma cooperativa como respuesta a cambios en el medio ambiente y como la fisiología de la célula bacteriana depende de la fase de crecimiento, y la fisiología de la fase estacionaria depende, entre otras cosas, de las condiciones previas de crecimiento (Kolter, 1993), se pensó que sería más conveniente comparar el nivel de actividad que provocaron las condiciones de crecimiento durante la fase exponencial sobre la actividad en fase estacionaria, mediante la determinación de lo que se denominó factor de regulación (actividad en fase estacionaria / la actividad en fase exponencial). Por lo que, comparando estos factores de regulación entre los diferentes medios mínimos se observó que, la presencia de glucosa en los medios de cultivo incrementó este factor por arriba de 1.0 (cuadros III.1 y III.2), sugiriendo que el crecimiento previo en glucosa o que, la limitación de ella (fuente de carbono preferencial), estimuló la expresión de actividad de fitasa durante la fase estacionaria. Mientras que, al inicio del crecimiento en medios con fuentes de carbono diferentes a la glucosa, la actividad se incrementó provocando que el factor de regulación se presente por debajo de 1.0. En medios ricos, el efecto del crecimiento en glucosa sobre la expresión de la enzima durante la fase estacionaria no fue tan notorio, sin embargo, durante la fase exponencial si se observó claramente un efecto de represión por la glucosa, ya que en LB los niveles de actividad durante esta fase fueron mayores. Todo esto sugirió que, la glucosa pudiera

estar ejerciendo un efecto de represión catabólica sobre la expresión de actividad de fitasa en la célula de la bacteria.

R. terrigena comb. nov. DSM 2687 en condiciones de limitación de la fuente de carbono en medios mínimos presentó un incremento importante en el factor de regulación, esto confirmó lo reportado por Greiner y col. (1997), que la limitación de la fuente de carbono en el medio de cultivo estimuló la presencia de actividad de fitasa.

La expresión de *appA* en *E. coli* aumentó ligeramente (hasta tres veces) en las mismas condiciones de limitación de carbono (Atlung et al., 1997), presentando también un efecto de represión catabólica. Sin embargo, el incremento comparado con el efecto del fosfato inorgánico (veinte veces), fue tan pequeño que aparentemente no se le dio importancia.

La presencia de fitato de sodio en los medios ricos de cultivo provocó un incremento en la actividad específica de fitasa al inicio de la fase exponencial de crecimiento en LB (dos veces) y durante la fase estacionaria de crecimiento en LB suplementado con glucosa (aproximadamente 4 veces) (Cuadro III.2), disminuyendo y aumentando, respectivamente, el factor de regulación. Esto sugirió un efecto inductor del fitato sobre la expresión de la actividad de fitasa durante el crecimiento, resultados parecidos a los reportados por Greiner, *et al.*, 1997. Sin embargo, no se tiene la certeza de que el ácido fítico penetre la célula como para activar o inducir la expresión de la enzima y además, las concentraciones que se utilizaron del ácido fítico son tan grandes (16 mM), que pudieron haber afectado la fisiología de la célula, probablemente secuestrando iones esenciales. Por lo que se decidió, por el momento, continuar con el estudio del efecto de la fuente de carbono y fase estacionaria de crecimiento sin tomar en cuenta el efecto del ácido fítico en el medio de cultivo.

El hecho de que haya presentado mayor actividad específica de fitasa en medios de cultivo con fuentes de carbono sujetas a represión catabólica al inicio de la fase exponencial de crecimiento, hizo suponer que, aquellos factores que afectan esta represión, también pudieran estar afectando la expresión de la enzima.

Por otro lado, la limitación de la fuente de C es una condición de estrés que se presenta durante la fase estacionaria y que muy probablemente, igual que para la represión catabólica, aquellos factores que regulan la expresión de genes en estas condiciones, también estén afectando la expresión de fitasa durante la fase estacionaria o en las condiciones de limitación.

III.5 Referencias

- Atlung, T., Knudsen, K., Heerfordt, L. y Brøndsted, L. (1997) Effects of σ^S and the transcriptional activator AppY on induction of the *Escherichia coli* *hya* and *cbdAB-appA* operons in response to carbon and phosphate starvation. J. Bacteriol. 179(7):2141-2146.

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Dassa, E., Cahu, M., Desjoyaux-Cherel, B. y Boquet, P.L. (1982) The acid phosphatase with optimum pH of 2.5 of *Escherichia coli*, physiological and biochemical study. *J. Biol. Chem.* 257:6669-6676.
- Dassa, E. y Boquet, P.L. (1985) Identification of the *appA* for the acid phosphatase (pH optimum 2.5) of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 200:68-73.
- Golovan, S., Wang, G., Zhang, J. y Forsberg, C.W. 2000. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Can. J. Microbiol.* 46: 59-71.
- Grenier, R., Konietzny, U. y Jany, K.D. (1993) Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 303(1):107-113.
- Grenier, R., Haller, E., Konietzny, U. y Jany, K.D. (1997) Purification and characterization of *Klebsiella terrigena* phytase. *Arch. Biochem. Biophys.* 341(2)201-206.
- Harland, B.F. y Harland, J. (1980) Fermentative reduction of phytate in rye, white and whole wheat breads. *Cereal Chem.*, 57(3):226-229.
- Kolter, R., Siegele, D.A. y Tormo, A. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47:855-874.
- Tambe, S.M., Kaklij, G.S., Kelkar, S.M. y Parekh, L.J. (1994) Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: evidence for unusually small active enzyme peptide. *J. Ferm. Bioeng.* 77, 23-27.
- Torriani-Gorini, A., Rothman, F.G., Silver, S., Wright, A. y Yagil, Y. (eds.) 1987 Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms. ASM, Washington, D.C. 347p.
- Touati, E., Dassa, E. y Boquet, P.L. (1986) Pleiotropic mutations in *appR* reduce pH 2.5 acid phosphatase expression and restore succinate utilisation in CRP-deficient strains of *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* 202:257-264.
- Touati, E., Dassa, E., Dassa, J. y Boquet, P.L. (1987) Acid phosphatase (pH 2.5) of *Escherichia coli* : regulatory characteristics. In: Torriani-Gorini, A., Rothman, F.G., Silver, S., Wright, A., Yagil, Y. (eds.) 1987 Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms. ASM, Washington, D.C., pp 31-40.

CAPÍTULO IV

Efecto del AMPc y RpoS en la expresión de la fitasa de *Raoultella terrigena* comb. nov.

IV.1 INTRODUCCION

La presencia de actividad de fitasa durante la fase estacionaria de cultivos de *Raoultella terrigena* comb. nov. con previo crecimiento en glucosa (capítulo III) sugiere que, la limitación de nutrientes o las condiciones de estrés, que se presentan durante esta fase, pueden estar ejerciendo algún efecto sobre la expresión de la enzima.

Las células bacterianas tienen la capacidad de responder rápidamente a los cambios ambientales durante el crecimiento mediante el encendido de la expresión de genes como respuesta a un estrés específico. Una de las respuestas iniciales a la limitación de un nutriente en particular, como pueden ser carbono, nitrógeno o fósforo, es la de inducir la expresión de un grupo de genes cuyas funciones estén diseñadas para ayudar a que las células puedan sobreponerse a ese estrés específico de limitación. Una disminución en el nivel del nutriente en particular, conlleva a la activación de un regulador transcripcional que enciende la expresión de los genes del regulón participante (Neidhardt, 1987). Cuando la inducción de estos regulones no es adecuada para asegurar la suficiente cantidad del nutriente limitante, el crecimiento cesa y las células entran en fase estacionaria. La fisiología de la célula durante esta etapa variará enormemente dependiendo de la composición del medio en el que las células estén creciendo y, en las condiciones en las que apareció la limitación (Kolter, 1993). En una célula privada de nutrientes no es posible tener una respuesta rápida que requiera transcripción y síntesis *de novo* de proteínas. De ahí que, las células deben prepararse con anticipación para contender con la eventual posibilidad de cambios o restricciones del medio ambiente, tales como el estrés por limitación de nutrientes, estrés oxidativo, o bien por calor o por presión osmótica. La adaptación de las bacterias a la limitación de nutrientes durante el inicio y el mantenimiento de la fase estacionaria, se caracteriza por una serie de cambios metabólicos intrincados que continúan por un largo período de tiempo. Todas las respuestas adaptativas, ya sea al cambio de nutrientes o a varias condiciones estresantes, involucran una serie de mecanismos de encendido y apagado que controlan estos cambios metabólicos.

Un mecanismo regulatorio común involucra la modificación de factores sigma, cuya función primaria es la de unirse a la holoenzima de la ARN polimerasa confiriéndole especificidad por un promotor en particular. Se ha identificado un factor sigma, que también se conoce como factor σ^S o RpoS, que regula la expresión de proteínas de fase estacionaria o de condiciones de estrés (Kolter, 1993). El factor σ^S es mejor conocido por su papel en la regulación de expresión de

genes durante la fase estacionaria y no durante la fase exponencial. Sin embargo, también funciona como regulador celular durante diferentes condiciones de estrés (Lowen y Hengge-Aronis, 1994). El nivel celular de σ^S aumenta como respuesta a estas condiciones. La degradación de esta proteína es muy alta bajo condiciones de poco estrés. Empero, esta degradación se inhibe en condiciones de mucho estrés, provocando de esta manera, una mayor estabilidad de la misma (Muffler, *et al.*, 1996). Fusiones de *rpoS::lacZ* en cepas de *E. coli* demostraron que la expresión de *rpoS* se incrementa hasta diez veces durante el periodo previo al crecimiento al transferir células de un medio rico a uno mínimo, y que posteriormente, la expresión se eleva ligeramente a lo largo de toda la fase exponencial y se presenta otro ligero incremento al entrar a la fase estacionaria (Mulvey, *et al.*, 1990).

Por otro lado, otro mecanismo de regulación de la expresión de enzimas en condiciones de limitación de la fuente de carbono preferencial en bacterias gram-negativas es la regulación catabólica mediada por el complejo AMPc-CRP. Se ha observado que, cuando se utilizan fuentes de carbono diferentes a la glucosa y en cultivos de medio LB de diferentes bacterias gram negativas, la concentración intracelular de este complejo aumenta (Kolb, *et al.*, 1993). La célula responde a la disponibilidad de la fuente de carbono preferencial regulando la concentración intracelular del AMPc. La síntesis del AMPc es catalizada por la enzima adenilato ciclasa, que está codificada en el gene *cya*. La actividad de fitasa se presenta en medios de cultivo con fuentes de carbono sujetas a represión catabólica al inicio de la fase exponencial de crecimiento y en condiciones de limitación de la fuente de carbono preferencial (como en el caso de LB), esto hace suponer que la presencia de actividad de fitasa en *R. terrigena* comb. nov. está sujeta a la misma represión. Es por todo esto, que se decidiera estudiar, en esta parte, el efecto tanto del complejo CRP-AMPc como el de RpoS en la expresión de la actividad de fitasa en mutantes *cya*⁻ y *rpoS*⁻.

IV.2 MATERIAL Y MÉTODOS

IV.2.1 Microorganismos

Las bacterias y bacteriófagos utilizados en este estudio se presentan en el cuadro IV.1.

Cuadro IV.1.- Bacterias y bacteriófagos utilizados en este estudio.

Microorganismo	Fenotipo relevante	Fuente
<i>Escherichia coli</i> K12		
AB1157	Sensible a P1	Colección del Dr. F. Bastarrachea
MK1010	W3110 <i>cya::Km^R</i>	Lee-Rivera y Gómez-Eichelmann, 1994
RH90	MC4100, <i>rpoS359::Tc^R</i>	Lange y Hengge-Aronis, 1991.
<i>Raoultella terrigena</i> comb. nov.		
DSM2687	Productor de fitasa, Greiner, <i>et al.</i> , 1997	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen Collection
MW25	DSM2687, sensible a P1	Este estudio
MW27	MW25, <i>rpoS359::Tc^R</i>	Este estudio
MW29	MW25, <i>cya::Km^R</i>	Este estudio
Bacteriófago		
PIcm	Propagado a partir de la cepa bacteriana MX485	Colección del Dr. F. Bastarrachea

IV.2.2 Medios de cultivo.

Medio rico LB (g/l): Triptona 10.0, extracto de levadura 5.0, NaCl 5.0; LBC: LB + CaCl₂ 5mM
MT (Tambe *et al.*, 1994) (g/l): K₂HPO₄ 7.0, KH₂PO₄ 2.0, NH₄NO₃ 0.5, MgSO₄ 0.2, extracto de levadura 0.25, pH 7.2-7.4.

Agar McConkey lactosa, Bioxon 109.

Los antibióticos se adicionaron con una concentración final de: cloranfenicol (Cm) 25 µg/ml, kanamicina (km) 40 µg/ml y tetraciclina (Tc) 12.5 µg/ml.

Los cultivos para la evaluación de crecimiento y actividad específica de fitasa se inocularon con 100 µl del precultivo en matraces erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio. El inóculo o precultivo se preparó tomando 100 µl de los cultivos en glicerol de la cepa guardada a -15 °C e inoculando 25 ml de medio LB en matraces erlenmeyer de 125 ml. Tanto los precultivos como los cultivos se incubaron a 37 °C y 150 rpm. Los precultivos se dejaron en incubación toda la noche (aproximadamente 16 h). El crecimiento se evaluó por densidad óptica a una longitud de onda de 590 nm. Se definió como fase exponencial a aquellos puntos donde se observa una alta velocidad de crecimiento en la gráfica, y como fase estacionaria cuando la velocidad de crecimiento se hizo constante.

IV.2.3 Aislamiento de células de *Raoultella terrigena* comb. nov. sensibles al bacteriófago P1 (Goldberg *et al.*, 1974).

Se añadió P1 Cm a un cultivo de la cepa DSM2687 en LBC en una proporción 2:1. Posteriormente, se incubó la mezcla a 37 °C para permitir la adsorción del fago y se plaqueó sobre cajas de medio LB Cm. Las placas se incubaron a 30 °C hasta que aparecieron colonias al día siguiente. Las colonias crecidas en LB Cm se purificaron. Se preparó un precultivo en LB Cm a 30 °C de las colonias purificadas, se hicieron diluciones, se plaqueó en LB y se incubaron a 37 °C. Posteriormente, se checó lisogenia. Las células sensibles no crecieron en LB Cm a ninguna de las temperaturas evaluadas.

La lisogenia se checó transfiriendo una colonia pura en dos placas, una de las cuales se incubó a 30 °C y otra a 42 °C. Las lisógenas de P1 crecen bien a 30 °C y muy poco arriba de 35 °C. La lisogenia se confirmó porque fueron capaces de liberar fagos después de un choque de calor a 42 °C durante 2 h, que formaron placas cuando se sembraron sobre una capa de bacterias sensibles de *E. coli* AB1157.

Propagación del bacteriófago P1Cm (Miller, 1972).

Se obtuvo un cultivo de la cepa MX485 crecida a 30 °C en medio LB con un crecimiento en un rango de 0.5 - 0.6 de densidad óptica a una longitud de onda de 590 nm (D.O._{590 nm}). Posteriormente, se cambió el cultivo a un baño de 42 °C con agitación también durante 1-2 h (

hasta observar lisis celular). Se añadió cloroformo en una proporción 1:20 (v:v) y se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 5000g por 5 min. La fase acuosa se conservó a 4 °C y se determinó el número de fagos por ml (titulación de P1Cm).

Titulación del P1Cm (Miller, 1972).

Se realizaron diluciones de la suspensión del bacteriófago. Se tomaron 0.1 ml de las diversas diluciones y 0.1 ml de un cultivo fresco de la cepa AB1157 en LBC. Se incubaron 30 min a 37 °C y se plaquearon con agar suave sobre placas de medio LB agar. Las placas se incubaron a 30 °C hasta que aparecieron placas de lisis.

IV.2.4 Ensayo de sobrevivencia.

Se evaluaron las cuentas viables de las cepas bacterianas durante la fase estacionaria de crecimiento (hasta 10 días) en medio MT suplementado con glucosa 0.25%. Se tomaron muestras para la determinación de la D.O._{590nm} y después de las diluciones apropiadas en NaCl 0.1M se plaqueó en placas de LB agar para la determinación de las unidades formadoras de colonias por ml.

IV.2.5 Ensayo de osmotolerancia.

Se obtuvieron precultivos de las cepas en LB, se centrifugaron a 8,000 g por 5 min, se lavaron con NaCl 0.1M y resuspendieron a una densidad de 3×10^6 células por ml en LB suplementado con NaCl 2.4M y LB suplementado con glucosa y NaCl 2.4 M. Los cultivos se incubaron a 37 °C en agitación. Se tomaron muestras a las 0, 6 y 24 h para la determinación del número de unidades formadoras de colonias por ml en placas de LB agar con las diluciones apropiadas.

IV.2.6 Evaluación de la actividad de fitasa intracelular.

La obtención del extracto enzimático y el ensayo correspondiente se hicieron tal como se explica en el capítulo III.

Cuantificación de proteína

La obtención del extracto y la determinación de la concentración de proteína se realizó tal como se especifica en el capítulo III.

IV.2.7 Ensayo en condiciones estrés

Se inocularon 0.3 ml de un cultivo de células en crecimiento logarítmico, en LB con glucosa (2.5 g/l) (LBG), en tubos con 3 ml de los siguientes medios para probar el efecto de las diferentes condiciones de estrés. LBG como control; LB para represión catabólica (Kolb *et al.*, 1993); LBG y la adición, posterior a la inoculación, de 1 ml de aceite mineral e incubados sin agitación para anaerobiosis; LBG suplementado con acetato de sodio 100 mM, LBG suplementado

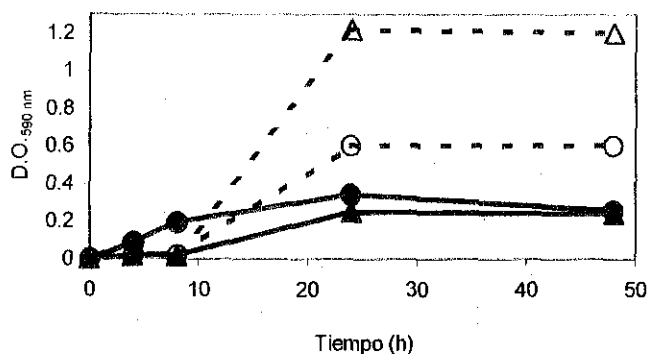
con 1.5 g/l de fitato de sodio; LBG suplementado con H₂O₂ para estrés oxidativo; LBG suplementado con NaCl 0.3 M para estrés osmótico y LBG a pH 3.0 para estrés ácido; MT suplementado con glucosa y con inositol, respectivamente, para probar el efecto del cambio de un medio rico a uno mínimo; MT sin fuente de carbono; MT suplementado con glucosa, pero sin la adición de K₂HPO₄ para probar el efecto de la limitación de Pi (se adicionó buffer MOPS 0.1 M pH 7.0 en sustitución del buffer de fosfatos); y MT sin la adición de NH₄NO₃ y extracto de levadura para la limitación de nitrógeno. Los cultivos se incubaron durante 60 min en agitación, con excepción del de anaerobiosis, a 37 °C. Después de la incubación, se tomaron las muestras para evaluar la actividad de fitasa y la proteína.

IV.3 RESULTADOS

IV.3.1 Efecto de Cya en la expresión de fitasa.

La cepa mutante MW29 (*cya::Km^R*) se aisló mediante la transducción de la mutación *cya::Km^R* de la cepa de *E. coli* MK1010 con P1Cm a la cepa MW25 (sensible a P1) de *R. terrigena* comb. nov. El fenotipo *cya*⁻ se confirmó con curvas de crecimiento en medios con inositol o histidina como fuentes de carbono (fig. IV.1) y en cajas de McConkey lactosa kanamicina con y sin la adición de AMPc 2 mM. Tanto la lactosa como la histidina y el inositol son fuentes de C cuya utilización en *R. terrigena* están sujetas a represión catabólica.

La mutante MW29 mostró una muy baja actividad de fitasa al inicio de la fase exponencial de crecimiento en medios ricos con o sin glucosa (Cuadro IV.2), sugiriendo que la ausencia de Cya durante el crecimiento activo tiene un efecto negativo sobre la expresión de la enzima. La actividad específica de fitasa en MW29 durante la fase estacionaria se incrementó con respecto a la obtenida en la cepa silvestre isogénica MW25, indicando probablemente lo contrario, un efecto positivo de la ausencia de Cya en esta fase de crecimiento.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-- Δ -- Histidina + AMPc 0.5mM -- \bullet -- Inositol -- \circ -- Inositol + AMPc 1mM -- \blacktriangle -- Histidina

Fig. IV.1.- Efecto de la adición de AMPc sobre el crecimiento de *Raoultella terrigena* MW29 (*cya::Km^R*) en medios mínimos con histidina (\blacktriangle) e inositol (\bullet) como fuentes de carbono. Los símbolos cerrados indican el crecimiento sin la adición de AMPc y los abiertos con la adición de AMPc.

La síntesis de AMPc en células de *E. coli* en crecimiento anaeróbico responde solamente a la fuente de carbono y los niveles del nucleótido cuando las células crecen anaeróbicamente en glucosa son muy bajos durante la fase exponencial y más altos durante la fase estacionaria (Unden y Danchin, 1987). Por tal motivo, para que se pudiera estudiar el efecto del AMPc sobre la expresión de fitasa y determinar que dicho efecto se debiera efectivamente a la fuente de carbono, se decidió realizar la adición del AMPc en cultivos en anaerobiosis. La adición de AMPc 2 mM, al medio mínimo con glucosa generó un aumento en la actividad de fitasa al inicio de la fase exponencial de crecimiento de la cepa silvestre DSM2687, disminuyendo de esta manera el factor de regulación (Cuadro IV.3). Esto sugirió que, muy probablemente, el AMPc pudiera tener un efecto positivo al inicio de la fase exponencial de crecimiento. En la cepa MW29 con fenotipo *cya*⁻, el factor de regulación también disminuyó con la adición de AMPc, solamente que esta vez, la disminución en el factor de regulación se debió, principalmente, a que la actividad de fitasa disminuyó durante la fase estacionaria. Esto sugirió, un efecto negativo del AMPc sobre la expresión de actividad durante la fase estacionaria de crecimiento.

La adición de AMPc a la cepa con fenotipo *cya*⁻, provocó un ligero aumento de la actividad específica de fitasa al inicio de la fase exponencial de crecimiento, sin embargo el aumento no fue tan grande como para alcanzar los mismos niveles de actividad de la cepa silvestre, muy

probablemente debido a que la concentración de AMPc que entró a la célula no fue suficiente como para activar la expresión.

Cuadro IV.2.- Actividad específica de fitasa en diferentes mutantes de *R. terrigena* comb. nov. durante las fases exponencial y estacionaria de crecimiento en medios ricos.

Cepas de <i>Raoultella terrigena</i>	Fenotipo relevante		Medio de cultivo	Actividad específica de fitasa (U/mg de proteína) ^a		Factor de regulación ^b
	Cya	RpoS		Fase exponencial	Fase estacionaria	
DSM2687	+	+	LB	0.272 ± 0.07	0.144 ± 0.03	0.53
			LB glucosa	0.073 ± 0.005	0.085 ± 0.05	1.1
MW25	+	+	LB	0.012 ± 0.001	0.0044 ± 0.0008	0.36
			LB glucosa	0.037 ± 0.018	0.031 ± 0.02	0.83
MW27	+	-	LB	0.394 ± 0.17	0.065 ± 0.002	0.16
			LB glucosa	0.197 ± 0.09	0.065 ± 0.023	0.32
MW29	-	+	LB	0.009 ± 0.004	0.113 ± 0.007	12.5
			LB glucosa	0.006 ± 0.0004	0.054 ± 0.02	9.0

^a Los valores corresponden a la media de por lo menos tres experimentos independientes ± desviación estándar.

^b Actividad específica de fitasa en fase estacionaria / Actividad específica de fitasa en fase exponencial

Cuadro IV.3.- Actividad específica de fitasa en *R. terrigena* comb. nov. durante las fases exponencial y estacionaria de crecimiento en medios mínimos suplementados con glucosa y AMPc en condiciones de anaerobiosis.

Cepa de <i>R. terrigena</i>	Medio de cultivo	Actividad específica de fitasa (U/mg de proteína) ^a		Factor de regulación ^b
		Fase exponencial	Fase estacionaria	
DSM2687	MT glucosa	0.01 ± 0.004	0.12 ± 0.014	12
	MT glucosa + AMPc	0.34 ± 0.12	0.17 ± 0.011	0.5
MW29 (<i>cyoA::Km^R</i>)	MT glucosa	0.03 ± 0.006	0.54 ± 0.19	18
	MT glucosa + AMPc	0.08 ± 0.002	0.25 ± 0.10	3.0

^a Los valores corresponden a la media de por lo menos tres experimentos independientes ± desviación estándar.

^b Actividad específica de fitasa en fase estacionaria / Actividad específica de fitasa en fase exponencial

V.4 Efecto de RpoS en la expresión de fitasa

Con el objeto de evaluar el efecto del factor RpoS sobre la expresión de actividad de fitasa en las células se aislaron mutantes con fenotipo *rpoS*⁻, mediante la transducción de una mutación *rpoS::Tc^R* de la cepa de *E. coli* RH90 con P1Cm a la cepa MW25 de *R. terrigena* comb. nov. Para confirmar el fenotipo *rpoS*⁻ de la cepa MW27, se evaluó su sobrevivencia durante la fase estacionaria en un medio mínimo suplementado con glucosa (Fig. IV.2) y su osmotolerancia en LB suplementado o no con glucosa y NaCl 2.4 M (Cuadro IV.4). El número de células viables de la cepa MW27 disminuyeron drásticamente durante la fase estacionaria y en un medio hiperosmolar, fenotipo característico de las mutantes *rpoS*⁻ de *E. coli*.

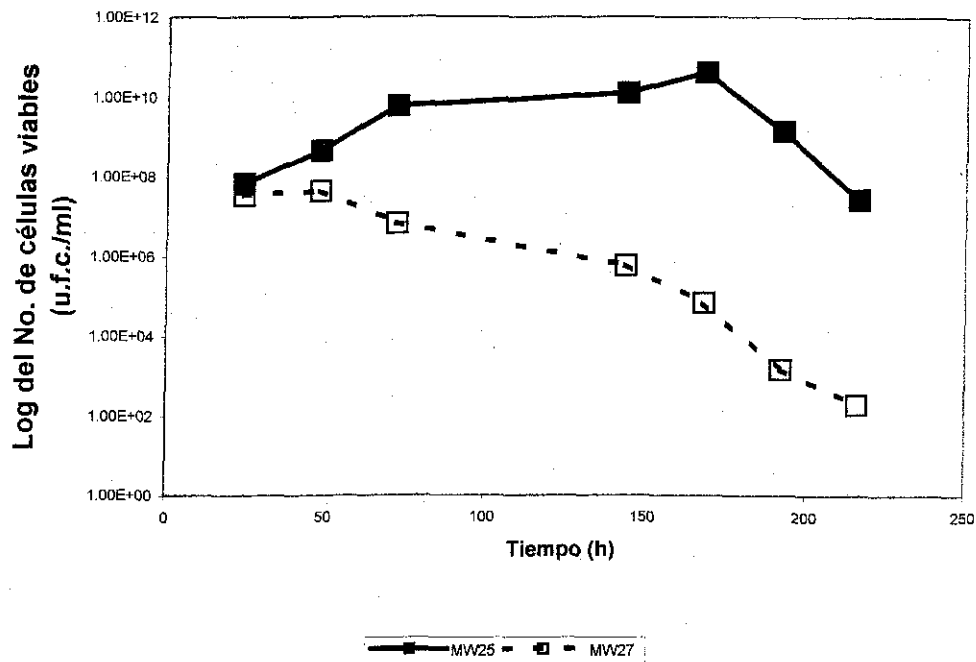


Fig. IV.2.- Supervivencia de *Raoultella terrigena* MW27 (*rpoS::tn10*) durante la fase estacionaria de crecimiento en medio mínimo con glucosa.

La mutación de la cepa MW25 que le confirió sensibilidad al bacteriófago P1, por alguna razón, provocó disminución en los niveles de expresión de la actividad de fitasa (Cuadro IV.2) y en la supervivencia en un medio hiperosmolar (Cuadro IV.4). La inactivación del gene *rpoS*, en la cepa MW27, mostró un aumento de la actividad específica de fitasa al inicio de la fase exponencial de crecimiento en LB con o sin glucosa, disminuyendo claramente el factor de regulación. Lo que quiere decir que, la falta de RpoS funcional tiene un efecto positivo en la expresión de la actividad de fitasa al inicio de la fase exponencial. Esto sugirió que el factor σ^S o RpoS pudiera tener un efecto negativo durante la fase exponencial, mientras que el efecto en la fase estacionaria, no es muy claro.

Cuadro IV.4.- Osmotolerancia de células de *R. terrigena* comb. nov. en medios ricos.

Cepa de <i>Raoultella</i> <i>terrigena</i>	Medio de cultivo	Viabilidad		% de sobrevivencia
		0 h	24 h	
DSM2687	LB + NaCl 2.4 M	1.73 X 10 ⁵	3.25 X 10 ⁵	100
silvestre	LB glucosa + NaCl 2.4 M	1.89 X 10 ⁵	2.01 X 10 ⁵	100
MW25	LB + NaCl 2.4 M	4.45 X 10 ⁵	1.14 X 10 ⁵	25.6
P1 sensible	LB glucosa + NaCl 2.4 M	4.39 X 10 ⁵	1.05 X 10 ⁵	23.9
MW27	LB + NaCl 2.4 M	2.26 X 10 ⁵	3.7 X 10 ²	0.16
<i>rpoS::Tc^R</i>	LB glucosa + NaCl 2.4 M	3.18 X 10 ⁵	3.2 X 10 ²	0.10

Por otro lado, el cambio de cultivos que se encontraban en fase activa de crecimiento a condiciones estresantes como son: los estreses osmótico y oxidativo, la limitación de fuentes de N y P, y la presencia de un ácido orgánico, como el acetato de sodio, no provocó ningún aumento estadísticamente significativo en la actividad específica de fitasa (cuadro IV.5). Sin embargo, el cambio de los cultivos a condiciones de anaerobiosis, de un medio de cultivo rico con glucosa a uno mínimo también con glucosa, a condiciones de estrés ácido y limitación de fuente de C sí provocó un incremento estadísticamente significativo con un 95 % de confianza.

Cuadro IV.5.- Actividad específica de fitasa en *R. terrigena* comb. nov. DSM2687 en condiciones de estrés.

Condición de estrés	Actividad específica (U/ mg de proteína)
Control (LB .glucosa)	0.022 ± 0.002 ^a
LB	0.041 ± 0.016 ^a
LB glucosa + fitato de sodio	0.009 ± 0.002 ^a
LB + fitato de sodio	0.014 ± 0.009 ^a
Anaerobiosis	0.632 ± 0.078 ^e
Oxidante	0.086 ± 0.003 ^a
LBG + acetato de sodio	0.094 ± 0.030 ^a
LBG + NaCl	0.172 ± 0.077 ^a
Ácido	0.421 ± 0.140 ^c
Cambio a medio mínimo con glucosa	0.515 ± 0.111 ^d
Cambio a medio mínimo con inositol	0.040 ± 0.005 ^a
Cambio a medio mínimo sin fuente de carbono	0.298 ± 0.033 ^b
Cambio a medio mínimo sin fuente de nitrógeno	0.107 ± 0.041 ^a
Cambio a medio mínimo sin fuente de fósforo	0.047 ± 0.007 ^a

Letras diferentes presentan diferencia significativa $P < 0.05$

La falta de RpoS funcional en la cepa MW27 no provocó cambios significativos en el factor de regulación de actividad específica de fitasa después de cambiar las células en crecimiento activo en aerobiosis a condiciones de: i) anaerobiosis y ii) a un medio con pH ácido (Cuadro IV.6). Esto sugirió que el papel de RpoS sobre la expresión de actividad de fitasa en condiciones de estrés pudiera ser poco significativo.

Cuadro IV.6.- Efecto de las condiciones de estrés (anaerobiosis y pH ácido) sobre la actividad específica de fitasa en *R. terrigena* MW27 (*rpoS*::Tc^R).

Cepas de <i>Raoultella terrigena</i>	Control			Anaerobiosis			pH ácido		
	U/mg de proteína ^a	de	Factor de estimulación ^b	U/mg de proteína	de	Factor de estimulación	U/mg de proteína	de	Factor de estimulación
DSM2687	0.07		3	0.20		4	0.30		4
MW25	0.01		7	0.07		2	0.02		2
MW27 (<i>rpoS</i> ::Tc ^R)	0.02		8	0.16		3.5	0.07		3.5

^a Los valores corresponden a la media de por lo menos tres experimentos independientes

^b Actividad específica de fitasa en condición de estrés / Actividad específica de fitasa en el cultivo control

DISCUSIÓN

El incremento de la actividad de fitasa en la cepa silvestre DSM2687 durante la fase exponencial de crecimiento en un medio mínimo con glucosa cuando se le adiciona AMPc, en condiciones en las cuales las células sintetizan poco o nada AMPc (Unden y Danchin, 1987; Botsford y Harman, 1992), sugiere que dicho comportamiento positivo se debe efectivamente a la presencia del AMPc. Mientras que, el aumento de la actividad en la mutante MW29 *cya*::Km^R (incapaz de sintetizar AMPc) durante la fase estacionaria en un medio con glucosa y la disminución de actividad en la misma fase cuando se adiciona AMPc sugirió un papel negativo de este nucleótido durante la fase estacionaria. Cabe señalar, que el efecto del AMPc fue más evidente en la cepa silvestre DSM2687 en condiciones de anaerobiosis debido a que el factor de regulación aumentó significativamente a 12, cuando en condiciones de aerobiosis fue de 1.64 (cuadro III.1).

La cepa mutante *rpoS*::Tc^R aumentó la expresión de fitasa en fase exponencial, tanto en medio LB como LB suplementado con glucosa, claramente disminuyendo (a la mitad) el factor de regulación, comparado con el de la cepa progenitora isogénica MW25. Debido a que, la proteína de RpoS en otras células bacterianas, como *E. coli*, tiene mayor efecto en la expresión de genes durante la fase estacionaria (Kolter *et al.*, 1993), hizo pensar que el aumento en la actividad de fitasa, durante la fase exponencial, en la mutante *rpoS*⁻ pudiera ser, más que un efecto directo de la falta de RpoS o σ^S , una alteración de otras condiciones fisiológicas que afecten directa o indirectamente la expresión de la fitasa, como podría ser el incremento del complejo AMPc-CRP.

En *E. coli* se ha demostrado que *appA* está controlado negativamente, directa e indirectamente, por AMPc y la proteína CRP y, positivamente regulado por el gene regulatorio específico de fase estacionaria *rpoS* (también conocido como *katF* y *appR*) (Touati, *et al.*, 1986). El gene de *appA* se encuentra dentro de un operon del metabolismo de energía *cbdAB-appA*. Los genes de *cbdAB* codifican para las oxidasas de citocromos tipo *b* y *d* (Dassa *et al.*, 1991). La transcripción de este operon, se induce por la acción de un activador conocido como AppY (Atlung, *et al.*, 1997). La inducción de este operon durante la entrada a la fase estacionaria en medio rico es dependiente de σ^S . Este operon también se induce por limitación de carbono, pero es solamente dependiente de AppY y no de σ^S . El gene *appY* también se induce por limitación de carbono, sin embargo ésta sí es dependiente de σ^S . Esto finalmente, indica que RpoS tiene un efecto positivo indirecto sobre la expresión de *appA* en condiciones de limitación de la fuente de carbono. Por similitud, podríamos suponer que en *R. terrigena* comb. nov. pudiera estar ocurriendo lo mismo y, por lo mismo, el efecto de RpoS sobre la actividad de fitasa no sea tan claro.

La presencia de otras fosfatasa en el metabolismo pudiera estar enmascarando los efectos de este regulador σ^S de la transcripción, por esta razón, se decidió buscar inserciones con el bacteriófago MudI1734 en el gene de fitasa, para utilizar la actividad de β -galactosidasa (producto del gene *lacZ* que forma parte del MudI1734) como expresión de la regulación de la transcripción del gene de fitasa (*phy*) (siguiente capítulo V).

Referencias

- Atlung, T., Knudsen, K., Heerfordt, L. y Brøndsted, L. (1997) Effects of σ^S and the transcriptional activator AppY on induction of the *Escherichia coli* *hya* and *cbdAB-appA* operons in response to carbon and phosphate starvation. *J. Bacteriol.* 179(7):2141-2146.
- Botsford, J.L. y Harman, J.G. (1992) Cyclic AMP in Prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 56(1):100-122.
- Dassa, E., Fsihi, H., Marck, C., Dion, M., Kieffer-Bontemps, M. y Boquet, P.L. (1991) A new oxygen-regulated operon in *Escherichia coli* comprises the genes for a putative third cytochrome oxidase and for pH 2.5 acid phosphatase (*appA*). *Mol. Gen. Genet.* 229:341-352.
- Goldberg, R.B., Bender, R.A. y Streicher, S.L. (1974) Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. *J. Bacteriol.* 118(3):810-814.

- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Grges, S. y Adhya, S. (1993) Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 749-795
- Kolter, R., Siegele, D.A. y Tormo, A. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47:855-874.
- Lange, R. y Hengge-Aronis, R. (1991) Growth phase regulated expression of *bolA* and morphology of stationary phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor σ^S . *J. Bacteriol.* 173: 4474-4481.
- Lee-Rivera, I. y Gómez-Eichelmann, M.C. (1994) *Escherichia coli* cells with mutations in the gene for adenylate cyclase (*cya*) exhibit a heat shock response. *FEMS Microbiol.Lett.* 121:35-38.
- Lowen, P.C. y Hengge-Aronis, R. (1994) The role of the sigma factor σ^S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:53-80.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Muffler, A., Fischer, D., Altuvia, S., Storz, G. y Hengge-Aronis, R. (1996) The response regulator RssB controls stability of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 15(6):1333-1339.
- Mulvey, M.R., Switala, J., Borys, A. y Lowen, P.C. (1990) Regulation of transcription of *KatE* and *KatF* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:6713-6720.
- Neidhardt, F.C. (1987) Multigene systems and regulons. Cap. 98, Vol. II *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Cellular and Molecular Biology*. Ed. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Brooks. Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., Umbarger, H.E. ASM Press, Washington D.C. p.1313-1317.
- Tambe, S.M., Kaklij, G.S., Kelkar, S.M. y Parekh, L.J. (1994) Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: evidence for unusually small active enzyme peptide. *J. Ferm. Bioeng.* 77, 23-27.
- Touati, E., Dassa, E. y Boquet, P.L. (1986) Pleiotropic mutations in *appR* reduce pH 2.5 acid phosphatase expression and restore succinate utilisation in CRP-deficient strains of *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* 202:257-264.
- Unden, G. y Duchene, A. (1987) On the role of cyclic AMP and the Fnr protein in *Escherichia coli* growing anaerobically. *Arch. Microbiol.* 147:195-200.

CAPÍTULO V

Regulación y probable papel de la fitasa en el metabolismo celular de *R. terrigena* comb. nov.

V.1 INTRODUCCIÓN

En la mayoría de las bacterias, la expresión de fosfatasas está generalmente controlada por no más de una condición. La fosfatasa alcalina en *Escherichia coli* o en *Bacillus subtilis* (Torriani-Gorini, *et al.*, 1987) se sintetiza como respuesta a la limitación de Pi. Entre las fosfatasas ácidas de *E. coli*, los niveles de la fosfatasa ácida de hexosas de pH óptimo 4.5 (fosfomonoesterasa EC 3.1.3.2) no se ven afectados por los niveles de Pi, pero están sujetos a represión catabólica (Touati, 1986); mientras que la fosfatasa ácida de pH óptimo 2.5 que es el producto del gene *appA*, identificada como una fosfohidrolasa ácida de fosfoanhídrido EC 3.6.1.11 (Dassa y Boquet, 1985) y que, últimamente ha sido confirmada su actividad de fitasa en *E. coli* (Rodríguez *et al.*, 1999; Golovan *et al.*, 2000), está sujeta aparentemente a una regulación más compleja. Esta última enzima se sintetiza como respuesta a diversos estímulos ambientales, aparentemente no relacionados como son: limitación de oxígeno, limitación de fosfato inorgánico, o inicio de la fase estacionaria de crecimiento aeróbico (Dassa *et al.*, 1982 y Touati *et al.*, 1987).

Los primeros resultados de este estudio en células de *R. terrigena* comb. nov. DSM2687 sugirieron que la glucosa parecía estar ejerciendo un efecto de represión catabólica sobre la expresión de actividad de fitasa (Capítulo III). La adición de AMPc 2 mM, al medio mínimo con glucosa generó un aumento en la actividad de fitasa al inicio de la fase exponencial de crecimiento de la cepa silvestre DSM2687, disminuyendo de esta manera el factor de regulación (Capítulo IV). Esto sugirió que, muy probablemente, el AMPc pudiera tener un efecto positivo al inicio de la fase exponencial de crecimiento. En la cepa MW29 con fenotipo *cya*⁻, el factor de regulación también disminuyó con la adición de AMPc, solamente que esta vez, la disminución en el factor de regulación se debió, principalmente, a que la actividad de fitasa durante la fase estacionaria disminuyó. Esto sugirió, un efecto negativo del AMPc sobre la expresión de actividad durante la fase estacionaria de crecimiento.

La cepa mutante *rpoS*::Tc^R aumentó la expresión de fitasa en fase exponencial, sin embargo, no se detectó ningún efecto significativo de RpoS sobre el nivel de actividad en fase estacionaria y en condiciones de estrés como anaerobiosis y pH ácido. Sin embargo, el hecho de que la actividad de fitasa aumentara en ausencia de RpoS o σ^S durante la fase exponencial, cuando RpoS es un factor global de regulación de fase estacionaria, hizo pensar que la presencia de otras fosfatasas en el metabolismo pudiera estar enmascarando los efectos de este regulador de la transcripción. Por tal motivo, se decidió aislar inserciones con el bacteriófago Mud11734 en el

gene de fitasa, para utilizar la actividad de β -galactosidasa (producto del gene *lacZ* que forma parte del MudI1734) como expresión de la regulación de la transcripción del gene de fitasa (*phy*) y eliminar la interferencia de otras fosfatasas en la cuantificación de la actividad de fitasa. La obtención de este tipo de mutantes, a su vez, permitiría identificar el efecto de la falta de actividad de fitasa en la fisiología celular y proponer probables relaciones con el metabolismo celular.

V.2 MATERIAL Y MÉTODOS

V.2.1 Microorganismos

Las bacterias y bacteriófagos utilizados en este estudio se presentan en el cuadro V.1.

Cuadro V.1.- Bacterias y bacteriófagos utilizados en este estudio.

Microorganismo	Fenotipo relevante	Fuente
<i>Escherichia coli</i> K12		
AB1157	Sensible a P1	Colección del Dr. F. Bastarrachea
MK1010	W3110 <i>cya::Km^R</i>	Lee-Rivera y Gómez-Eichelmann, 1994
M8820	<i>Mucts hpl</i>	Csonka, <i>et al.</i> , 1981
Mu1734	MudI1734	Csonka, <i>et al.</i> , 1981
<i>Klebsiella terrigena</i>		
DSM2687	Productor de fitasa, Greiner, <i>et al.</i> , 1997	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen Collection
MW25	DSM2687, sensible a P1	Este estudio (Capítulo IV)
MW49	MW25, <i>phy::MudI1734</i>	Este estudio
MW52	MW25, <i>phy::MudI1734</i>	Este estudio
Bacteriófago		
MudI1734	Propagado de la cepa Mu1734	Csonka, <i>et al.</i> , 1981

V.2.2 Medios y condiciones de cultivo.

Medio rico LB (g/l): Triptona 10.0, extracto de levadura 5.0, NaCl 5.0.

Medio rico LBG: LB suplementado con glucosa (2.5 g/l).

La ampicilina (Ap), kanamicina (Km) y el 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactopiranosido (X-gal) se adicionaron con una concentración final de 50 μ g/ml. Los cultivos líquidos se incubaron con agitación a 37 °C.

Los cultivos para la evaluación de crecimiento y actividad específica de fitasa se inocularon con 100 μ l del precultivo en matraces erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio. El inóculo o precultivo se preparó tomando 100 μ l de los cultivos en glicerol de la cepa guardada a -15 °C e inoculando 25 ml de medio LB en matraces erlenmeyer de 125 ml. Tanto los precultivos como los cultivos se incubaron a 37 °C y 150 rpm. Los precultivos se dejaron en incubación toda la noche (aproximadamente 16 h). El crecimiento se evaluó por densidad óptica a una longitud de onda de 590 nm. Se definió como fase exponencial a aquellos puntos donde se observa una alta velocidad de crecimiento en la gráfica, y como fase estacionaria cuando la velocidad de crecimiento se hizo constante.

V.2.3 Evaluación de la actividad de fitasa intracelular.

La obtención del extracto enzimático y el ensayo correspondiente se hicieron tal como se explica en el capítulo III.

Cuantificación de proteína

La obtención del extracto y la determinación de la concentración de proteína se realizó tal como se especifica en el capítulo III.

V.2.4 Obtención de mutantes *phy::Mud I1734*.

Se preparó un precultivo de MW 25 en 5 ml de LB líquido a 37°C por 24 h. Se inocularon 0.2 ml de este precultivo a 25 ml de LB líquido. El matraz se incubó a 37°C hasta que alcanzó una D.O._{590 nm} entre 0.2 y 0.4. Se prepararon 5 tubos mezclando 0.1 ml del cultivo de la cepa MW25 y 0.01 ml de la suspensión de fago Mud I1734 y se le adicionó a cada uno de los tubos 5 ml de agar suave de LC (LB, CaCl₂ 0.25 M) previamente licuado. Se vació esta mezcla en cajas de petri con medios de LC y se incubaron a 37°C por 24 h. A cada caja se le adicionaron 5 ml de cloruro de sodio 0.1M y se incubaron a 37°C por 15 min. Se recuperó el agar suave en tubos estériles para centrifuga y se centrifugó a 5000 r.p.m. y 4°C durante 4 minutos. Las pastillas obtenidas se lavaron dos veces con cloruro de sodio 0.1M y se resuspendieron en esta misma solución. De esta suspensión se hicieron diluciones hasta 1×10^{-7} , se plaquearon en LB Km y se incubaron a 37°C por 24 h. De las colonias crecidas se hicieron réplicas en LB Km X-gal y otra parte en LBG Km

X-gal. Se conservaron las colonias que presentaron coloración azul intenso en X-gal. Las cepas sensibles a P1 son también sensibles al bacteriófago Mu (Csonka, *et al.*, 1981).

Obtención del fago Mu *cts*.

Se inocularon 0.2 ml de un precultivo de la cepa M8820 a 25 ml de LB y se incubó a 30 °C en agitación hasta que alcanzó una D.O._{590nm} entre 0.3 y 0.4. Se cambió a un baño de 45°C por 10 minutos, los 20 minutos siguientes a 42°C y finalmente a 37°C hasta que se observó lisis celular. Se añadió 1 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente y se centrifugó a 4800 r.p.m., durante 10 minutos y a 10 °C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril de vidrio (suspensión de fago Mu *cts*) y se conservó a 4°C.

Titulación del fago Mu *cts*.

Un cultivo de la cepa AB1157 en LB se centrifugó 5 minutos a 8000g y a 4°C y se resuspendió en solución AM (CaCl₂ 0.015M y MgSO₄ 0.03M).

Por otro lado, se prepararon diluciones con la suspensión del fago Mu *cts* desde 1X10⁻¹ hasta 1X10⁻⁶ con agua estéril. Se mezclaron 0.1 ml de cada dilución del fago Mu *cts* con 0.1 ml de la suspensión de AB1157 en AM. Los tubos se a 37 °C durante 30 min. Se plaquearon en cajas de LC con agar suave y se incubaron 24 h a 37°C El título del fago se obtuvo contando el número de placas formados por cada dilución. También se evaluó un control sin fago.

Obtención del fago Mud I1734.

Se preparó un precultivo de la cepa Mu1734 en LBKm y se incubó a 37 °C por aproximadamente 24 h. Se inocularon 0.2 ml de este precultivo en 25 ml de LB hasta alcanzar una D.O._{590nm} entre 0.2 y 0.4. Se mezclaron 0.1 ml de este cultivo con 0.4 ml de la suspensión de Mu *cts* en cada uno de los cinco tubos y se plaquearon, respectivamente, en cajas de LCTG (LB, CaCl₂ 0.25 M, glucosa 2 % y timina 0.2 %). Las placas se incubaron a 37 °C entre 12 y 16 h hasta que se observó la formación de placas de lisis. A cada placa se le adicionaron 5 ml de LB líquido y se incubaron a 37 °C por 15 minutos. Se recogió el LB líquido y el agar suave de todas las placas y se adicionaron a un solo tubo para centrifuga. Se le adicionó cloroformo (1:20, V:V) y se centrifugó a 3000g por 10 minutos y a 4°C. Al sobrenadante acuoso se le adicionó nuevamente cloroformo (1:20, V:V) y se centrifugo nuevamente. El sobrenadante acuoso se vacio en un tubo de vidrio estéril y se guardó a 4°C (Suspensión de fago MudI1734).

Titulación del fago MudI1734.

Un cultivo de la cepa de *E. coli* AB1157 se centrifugo por 5 min a 8000g y 4 °C. La pastilla se resuspendió en solución AM.

Por otro lado se hicieron diluciones con la suspensión del fago MudI1734 desde 1X10⁻¹ hasta 1X10⁻⁶ en agua estéril. Se mezclaron 0.1 ml de cada dilución y 0.1 de la suspensión de AB1157 en AM en tubos y se incubaron a 37°C por 30 min. Posteriormente, se plaquearon con agar suave en LC. Se incubaron las cajas por aproximadamente 24 h a 37°C. El titulo se obtuvo

contando el número de placas formados por cada dilución. También se plaqueo un control de bacteria sin fago.

V.2.5 Selección de colonias mutantes sin actividad de fosfatasa ácida.

La selección de mutantes sin actividad de fosfatasa ácida se realizó utilizando un ensayo en placas inmunológicas y posteriormente, confirmando en una prueba en tubos de ensayo.

Ensayo en placas inmunológicas.

Se utilizó el método reportado en *Methods for General and Molecular Bacteriology* (Gerhardt, *et al.*, 1994).

Se resuspendió una colonia azul proveniente de los medios de LBKmX-gal y LBGKmX-gal en cada pozo de la placa inmunológica con 0.1ml de la solución sustrato (buffer de citrato 0.01M pH 4.8 y paranitrofenil fosfato 0.01M). Se incubó la placa a 37°C, durante 6 h. Posteriormente, se les adicionó 0.1 ml de buffer de glicina 0.04M pH 10.5 (se ajustó el pH con NaOH) para desarrollar color. Las colonias que desarrollaron color amarillo indica actividad de fosfatasa ácida.

Prueba en tubos de ensaye.

Para determinar la actividad de fosfatasa ácida en tubos se utilizó el método reportado por Dassa *et al.*, 1982.

Se purificaron las cepas que no presentaron actividad de fosfatasa ácida en el ensayo en placas inmunológicas y se prepararon precultivos de cada una de ellas en medio LBKm. Los precultivos se centrifugaron 8000 g 5 min a 4°C y la pastilla celular se lavó 2 veces con NaCl 0.85% y finalmente, se resuspendió en una solución de *p*-NPP (buffer de citrato de sodio 0.1 M pH 4.8 y 0.01 M de *p*-nitrofenil fosfato). Los tubos se incubaron 6 h a 37 °C y a cada tubo se le adicionó 1ml de buffer de glicina 0.04 M pH 10.5. La solución de la reacción se centrifugó y se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 388 nm en el espectofotómetro. Se utilizó como blanco 1 ml de la solución de *p*-NPP. Se conservaron solamente aquellas cepas que no presentaron actividad de fosfatasa ácida para su posterior evaluación de actividad de fitasa.

V.2.6 Evaluación de la actividad de β -galactosidasa.

Se utilizó el método reportado en *Methods for General and Molecular Bacteriology* (Gerhardt, *et al.*, 1994) y las mediciones se realizaron por duplicado.

Los cultivos se ajustaron a una D.O._{590 nm} de 0.4 y se centrifugaron; posteriormente, las pastillas celulares se lavaron dos veces con NaCl 0.1 N y se resuspendieron en 10 ml de buffer Z (fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0, KCl 10 mM, MgSO₄ 1mM y mercaptoetanol 50 mM). Se adicionó 1 ml de la suspensión en tres tubos, respectivamente (las determinaciones se hicieron por duplicado y el tubo restante se utilizó como blanco de cada muestra). A cada uno de los tubos, incluyendo blancos, se les adicionaron 2 gotas de cloroformo y 1 gota de SDS 0.1% y se agitaron

vigorosamente. A cada tubo, con excepción de los blancos de las muestras, se le adicionaron 0.2 ml de la solución de ONPG (4mg/ml de *o*-nitrofenil- β -D-galactosido en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0) y se incubaron durante 30 min a 28 °C. Posteriormente, se adicionaron 0.5 ml de carbonato de sodio 1M para detener la reacción. Las reacciones se centrifugaron a 8000g 5 min y se determinó la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 420nm en un Espectrofotómetro.

V.2.7 Confirmación de la inserción del elemento Mud I1734

Para confirmar la inserción del fago en el gene de fitasa se realizó una amplificación del ADN con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como primers, secuencias de oligonucleótidos de los extremos derecho e izquierdo del Mud I1734 (Neidhardt et al., 1999). Primers MuR (forward): 5'-AAACGCTTTCGCCTTTTTCGTGC-3' y MuL (reverse): 5'-GGACATTGGATTATTCGGGAT-3'.

Asimismo, también se utilizaron primers con la secuencia derivada del gene *appA*, que codifica para la fitasa de *E. coli* (Rodríguez et al., 1999) (*appA*, número de acceso de Genbank 145283). Primers F1 (forward: 254-267): 5'-GGAATTCAGAGTGAGCCGGA-3' y R1 (reverse: 1473-1486): 5'-GGGGTACCTTACAAACTGCACG-3'.

V.2.8 Aislamiento del ADN genómico

El ADN genómico de la de las diferentes cepas de *R. terrigena* se obtuvo utilizando el método de lisis alcalino para bacterias como se describe en Sambrook et al. (1989).

V.2.9 Amplificación del ADN

Se prepararon 50 μ l de la mezcla de reacción de PCR que contenía 400 ng de ADN genómico de las diferentes cepas de *R. terrigena*, 50 pmol de cada primer y 45 μ l de PCR Supermix (Gibco BRL). La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer). El programa térmico consistió en un ciclo de 95 °C (5 min), 30 ciclos de [95 °C (2 min), 50 °C (1.5 min) y 72 °C (1.5 min)], y 30 ciclos de [92 °C (1.5 min), 50 °C (2 min) and 72 °C (5 min)]. Los productos de la amplificación se observaron con una electroforesis en agarosa al 1 % (Gibco BRL).

V.2.10 Secuenciación nucleotídica

Los fragmentos de ADN amplificados de *R. terrigena* MW25 se purificaron con el conjunto de reactivos para purificación de ADN QIAquick (Quiagen). La secuencia nucleotídica se determinó con el conjunto de reactivos para secuencias ABI Prism Dye Terminator Cycle utilizando un secuenciador ABI 377 en el Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M. Los análisis de homología se realizaron en el banco de datos de la "National Center for Biotechnology Information (NCBI)" utilizando el programa BLAST. Los datos de la secuencia nucleotídica se depositaron en el banco de datos GeneBank bajo el número de acceso AF427147.

V.3 RESULTADOS

V.3.1 Aislamiento de mutantes *phy::MudI1734*

Se obtuvo una suspensión del bacteriófago fago *MudI1734* por inducción térmica de la cepa *Mu1734* (*Mu dl*; *Mu Km*^r, *hpl cts62*) de *E. coli* con un título de 2.5×10^9 u.f.p./ml. Esta suspensión se utilizó para infectar la cepa *MW25* que es sensible a P1, debido a que se ha reportado que este tipo de cepas pueden ser infectadas por *MudI* aunque no produzcan placas de lisis visibles (Csonka, *et al.*, 1981). El 36% de las lisógenas de *MudI1734* resultaron de coloración azul intenso en medios LBG Km X-gal. De 908 cepas con inserción de *MudI1734*, 66 resultaron sin actividad de fosfatasa ácida. Se evaluó la actividad de fitasa en estas 66 mutantes y solamente dos de ellas (*MW49* y *MW52*) no presentaron actividad de fitasa en la fase estacionaria en LB y una actividad poco detectable en LB suplementado con glucosa. Relacionando los niveles de actividad de β -galactosidasa presentados en diferentes condiciones de crecimiento de estas cepas con la expresión de fitasas, ambas mutantes presentaron la misma actividad de β -galactosidasa que la cepa silvestre isogénica *MW25* al inicio de la fase exponencial de crecimiento en ambos medios, aumentando 3 y 4 veces esta actividad durante la fase estacionaria en LB y LB suplementado con glucosa, respectivamente (Cuadro V.2). Mientras que en las mutantes, *MW49* y *MW52*, la actividad de fitasa disminuyó el 53 y 82 %, durante la fase exponencial y, 81 y 93.6 % durante la fase estacionaria, respectivamente en LB suplementado con glucosa. En LB no se detectó actividad a lo largo del crecimiento. Estos resultados sugieren que, muy probablemente, la inserción del *MudI1734* se haya llevado a cabo en el gene u operon de la fitasa provocando que la inserción permita la transcripción del gene *lacZ* (que forma parte de la información que lleva el bacteriófago) en las condiciones que se expresa la fitasa. La actividad de fitasa disminuyó, más drásticamente, durante la fase estacionaria en LB suplementado con glucosa, la actividad de β -galactosidasa no aumentó durante la fase exponencial y suponiendo que *MudI1734* se haya insertado en el gene de la fitasa, se sugiere que la expresión de actividad de fitasa que se detecta durante la fase exponencial, muy probablemente, se deba a la acción inespecífica de otras fosfatasas ácidas.

Cuadro V.2 . Actividad de β -galactosidasa y fitasa durante las fases exponencial y estacionaria de crecimiento de las mutantes *phy::MudII1734* en LB y LB con glucosa.

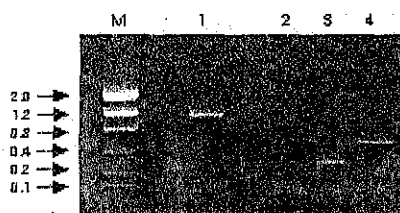
Cepa	Fenotipo	Medio de cultivo	Actividad específica de β -galactosidasa (U/D.O.)		Actividad específica de fitasa (U/ mg de proteína)	
			Exponencial	Estacionaria	Exponencial	Estacionaria
MW 25	<i>phy</i> ⁺	LB	4.89 \pm 1.1.2	0	0.149 \pm 0.012	0.044 \pm 0.020 (0.3)
		LBG	15.6 \pm 2.41	10.0 \pm 6.9 (0.6)*	0.062 \pm 0.030	0.039 \pm 0.004 (0.6)
MW49	<i>phy::MudII1734</i>	LB	11.8 \pm 2.49	40.3 \pm 0.7 (3.4)	0	0
		LBG	12.87 \pm 1.43	53.2 \pm 0.8 (4.1)	0.029 \pm 0.007 ξ	0.007 \pm 0.001 (0.26)
MW52	<i>phy::MudII1734</i>	LB	12.94 \pm 2.38	42.7 \pm 0.1 (3.3)	0	0
		LBG	15.64 \pm 3.19	59.7 \pm 10 (3.8)	0.012 \pm 0.001	0.015 \pm 0.000 (1.25)

* Factor de regulación: Actividad en fase estacionaria/Actividad en fase exponencial

V.3.2 Confirmación de la inserción del *Mu*dI1734 en el gene de fitasa.

Utilizando los oligonucleótidos derivados de la secuencia del gene *appA* de fitasa en *E. coli* (Rodríguez *et al.*, 1999), se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1200 pb (Fig. V.1). Este fragmento no se presentó en las cepas mutantes MW49 y MW52, utilizando las mismas condiciones de la reacción de amplificación de PCR. Utilizando estos mismos oligonucleótidos para el gene *appA* en combinación con oligonucleótidos de los extremos derecho e izquierdo del *Mu*dI1734 para amplificar el ADN de la cepa MW52, se obtuvieron dos fragmentos de ADN: i) un fragmento de aproximadamente 300 pb, utilizando los oligonucleótidos F1 y MUR y ii) otro fragmento de aproximadamente 600 pb, utilizando los oligonucleótidos R1 y MUL (Fig. V.1). Estos resultados indican que al insertarse el fago *Mu*dI1734 en la mutante MW52 provocó la desaparición del fragmento de 1200 pb, cuya secuencia presenta una homología de 83% con el gene *appA* de *E. coli* (GeneBank 145283) (Fig. V.2).

La mutante MW49 puede ser el resultado de una inserción diferente del bacteriófago, ya que no se amplificó ningún fragmento utilizando los diferentes oligonucleótidos.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. V.1.- Geles de agarosa de los productos de PCR. Carriles: M) Marcador de peso molecular de ADN en Kb; 1) ADN genómico de *R. terrigena* MW25 con los oligonucleótidos F1 y R1; 2) ADN genómico de MW52 con los oligonucleótidos de F1 y R1; 3) ADN genómico de MW52 con los oligonucleótidos de F1 y MUR; 4) ADN genómico de MW52 con los oligonucleótidos de R1 y MUL.

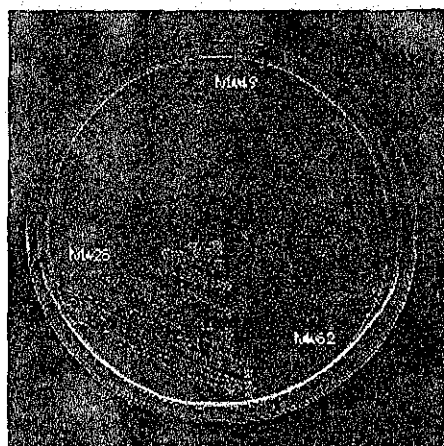
1 TGCTCAGTGTGGCCATGTAGGATGAGACCCGTGGATGAACCAACTCTTGACCTAGCCGA
 61 CAAACTGGGATGGTACCGCCGGTAACCATATCCTTTGGAATTCACCCGACTATGGATATT
 121 TTGACTAAGCTGCCGACTTATGACACTATGGTACTATGGTACGTTTTTGTACTCGACCCCT
 181 TCTCCCGTATGCTCACATTAATGTCATAACCATGGTGATACGTATAGTCCGATGGCTTGC
 241 TTGCTGTATCTGGCGTTTGCCAACCTGGATACTGCGAACGTGACTGACGCTGATCCTCAG
 301 CAGGGCAGGATGGGTCAATTGCTGACTTTACCCGGGCATCGGCTAACGGCGTTTTGCGAA
 361 CTTGGAACGGGTTGCTTAATTTTCCGCAATTCAAAACCTTGTGCCCTTAAACGTTTCATAT
 421 CATGACTAAAGCTGTTTCATTTCACTATGGCATTACCCTATTTCAAGGTAACGCCGATAAT
 481 TTTTAFTTAACCGTTGCGATACGTCTCGCCTTAATGCTGACGGAGATTTTTAATCTGTTA
 541 AACCCCATTTATGACCTACCCACGGTTAAGTTACTTTTCCACTGATCCTAATTATACTTCT
 601 CTCCTTTCTTTTTTTTATATAACCTCCACATATTTTCCTCATGATCCCCTTATTTTCTTCA
 661 AATTATAACGCCCTTTCCTTTCTAATATTTAGCCTTGTTCACATTTATCTTCCATATAA
 721 CCCCCTTATTTAGGTAATTTTACTATATTCTTCTCTTATTCATTTTCTCTTCTTCTTAT

Fig. V.2.- Secuencia nucleotídica parcial del gene de fitasa de *R. terrigena* comb. nov. MW25. GeneBank AF427147.

V.3.3.- Caracterización fenotípica de mutantes *phy::MudI1734*

Las cepas mutantes de *K. terrigena*, obtenidas mediante la inserción de *MudI1734* y con fenotipo *phy*, MW49 y MW52, forman colonias pequeñas en placas de LB y LB glucosa (Fig. V.3) y no crecen en medios mínimos, ni en condiciones de microaerofilia (sin agitación). Estas mismas mutantes presentan retraso en el crecimiento en LB y LB glucosa durante las primeras 8h de cultivo y alcanzan la fase estacionaria con densidades ópticas mucho menores a las obtenidas con la cepa silvestre isogénica MW25 (Fig. V.4).

La cepa MW52 presentó una tasa de crecimiento ligeramente mayor cuando el medio LB fue suplementado con glucosa (fig. V.4), mientras que la mutante MW49 mostró un retraso en el crecimiento en presencia de glucosa. Esto hace suponer que ambas mutantes con fenotipo *phy* pudieran ser el resultado de inserciones diferentes del bacteriófago *MudI1734* en gene u operón de la fitasa, confirmando así las observaciones hechas durante la amplificación del ADN de esta mutante MW49.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. V.3.- Colonias de *R. terrigena* comb. nov. MW25 y cepas mutantes *phy::MudI1734* (MW49 and MW52) crecidas en LB glucosa.

En un intento por determinar si la disminución en la velocidad de crecimiento alcanzada, se debía a un aumento de sensibilidad a las condiciones de crecimiento, se realizaron curvas de viabilidad determinando las unidades formadoras de colonias por mililitro (u.f.c./ml) durante el crecimiento en LB glucosa en comparación con el comportamiento de la curva de crecimiento evaluado por densidad óptica (Fig. V.5). Los resultados demuestran que en la cepa progenitora MW25, aún cuando la densidad óptica se mantiene a las 72 h, la viabilidad de las células disminuye hasta tres unidades logarítmicas mientras que, las mutantes *phy::MudI1734* mantuvieron el mismo comportamiento de la curva de viabilidad y la curva de densidad óptica. Esto parece indicar, que las células de estas mutantes que carecen de actividad de fitasa, por alguna razón, están aumentando la viabilidad durante la fase estacionaria de crecimiento.

Las células durante la fase estacionaria mantienen su viabilidad aún en las condiciones de estrés que se presentan en esta fase de crecimiento debido a una serie de cambios metabólicos entrelazados. Con el objeto de determinar si ese aumento de viabilidad durante esta fase está ligado al aumento de resistencia a otras condiciones de estrés, se determinó también la osmotolerancia de estas mutantes con fenotipo *phy*⁻ (Cuadro V.3). Se observó que en un medio hiperosmolar, como es LB glucosa NaCl 2.4 M, el porcentaje de sobrevivencia comparado con el obtenido para la cepa *rpoS*⁻ (MW27), en las mismas condiciones hiperosmóticas fue mayor. Estos resultados confirman nuevamente, lo mencionado anteriormente, que ambas mutantes MW49 y MW52 podrían ser el resultado de inserciones diferentes del *MudI1734*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

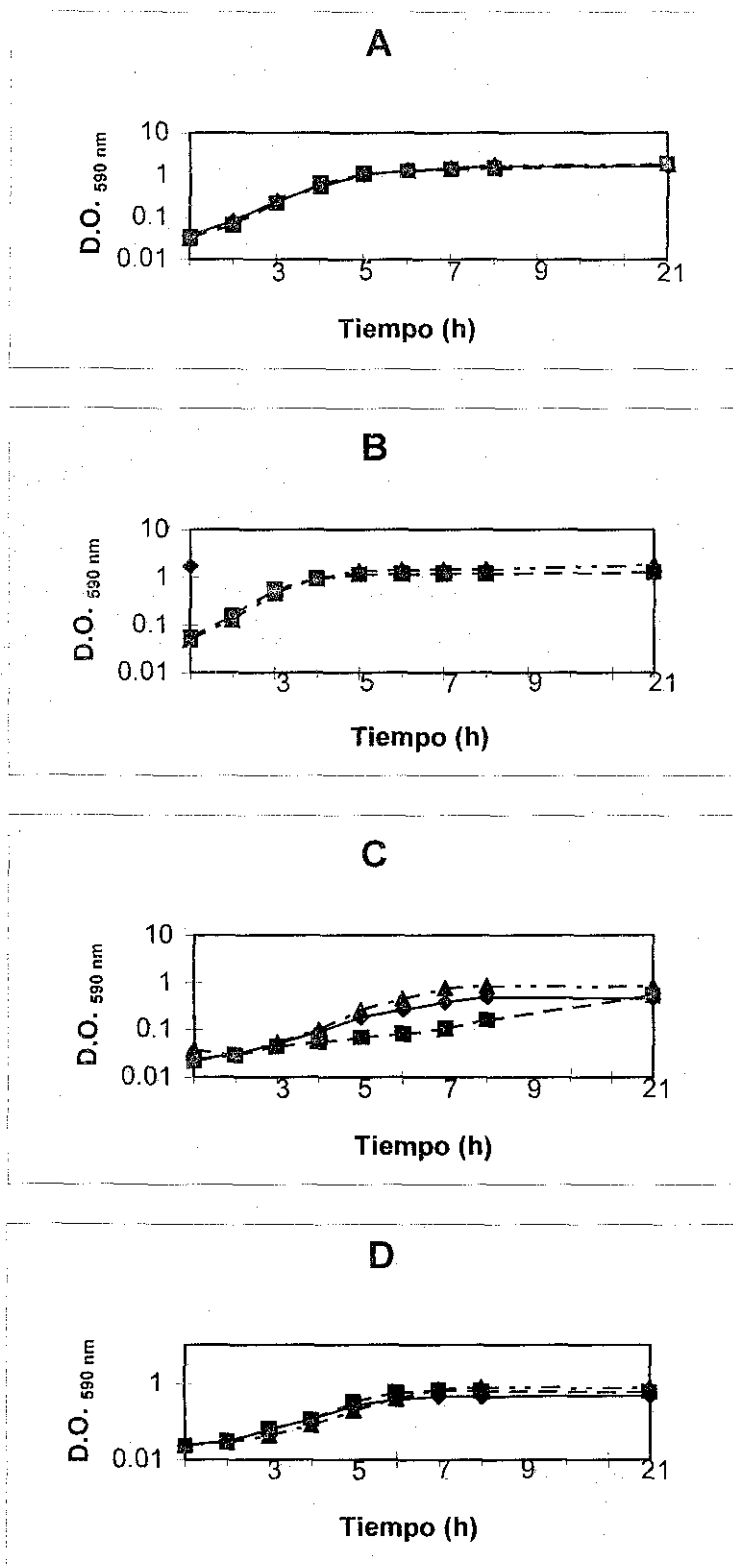


Fig. V.4.- Crecimiento de cepas de *R. terrigena*: A) DSM2687, B) MW25, C) MW49 y D) MW52 en LB (♦), LB glucosa (■) y LB galactosa (▲).

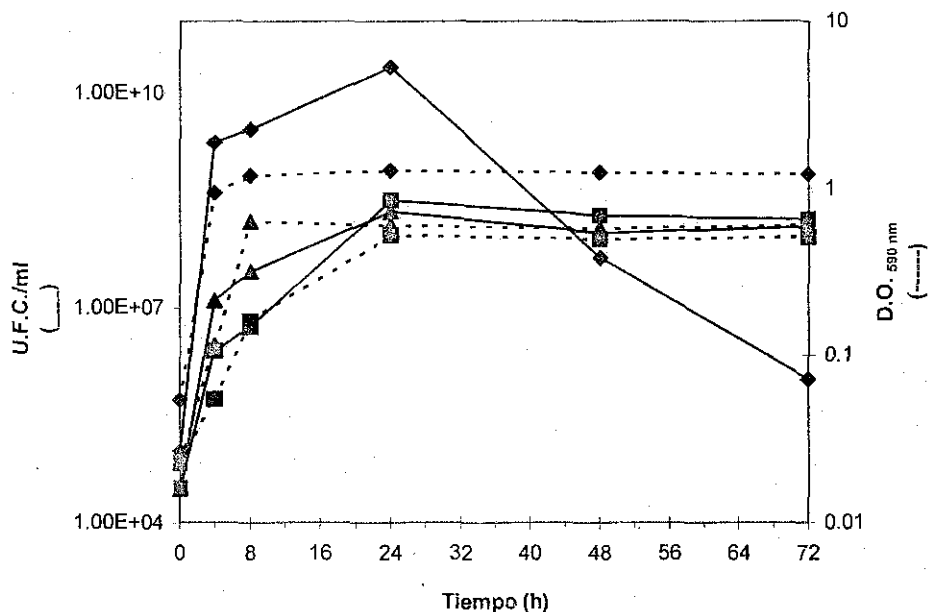


Fig. V.5.- Viabilidad de *R. terrigena* comb. nov. en LB glucosa: cepa progenitora MW25 (♦); cepas mutantes *phy::MudI1734*, MW49 (■) y MW52 (▲).

Cuadro V.3.- Osmotolerancia de células de *R. terrigena* en medios ricos.

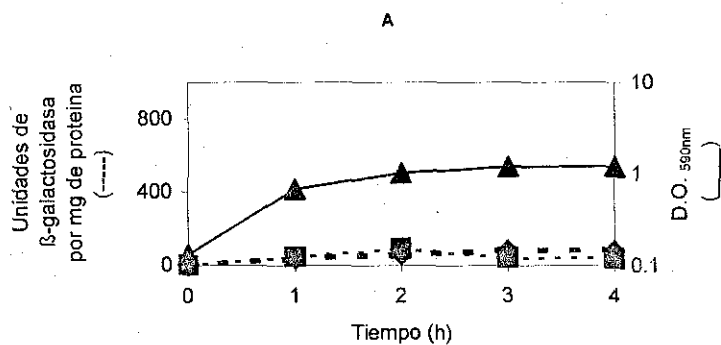
Cepa	de Medio de cultivo	Viabilidad		% de sobrevivencia
		u.f.c. / ml		
		0 h	24 h	
<i>Klebsiella terrigena</i>				
DSM2687	LB + NaCl 2.4 M	1.73×10^5	3.25×10^5	100
silvestre	LB glucosa + NaCl 2.4 M	1.89×10^5	2.01×10^5	100
MW25	LB + NaCl 2.4 M	4.45×10^5	1.14×10^5	25.6
P1 sensible	LB glucosa + NaCl 2.4 M	4.39×10^5	1.05×10^5	23.9
MW27	LB + NaCl 2.4 M	2.26×10^5	3.7×10^2	0.16
<i>rpoS::Tc^R</i>	LB glucosa + NaCl 2.4 M	3.18×10^5	3.2×10^2	0.10
MW49	LB + NaCl 2.4 M	7.90×10^5	9.70×10^4	12.3
<i>phy::MudI1734</i>	LB glucosa + NaCl 2.4 M	7.50×10^5	3.20×10^5	42.6
MW52	LB + NaCl 2.4 M	1.43×10^6	1.10×10^1	0.0007
<i>phy::MudI1734</i>	LB glucosa + NaCl 2.4 M	1.41×10^6	3.04×10^2	0.021

V.3.4 Expresión de β -galactosidasa en cepas *phy::MudI1734*

La actividad de β -galactosidasa en las mutantes MW49 y MW52 se incrementó de 3 a 4 veces durante la fase estacionaria en medios ricos (Cuadro V.2), independientemente de si fueron o no suplementados con glucosa. Lo que confirma que la fitasa es una enzima cuya expresión se incrementa durante la fase estacionaria de crecimiento. La adición de AMPc durante la fase exponencial de crecimiento en LB con glucosa provocó la disminución de la actividad de la mutante MW52 al alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, mientras que en la mutante MW49, el AMPc no provocó ningún cambio significativo en la expresión de β -galactosidasa durante la misma fase de crecimiento (fig. V.6). Esto, junto con el comportamiento de crecimiento en presencia de glucosa y la falta de amplificación de ADN en la mutante MW49, también sugiere que ambas cepas pudieran ser diferentes y ser el resultado de inserciones diferentes del *MudI1734* en el gene u operon de la fitasa. La inserción en la cepa MW49 pudo haber afectado la región reguladora.

La expresión de β -galactosidasa en la cepa MW52 confirma el efecto negativo de AMPc sobre la expresión de actividad de fitasa durante la fase estacionaria, descrito previamente en las cepas DSM2687 y MW29 en medios mínimos suplementados con glucosa y AMPc (Capítulo IV).

El papel de RpoS no se pudo confirmar debido a que, hasta el momento, no se ha podido obtener una doble mutante *rpoS::tn10 phy::MudI1734*. Sin embargo, se evaluó el efecto de las condiciones de estrés (anaerobiosis y pH ácido) sobre la expresión de β -galactosidasa en ambas mutantes, y se observó una fuerte inducción de actividad de β -galactosidasa en condiciones de anaerobiosis en ambas cepas (Fig. V.7), mientras que el estrés ácido no provocó ningún cambio.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

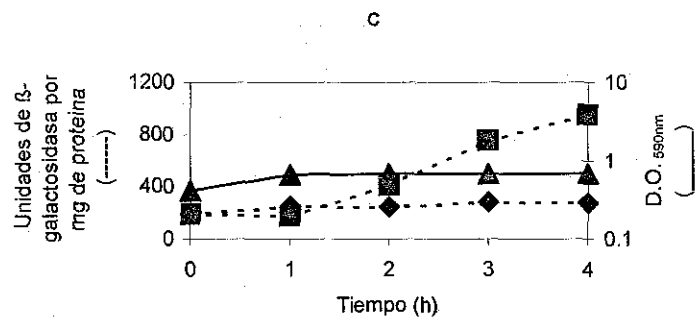
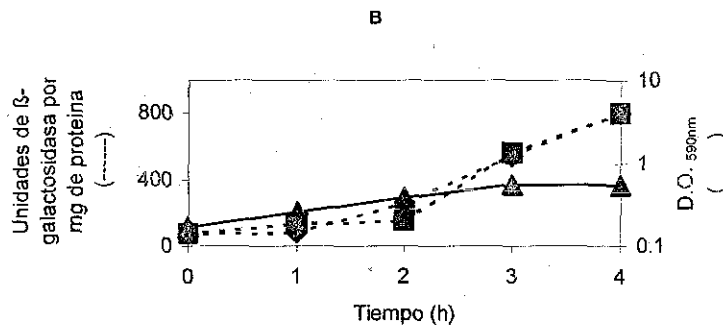
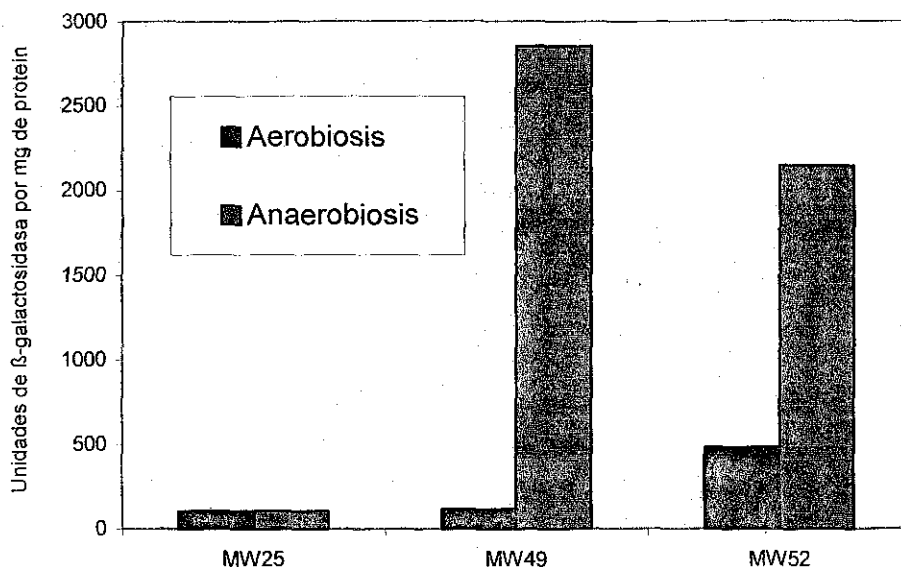


Fig. V.6.- Efecto del AMPc sobre la actividad de β -galactosidasa en cepas de *R. terrigena* comb. nov.: A) MW25, B) MW49 y C) MW52. Crecimiento en LB glucosa (▲). Actividad específica de β -galactosidasa en LB glucosa (■) y LB glucosa suplementada con AMPc (◆).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig. V.7.- Efecto de la anaerobiosis sobre la actividad específica de β -galactosidasa *R. terrigena* comb. nov. MW25 (cepa progenitora) y mutantes *phy::Mud11734*, MW49 y MW52.

V.4 DISCUSIÓN

La actividad de β -galactosidasa en las mutantes *phy::Mud11734* (sin actividad de fitasa), se incrementó durante la fase estacionaria, independientemente de la presencia de glucosa. Esto sugiere que la actividad de fitasa que se observa al inicio del crecimiento en medios de cultivo con fuentes de carbono diferentes a la glucosa, se deba a la acción inespecífica de otras fosfatasa, tal vez sujetas a represión catabólica, como es la glucosa 1-fosfatasa de *E. coli* (Pradel y Boquet, 1989), y que también la acción de estas enzimas se suma al ligero incremento de actividad de fitasa que se observa durante la fase estacionaria en medios con glucosa.

La adición de AMPc provocó disminución de actividad de β -galactosidasa en la cepa mutante MW52, sugiriendo un efecto negativo de AMPc sobre la expresión de fitasa durante la fase estacionaria. Esto, aunado a los resultados presentados en los experimentos realizados en el capítulo IV (Cuadro IV.3), indican que la fitasa se expresa durante la fase estacionaria, que el AMPc pudiera estar ejerciendo un papel negativo en su expresión durante esta fase y, que la actividad de fitasa que se observó durante el crecimiento activo, se pudiera deber a la acción inespecífica de fosfatasa, cuya expresión esta sujeta a represión catabólica y, probablemente, se

inducen por el aumento de la concentración de AMPc en las células. El efecto de RpoS no se determinó claramente, probablemente debido a que este factor sigma no ejerce un efecto directo sobre la expresión de la enzima. En *E. coli*, la expresión de *appA* se induce ligeramente tanto en la cepa silvestre como en la mutante *rpoS* en condiciones de limitación de carbono y, esta ligera inducción es dependiente de la presencia de AppY en ambos tipos de cepas (Atlung et al., 1997).

Con excepción del gene *appA* de *E. coli*, no se observó ninguna homología significativa con otros genes reportados en la base de datos GeneBank. Esto indica, probablemente, que se trata de una enzima novedosa con actividad de fitasa y pudiera también explicar la diferencia en actividad específica con *E. coli*.

Por otro lado, en *Saccharomyces cerevisiae* se aisló un gene supresor de la toxicidad a galactosa, este gene se obtuvo de un banco de ADNc de células HeLa. El análisis de secuencia nucleotídica de este gene reveló que se trataba del gene que corresponde a la monofosfatasa de *myo*-inositol humana. El metabolismo de galactosa mediado por esta enzima depende de la funcionalidad de galactocinasa (*galK* en *E. coli*) y epimerasa (*galE* en *E. coli*), lo que hizo suponer que la pirofosforilasa UDP-glucosa/galactosa mediaba la vía. Se demostró que la expresión del gene UGP1 de *S. cerevisiae*, que codifica para esta pirofosforilasa (equivalente a *galU* en *E. coli*, Neidhardt, et al., 1987) alivia la toxicidad a glucosa y galactosa en esta levadura (Mehta, et al., 1999).

Se ha reportado que las mutaciones en *Salmonella*, que le confieren sensibilidad a la infección por bacteriófagos como el P1, se localizan en el gene *galE* (Goldberg, et al., 1974), el cual codifica para la UDP-galactosa-4-epimerasa y cuya carencia provoca sensibilidad a glucosa y/o galactosa (Neidhardt et al., 1987; Hone et al., 1987; Krispin y Allmansberger, 1998). Esta enzima forma parte del proceso metabólico de conversión de galactosa a glucosa-1-fosfato (intermediario glicolítico). Esta vía metabólica es reversible y anfibólica, ya que las reacciones degradan la galactosa para ser utilizada como fuente de carbono y energía, vía la síntesis de glucosa-1-fosfato, así como también para la biosíntesis de carbohidratos complejos en las membranas y paredes celulares vía la síntesis de UDP-galactosa y/o UDP-glucosa (Adhya, 1987).

La carencia de actividad de fitasa en las cepas MW49 y MW52 provoca una disminución en la capacidad de crecimiento. Sin embargo la cepa MW52, aunque no alcanza los mismos niveles de crecimiento que la cepa isogénica MW25 y la cepa silvestre DSM2687, sí presenta una ligera recuperación del crecimiento cuando se adiciona glucosa y galactosa al medio de cultivo. Lo cual hace suponer, que la ausencia de actividad de fitasa en la cepa MW52, pudiera estar suprimiendo la sensibilidad a glucosa de la mutante sensible a P1 MW25 y que, muy probablemente, la actividad de fitasa o de hexafosfato *myo*-inositol fosfohidrolasa esté muy relacionada con el metabolismo anfibólico de glucosa y galactosa.

La baja tasa de crecimiento de las mutantes con fenotipo *phy⁻* aunado al comportamiento de alcanzar densidades ópticas muy bajas, formación de colonias pequeñas y de aumentar la sobrevivencia durante la fase estacionaria y, cuando menos en el caso de la cepa MW49 de haber aumentado la osmotolerancia, hace pensar que la mutación provocada por la inserción del *MudI1734* afecta el crecimiento de las células bacterianas adelantando la expresión de los fenotipos característicos de fase estacionaria. Esto es, como si el gene en el cual se insertó el bacteriófago estuviera regulando la expresión de un regulador global de la fase estacionaria y la falta del gene provocara la expresión de este regulador antes de tiempo, y las células entraran en fase estacionaria de crecimiento, aún antes de la aparición de las condiciones de limitación y estrés típicas de esta fase.

Todos estos mecanismos concuerdan con las respuestas metabólicas de la célula a la adaptación a condiciones de crecimiento durante la fase estacionaria (Kolter, *et al.*, 1993). Los resultados presentados en este estudio sugieren que, estas fosfatasa de hexafosfato de *myo*-inositol presentan un papel importante en la modulación del crecimiento y muy probablemente, como factores de transducción de señales. Recientemente, se han identificado varias fosfatasa de inositol en bacterias gram negativas y que muy probablemente están involucradas en la transducción de señales. Por ejemplo, *Salmonella dublin* excreta una proteína con actividad de fosfatasa de polifosfato de inositol, que contribuye a su patogenicidad, mediante el cambio en los niveles de fosfatos de inositol en las células epiteliales del hospedero (Norris *et al.*, 1998).

Algunos otros mecanismos reportados de inositol fosfatasa en diferentes bacterias son: i) modificar la permeabilidad de la membrana como en *Mycobacterium smegmatis* (Parish, *et al.*, 1997) o en *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Janczarek, *et al.*, 1999), ii) sintetizar derivados de fosfatos de inositol como osmolitos intracelulares como en *Thermotoga maritima* (Chen y Roberts, 1999) y *Methanococcus jannaschin* (Chen y Roberts, 1998) o iii) modular las reacciones de conformación de proteínas y estabilidad de productos de genes como una de las funciones que se le han atribuido a la inositol monofosfatasa SuhB de *E. coli* (Matsuhisa, *et al.*, 1995).

La descripción de este tipo de enzimas y con un papel importante en el metabolismo de *Raoultella terrigena* comb. nov. abre un campo de estudio, hasta hace corto tiempo, poco explorado en cuanto a los fosfatos de inositol como probables transductores de señal en el metabolismo de bacterias gram-negativas.

V.5 Referencias

- Adhya, S. (1987) The galactose operon. Cap. 93, Vol. II *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. Ed. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L.,

Brooks, Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H.E. ASM Press, Washington D.C. p.1503-1512.

- Atlung, T., Knudsen, K., Heerfordt, L. y Brøndsted, L. (1997) Effects of σ^S and the transcriptional activator AppY on induction of the *Escherichia coli* *hya* and *cbdAB-appA* operons in response to carbon and phosphate starvation. J. Bacteriol. 179(7):2141-2146.
- Chen, L. y Roberts, M.F. (1998) Cloning and expression of the inositol monophosphatase gene from *Methanococcus jannaschii* and characterization of the enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 64(7):2609-2615.
- Chen, L. y Roberts, M.F. (1999) Characterization of a tetrameric inositol monophosphatase from hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritime*. Appl. Environ. Microbiol. 65(10):4559-4567.
- Csonka, L.N., M.M. Howe, J.L., Ingraham, L.S., Pierson II y Turnbough, Jr, C.L. (1981) Infection of *Salmonella typhimurium* with coliphage MudI ($\text{Ap}^r \text{ lac}$): construction of *pyr::lac* gene fusions. J. Bacteriol. 145:299-305.
- Dassa, E., Cahu, M., Desjoyaux-Cherel, B. y Boquet, P.L. (1982) The acid phosphatase with optimum pH of 2.5 of *Escherichia coli*, physiological and biochemical study. J. Biol. Chem. 257:6669-6676.
- Dassa, E. y Boquet, P.L. (1985) Identification of the *appA* for the acid phosphatase (pH optimum 2.5) of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 200:68-73.
- Gerhardt, P., Murray, R., Wood, W. y Krieg, N. (1994) Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society of Microbiology, Washington, D.C. p. 555-585.
- Goldberg, R.B., Bender, R.A. y Streicher, S.L. (1974) Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. J. Bacteriol. 118(3):810-814.
- Golovan, S., Wang, G., Zhang, J. y Forsberg, C.W. 2000. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* *appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. Can. J. Microbiol. 46: 59-71.
- Hone, D., Morona, R. y Attridge, S. (1987) Construction of defined *galE* mutants of *Salmonella* for use as vaccines. J. Infec. Diseases 156(1):167-174.
- Janczarek, M., Krol, J. y Skorupska, A. (1999) The *pssB* gene product of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is homologous to a family of inositol monophosphatases. FEMS Microbiol. Lett. 173:319-325.

- Kolter, R., Siegele, D.A. y Tormo, A. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47:855-874.
- Krispin, O. and Allmansberger, R. 1998. The *Bacillus subtilis galE* gene is essential in the presence of glucose and galactose. *J. Bacteriol.* 180: 2265-2270.
- Lee-Rivera, I. y Gómez-Eichelmann, M.C. (1994) *Escherichia coli* cells with mutations in the gene for adenylate cyclase (*cya*) exhibit a heat shock response. *FEMS Microbiol.Lett.* 121:35-38.
- Matsuhisa, A., Suzuki, N., Noda, T. y Shiba, K. (1995) Inositol monophosphatase activity from the *Escherichia coli suhB* gene product. *J. Bacteriol.* 177(1):200-205.
- Mehta, D.V., Kabir, A. y Bhat P.J. (1999) Expression of human inositol monophosphatase suppress galactose toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*: possible implications in galactosemia. *Biochim. Biophys. Acta* 1454:217-226.
- Neidhardt, F.C. 1987. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. Ed. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger. H.E. ASM Press, Washington, D.C. pp.1313-1317.
- Neidhardt, F.C. 1999. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. Second edition Ed. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger. H.E. ASM Press, Washington, D.C.
- Norris, F.A., Wilson, M.P., Wallis, T.S. y Galyov, E.E. 1998. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 14057-14059.
- Parish, T. Liu, J., Nikaido, H. y Stoker, N.G. (1997) A *Mycobacterium smegmatis* mutant with a defective inositol monophosphate phosphatase gene homolog has altered cell envelope permeability. *J. Bacteriol.* 179(24):7827-7833.
- Pradel, E. y Boquet, P.L. (1989) Mapping of the *Escherichia coli* acid glucose-1-phosphatase gene *agp* and analysis of its expression in vivo by use of an *agp-phoA* protein fusion. *J. Bacteriol.* 171(6):3511-3517.
- Rodríguez, E., Han, Y. y Lei, X.G. (1999) Cloning, sequencing and expresión of an *Escherichia coli* acid phosphatase/pitase gene (*appA2*) isolated from pig colon. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 257:117-123.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Torriani-Gorini, A., Rothman, F.G., Silver, S., Wright, A., Yagil, Y. (eds.) 1987 Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms. ASM, Washington, D.C. 347p.
- Touati, E., Dassa, E. y Boquet, P.L. (1986) Pleiotropic mutations in appR reduce pH 2.5 acid phosphatase expression and restore succinate utilisation in CRP-deficient strains of *E. coli*. Mol. Gen. Genet. 202:257-264.
- Touati, E., Dassa, E., Dassa, J. y Boquet, P.L. (1987) Acid phosphatase (pH 2.5) of *Escherichia coli* : regulatory characteristics. In: Torriani-Gorini, A., Rothman, F.G., Silver, S., Wright, A., Yagil, Y. (eds.) 1987 Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms. ASM, Washington, D.C., pp 31-40.

CAPÍTULO VI

Conclusiones generales

La presencia de actividad de fitasa en *R. terrigena* comb. nov. depende del estado fisiológico de las células durante el crecimiento. La actividad de fitasa se incrementa durante el crecimiento activo en medios de cultivo con fuentes de carbono cuya utilización está sujeta a una represión catabólica y durante la fase estacionaria de crecimiento en medios con glucosa. Durante el crecimiento activo, el AMPc presenta un efecto positivo en la expresión de actividad de fitasa, mientras que durante la fase estacionaria, aparentemente, el efecto es negativo. Sin embargo, el efecto positivo durante la fase exponencial de crecimiento se debe, probablemente, a la suma de otras fosfatasas con actividad inespecífica que se inducen en las mismas condiciones. El factor RpoS no parece presentar un efecto significativo sobre el nivel de actividad durante la fase estacionaria.

La presencia de actividad de fitasa o fosfohidrolasa de *myo*-inositol en células de *R. terrigena* comb. nov. pudiera ser una enzima que esté involucrada en el metabolismo anfibótico de glucosa/galactosa y muy probablemente, con un papel importante en la modulación del crecimiento.

Anexo I

Regulation of *Raoultella terrigena* comb.nov. phytase expression

Marcela Zamudio, Aracely González, and Fernando Bastarrachea

Abstract: Phytases catalyze the release of phosphate from phytate (*myo*-inositol hexakisphosphate) to inositol polyphosphates. *Raoultella terrigena* comb.nov. phytase activity is known to increase markedly after cells reach the stationary phase. In this study, phytase activity measurements made on single batch cultures indicated that specific enzyme activity was subject to catabolite repression. Cyclic AMP (cAMP) showed a positive effect in expression during exponential growth and a negative effect during stationary phase. RpoS exhibited the opposite effect during both growth phases; the induction to stationary phase decreased twofold in the *rpoS::Tn10* mutant, but the effect of RpoS was not clearly determined. Two *phy::MudI1734* mutants, MW49 and MW52, were isolated. These formed small colonies in comparison with the MW25 parent strain when plated on Luria-Bertani (LB) or LB supplemented with glucose. They did not grow in minimal media or under anaerobiosis, but did grow aerobically on LB and LB glucose at a lower rate than did MW25. The β -galactosidase activity level in these mutants increased three to four fold during stationary growth in LB glucose and during anaerobiosis. Addition of cAMP during the exponential growth of MW52 on LB glucose provoked a decrease in β -galactosidase activity during the stationary phase, confirming its negative effect on phytase expression during stationary growth.

Key words: phytase activity, expression regulation, *Raoultella terrigena*.

Résumé : Les phytases catalysent le transfert du phosphate vers les inositol phosphatases à partir du phytate (*myo*-inositol hexakisphosphate). On sait que chez *Raoultella terrigena* comb.nov., l'activité de la phytase augmentait fortement lorsque les cellules atteignent la phase stationnaire. Dans la présente étude, des cultures simples en batch ont révélé que cette activité enzymatique spécifique pouvait être réprimée par des catabolites. L'AMP cyclique (AMPc) avait un effet positif sur l'expression en phase exponentielle de croissance mais cet effet était négatif durant la phase stationnaire. La souche RpoS a démontré un effet contraire au cours des deux phases de croissance en bouillon, et l'induction à la phase stationnaire a diminué de deux fois chez le mutant *RpoS::Tn10*, mais l'effet chez RpoS n'a pas été clairement identifié. Nous avons isolé deux mutants de *phy::MudI1734*, MW49 et MW52. Ces mutants produisaient des colonies plus petites que la souche parentale MW25 sur le milieu Luria-Bertani (LB) ou LB enrichi de glucose. Ces mutants ne se développaient pas en milieu minimal ou en anaérobiose mais ils poussaient en aérobiose sur les milieux LB ou LB avec glucose plus lentement que la souche MW25. Le niveau de l'activité β -galactosidase de ces mutants a augmenté de trois à quatre fois durant la phase stationnaire de croissance sur le LB glucose en anaérobiose. L'ajout d'AMPc pendant la phase exponentielle de MW52 sur LB avec glucose a provoqué une diminution de l'activité β -galactosidase pendant la phase stationnaire, confirmant ainsi son rôle négatif sur l'expression de la phytase pendant la phase stationnaire.

Mots clés : activité phytase, régulation de l'expression, *Raoultella terrigena*.

[Traduit par la Rédaction]

Introduction

Phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate 3-phosphohydrolase and *myo*-inositol hexakisphosphate 6-phosphohydrolase; EC 3.1.3.8 and 3.1.3.26, respectively) belong to the family of histidine acid phosphatases (Mitchell et al. 1997) and are found primarily in microorganisms and plants. They catalyze the release of phosphate from phytic acid (*myo*-inositol

hexakisphosphate) to inositol polyphosphates. In animal and plant cells, inositol polyphosphate phosphatases provide the only known means of dissipating the cellular pools of inositol 1,3,4,5,6 pentaphosphate (Ins(1,3,4,5,6)P₅) and inositol hexaphosphate (InsP₆). These polyphosphates are now recognized as having several important cellular functions, both in terms of their being functionally active in and of themselves and their serving as receptor-mobilized precursor

Received 14 May 2001. Revision received 12 October 2001. Accepted 7 November 2001. Published on the NRC Research Press Web site at <http://cjm.nrc.ca> on 31 January 2002.

M. Zamudio¹ and A. González. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Av. Juárez No. 421, Cd. Industrial, 97288 Apdo. Postal 1226-A, Mérida, Yucatán, México.

F. Bastarrachea. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, 04510 Apdo. Postal 70-228, México, D.F., México.

¹Corresponding author (e-mail: zmaya@tunku.uady.mx).

pools for intracellular signals. Quite substantial changes in Ins(1,3,4,5,6)P₅ and InsP₆ levels occur during the following physiologically important events (Shears 2001): (i) progression through the cell cycle (Balla et al. 1994), (ii) Rat-1 fibroblasts transformed with the *v-src* oncogene show an increase in the apparent amount of an inositol polyphosphate (Mattingly et al. 1991), and (iii) invasion of intestinal epithelial cells by *Salmonella* stimulates inositol polyphosphate metabolism (Zhou et al. 2001).

A number of phytase enzymes have been purified and characterized from various molds (Mitchell et al. 1997; Pasamontes et al. 1997a, 1997b; Piddington et al. 1993) and from bacteria, such as *Bacillus subtilis* (Shimizu 1992; Kerovuo et al. 1998), *Pseudomonas* sp. (Irving and Cosgrove 1971), *Escherichia coli* (Greiner et al. 1993), and *Klebsiella terrigena* (*Raoultella terrigena* comb.nov.; Drancourt et al. 2001) (Greiner et al. 1997). Purified *B. subtilis* phytase has proved to be highly specific for phytate and has maximal phytase activity at pH 7 and 55°C. It requires calcium for its activity and (or) stability and is readily inhibited by EDTA. *Escherichia coli* phytase behaves as a monomeric protein with a molecular mass of 42 kDa and is very specific for phytate at pH 4.5 and 55°C. The hydrolysis pathway for phytate in this species was described and consequently identified as a 6-phytase (EC 3.1.3.26) (Greiner et al. 2000). *Raoultella terrigena* comb.nov. phytase also behaves as a monomeric protein with a 40 kDa molecular mass, is rather specific for phytate, and exhibits optimal conditions for phytate degradation at pH 5 and 58°C (Greiner et al. 1997). The hydrolysis pathway for phytate in *R. terrigena* comb.nov. has been identified as a 3-phytase (EC 3.1.3.8). The only bacterial phytases that have been cloned to date are the *E. coli* gene *appA*, which encodes periplasmic phosphoanhydride phosphohydrolase (Dassa et al. 1991), and the *B. subtilis* phytase gene *phyC* (Kerovuo et al. 1998), which shows no homology to other phytase sequences or to other known sequences. The crystal structure of *E. coli* phytase has been determined, and despite a lack of sequence similarity, the structure closely resembles the overall fold of other histidine acid phosphatases (Lim et al. 2000). Only *B. subtilis* *phyC* appears not to be a member of the phytase subfamily of histidine acid phosphatases, but a novel enzyme having phytase activity. Its role in bacteria metabolism is still unclear.

In most bacteria, phosphatase expression is usually controlled by no more than one condition. For instance, the alkaline phosphatase in *E. coli* or in *B. subtilis* is synthesized in response to inorganic phosphate starvation (Torriani-Gorini et al. 1987). Among three acid phosphatases identified from *E. coli*, the phosphomonoesterase (EC 3.1.3.2) acid hexose phosphatase (optimum pH 4.5) is unaffected by external inorganic phosphate levels, but is subject to catabolite repression. In contrast, the pH 2.5 acid phosphatase, the *appA* product recently described as a phytase (Golovan et al. 2000), is subject to a more complex regulation. Its synthesis is induced upon entry of the cell into the stationary phase, by P_i starvation, and by lowered oxygen tension (Atlung and Brøndsted 1994). Under these circumstances *appA* was strongly dependent on sigma factor (σ^S) (Atlung et al. 1997). This same gene was also induced by carbon starvation, but in this case, the induction was dependent on AppY (protein

of the AraC family of transcriptional activators), which also showed σ^S -dependent induction by carbon starvation.

In *R. terrigena* comb.nov., phytase activity is known to increase markedly after cells reach the stationary phase (Greiner et al. 1997). This stationary phase induction suggests that phytase is not required during balanced growth, though it may be synthesized in response to a particular nutrient limitation. Among the nutrient limitations tested (Greiner et al. 1997), in comparison with *E. coli*, only carbon starvation was able to evoke an immediate synthesis of this enzyme. *Raoultella terrigena* phytase could be a novel enzyme, since it shows different kinetic parameters from the *E. coli* enzyme and since its cellular activity is induced under different conditions.

The causes and mechanisms of *R. terrigena* comb.nov. phytase expression regulation are still largely unknown. To address this lack of knowledge, we induced phytase activity in the enteric bacteria *R. terrigena* comb.nov. under a number of conditions and described some of the factors affecting its expression.

Materials and methods

Bacteria and phages

The bacterial strains and phages used in this study are listed in Table 1. Mud11734 is a bacteriophage transposon encoding kanamycin resistance that contains the Φ (*trpA'-lacZ'*)W209 gene fusion for isolating operon fusions in vivo. Mud11734 requires helper functions for transposition, though once isolated, insertions are quite stable (Castilho et al. 1984). Csonka et al. (1981) described the use of a P1 host range derivative of Mu cts (Mu cts hP1) as a helper to introduce bacteriophage Mu derivatives into P1-sensitive bacteria. We therefore used transposition-defective Mu derivatives (Mu *d*) with *E. coli* Mu1734.

Media and culture conditions

Luria-Bertani (LB) broth (Difco Tryptone, 10 g/L; Difco yeast extract, 5 g/L; NaCl, 5 g/L) was used as a rich medium, and MT minimal medium (K₂HPO₄, 5 g/L; KH₂PO₄, 2 g/L; NH₄NO₃, 0.5 g/L; MgSO₄, 0.2 g/L; yeast extract, 0.25 g/L; pH 7.0) was used as reported by Tambe et al. (1994). Difco agar was added to solid medium until a final concentration of 1.5% was attained. This was supplemented with D(+)-glucose (0.25%), inositol (0.25%), and sodium phytate (1.5 g/L) as needed. The following antibiotics were included in the media as required (final concentrations given): tetracycline (Tc) (25 µg/mL), chloramphenicol (Cm) (20 µg/mL), kanamycin sulfate (Km) (40 µg/mL), and sodium ampicillin (Ap) (30 µg/mL). Lac phenotypes were scored using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal; 40 µg/mL). Cultures were grown aerobically at 37°C, and growth was monitored by measuring the optical density at 590 nm (OD₅₉₀).

Isolation of *cya::Km^R* and *rpoS::Tn10* mutants

The strains MW27 (*rpoS::Tc^R*) and MW29 (*cya::Km^R*) were constructed via P1 transduction of sensitive *R. terrigena* MW25 (P1-sensitive strain) with a P1 lysate of *E. coli* RH90 (*rpoS::Tn10*) (Lange and Hengge-Aronis 1991) and a P1 lysate of *E. coli* MK1010 (*cya::Km^R*) (Lee-

Table 1. Bacterial strains and bacteriophages used in this work.

Strain and bacteriophage	Relevant phenotype	Source
<i>Escherichia coli</i> K12		
AB1157	P1 sensitive	F. Bastarrachea Collection
MK1010	W3110, <i>cya::Km</i>	Lee-Rivera and Gómez-Eichelmann 1994
RH90	MC4100, <i>rpoS359::Tn10</i>	Lange and Hengge-Aronis 1991
M8820	Mu cts hP1	Castilho et al. 1984
Mu1734	MudI1734	Castilho et al. 1984
<i>Raoultella terrigena</i> comb.nov. (<i>Klebsiella terrigena</i>)		
DSM2687	Phytase producer	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen Collection
MW25	P1 sensitive	This study
MW27	MW25, <i>rpoS359::Tn10</i>	This study
MW29	MW25, <i>cya::Tn5</i>	This study
MW49	MW25, <i>phy::MudI1734</i>	This study
MW52	MW25, <i>phy::MudI1734</i>	This study
Bacteriophage		
P1Cm	Propagated from MX485	F. Bastarrachea Collection
MudI1734	Propagated from Mu1734	Castilho et al. 1984

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table 2. Effect of carbon source in *Raoultella terrigena* comb.nov. (*Klebsiella terrigena* DSM2687) phytase activity expression during growth.

Culture medium	Sp. act. of phytase (U/mg of protein)*		
	Exponential phase	Stationary phase	Fold index [§]
MT glucose	0.064±0.03	0.105±0.04	1.64
MT inositol	0.764±0.26	0.072±0.03	0.09
MT sodium succinate	2.7	0.07	0.026
MT sodium acetate	1.31	0.49	0.37
LB	0.272±0.069	0.144±0.031	0.53
LB glucose	0.073±0.005	0.085±0.056	1.16

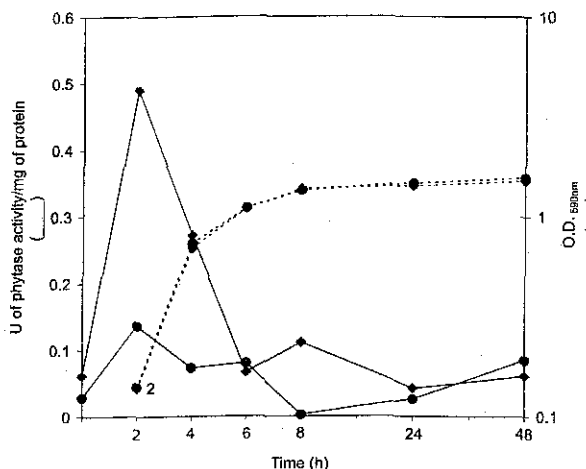
*Values given are average of at least three independent experiments. The exponential and stationary phases value is from a differential plot.
[§]Specific phytase activity in stationary phase / specific phytase activity in exponential phase.

Rivera and Gómez-Eichelmann 1994), respectively. Tc-resistant colonies were selected for MW27, and Km-resistant colonies for MW29. The *rpoS* phenotype was tested by determining its survival in long-time starvation and osmotolerance assays, and the *cya* phenotype was scored using lactose fermentation in MacConkey media, with and without cyclic AMP (cAMP).

P1 transduction

The isolation of P1-sensitive strains and P1 transduction was performed as in Goldberg et al. (1974). P1Cm grown on the donor was added at an infection multiplicity of 2:1 (P1Cm : bacterial cells), and phage titres were determined using *E. coli* AB1157 as host.

Fig. 1. Specific phytase activity during growth of *Raoultella terrigena* comb.nov. (*Klebsiella terrigena* DSM2687) in LB (◆) and LB glucose (●).



Survival assay

Long-time starvation survival was assayed by growing cells in 50 mL of MT medium containing 0.25% glucose. During growth and for up to 10 days afterward, samples were withdrawn for determination of OD₅₉₀ and viable cell numbers on LB plates, after appropriate dilution in 0.1 M NaCl.

For osmotolerance assays, cells were grown overnight in LB, washed, and then resuspended to a density of approximately 3 × 10⁶ cells/mL in LB supplemented with 2.4 M NaCl. The cultures were incubated with agitation at 37°C. Samples were withdrawn from the cultures at 0, 6, and 24 h

Table 3. Specific phytase activity during growth in different strains in rich media.

Strain	Relevant phenotype		Culture medium	Sp. act. of phytase (U/mg of protein)*		Fold index [§]
	Cya	RpoS		Exponential phase	Stationary phase	
DSM2687	+	+	LB	0.272±0.07	0.144±0.03	0.53
			LB glucose	0.073±0.005	0.085±0.05	1.1
MW25	+	+	LB	0.012±0.001	0.0044±0.0008	0.36
			LB glucose	0.037±0.018	0.031±0.02	0.83
MW27	+	-	LB	0.394±0.17	0.065±0.002	0.16
			LB glucose	0.197±0.09	0.065±0.023	0.32
MW29	-	+	LB	0.009±0.0004	0.113±0.007	12.5
			LB glucose	0.006	0.054±0.02	9.0

Note: +, present; -, absent.

*Values given are average of at least three independent experiments. The exponential and stationary phases value is from a differential plot.

[§]Specific phytase activity in stationary phase / specific phytase activity in exponential phase.

Table 4. Effect of cAMP in the expression of phytase activity during anaerobic growth.

Strain	Culture medium	Sp. act. of phytase (U/mg of protein)*		Fold index [§]
		Exponential phase	Stationary phase	
DSM2687	MT glucose	0.01	0.12	12
	MT glucose + cAMP	0.34	0.17	0.5
MW29 (<i>cya::Tn5</i>)	MT glucose	0.03	0.54	18
	MT glucose + cAMP	0.08	0.25	3.0

*Values given are average of at least three independent experiments. The exponential and stationary phases value is from a differential plot.

[§]Specific phytase activity in stationary phase / specific phytase activity in exponential phase.

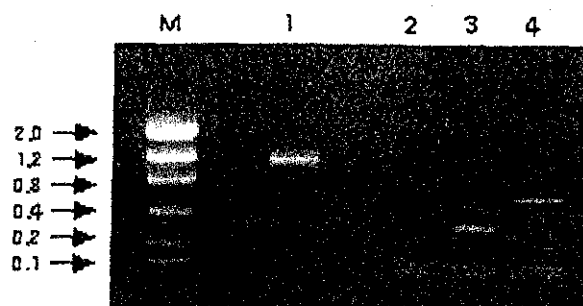
Table 5. β -Galactosidase and phytase activity in *Raoultella terrigena phy::Mud11734* mutants during exponential and stationary phase in LB and LB glucose media.

Strain	Phenotype	Culture medium	Sp. act. of β -galactosidase (U/O.D.)		Sp. act. of phytase (U/mg of protein)	
			Exponential phase	Stationary phase	Exponential phase	Stationary phase
MW25	<i>phy+</i>	LB	4.89±1.1.2	0	0.149±0.012	0.044±0.020 (0.3)
		LB glucose	15.6±2.41	10.0±6.9 (0.6)*	0.062±0.030	0.039±0.004 (0.6)
MW49	<i>phy::Mud11734</i>	LB	11.8±2.49	40.3±0.7 (3.4)	0	0
		LB glucose	12.87±1.43	53.2±0.8 (4.1)	0.029±0.007	0.007±0.001 (0.26)
MW52	<i>phy::Mud11734</i>	LB	12.94±2.38	42.7±0.1 (3.3)	0	0
		LB glucose	15.64±3.19	59.7±10 (3.8)	0.012±0.001	0.015±0.000 (0.2)

Note: O.D., optical density. The exponential and stationary phases value is from a differential plot.

*Values in brackets indicate fold index: stationary phase activity / exponential phase activity.

Fig. 2. Agarose gels of PCR reaction products. Lanes: M, DNA molecular weight markers in kb; 1, MW25 genomic DNA with primers F1 and R1; 2, MW52 genomic DNA with primers F1 and R1; 3, MW52 genomic DNA with primers F1 and MUR; and 4, MW52 genomic DNA with primers R1 and MUL.



for determination of viable cell numbers on LB plates, after appropriate dilution in 0.1 M NaCl.

Enzyme assays

Acid phosphatase

Cultured cells were harvested by centrifugation at 8000 \times g for 5 min and then resuspended in 100 mM sodium citrate buffer at pH 4.8 in the presence of 10 mM *p*-nitrophenyl-phosphate (Gerhardt et al. 1994). These suspensions were incubated for 6 h at 37°C, after which 1 mL of 40 mM glycine-NaOH buffer at pH 10.5 was added to them. They were then centrifuged at 8000 \times g for 5 min, and the enzyme activity was determined by measuring the absorbance of the *p*-nitrophenol formed at 388 nm in a Beckman DU650 spectrophotometer.

Fig. 3. Partial nucleotide sequence of the 1.2 kb amplified *Raoultella terrigena* comb.nov. DNA fragment using primers derived from *Escherichia coli* *appA*.

```

1 TGCTCAGTGTGGCCATGTAGGATGAGACCCGTGGATGAACCAACTCTTGACCTAGCCGA
61 CAAACTGGGATGGTACCGCCGGTAACCATATCCTTTGGAATTCACCCGACTATGGATATT
121 TTGACTAAGCTGCCGACTTATGACACTATGGTACTATGGTACGTTTTGTACTCGACCCCT
181 TCTCCCGTATGCTCACATTAATGTCATAACCATGGTGATACGTATAGTCCGATGGCTTGC
241 TTGCTGTATCTGGCGTTTGCCCAACCTGGATACTGCGAACGTGACTGACGCTGATCCTCAG
301 CAGGGCAGGATGGGTCAATTGCTGACTTTACCCGGGCATCGGCTAACGGCGTTTTGCGAA
361 CTTGGAACGGGTTGCTTAATTTTCCGCAATTCAAAACCTTGTGCCCTTAAACGTTTCATAT
421 CATGACTAAAGCTGTTTCATTTCACTATGGCATTACCCATTTCAAGGTAACGCCGATAAT
481 TTTTATTTAACCGTTGCGATACGTCTCGCCTTAATGCTGACGGAGATTTTAAATCTGTTA
541 AACCCATTATGACCTACCCACGGTTAAGTTACTTTTCCACTGATCCTAATTATACTTCT
601 CTCCTTTCTTTTTTTTATATACCTCCACATATTTCTCATGATCCCCTTATTTCTTCA
661 AATTATAACGCCCTTTCCTTTCTAATATTTAGCCTTTGTTACATTTATCTTCCATATAA
721 CCCCTTATTTAGGTAATTTACTATATTCTTCTTATTCATTTTCTTCTTCTTCTTAT

```

Fig. 4. Colonies of *Raoultella terrigena* comb.nov. parent strain MW25 and *phy::MudI1734* mutants MW49 and MW52 grown in LB glucose.



Phytase

Cultured cells were harvested by centrifugation at $8000 \times g$ for 5 min, washed twice with 0.1 M NaCl, resuspended in 0.1 M acetate buffer at pH 4.5 with the addition of $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ of lysozyme, and then sonicated. Cell debris was removed by centrifugation at $8000 \times g$ for 10 min. The resulting clear supernatant was used for phytase assay. Phytase

measurements were carried out at 37°C as described in Greiner et al. (1997).

β -Galactosidase

Assays were performed at room temperature (approximately 21°C). Cell pellets were suspended in 4 mL of Z buffer (0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0; 0.01 M KCl; 0.001 M MgSO_4 ; 0.05 M mercaptoethanol) and stored on ice. β -Galactosidase activity was measured in cells permeabilized by CHCl_3 - sodium dodecyl sulfate by monitoring the hydrolysis of *o*-nitrophenyl- β -galactopyranoside (Miller 1972).

Protein estimation

Total protein concentration was determined with Coomassie brilliant blue G-250 dye binding, using bovine serum albumin as a standard (Bradford 1976).

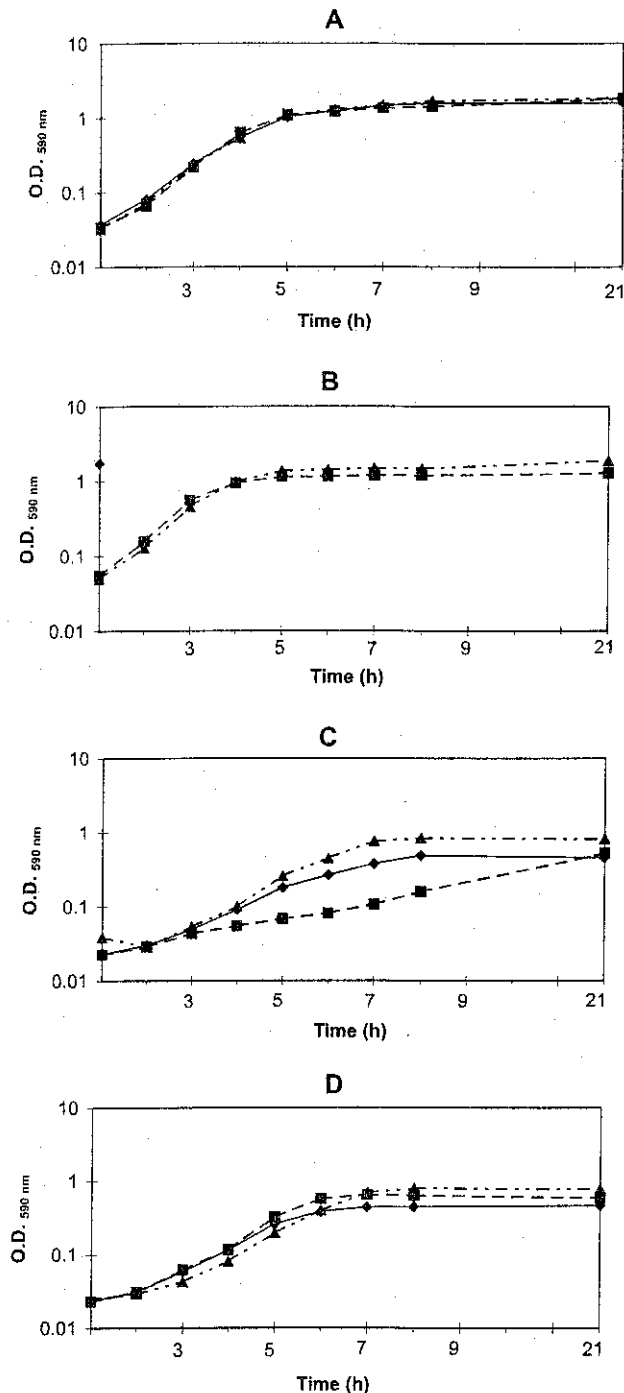
Isolation of *phy::MudI1734* mutants

Samples of a saturated culture of *R. terrigena* MW25 (0.1 mL each) were mixed with 0.1 mL of a *MudI1734* lysate. The cells were then suspended in 5 mL LC soft agar (LB supplemented with 5 mM CaCl_2 ; agar, 7.5 g/L), plated on LC, and incubated for 24 h at 37°C . The soft agar was resuspended with 0.1 M NaCl, then centrifuged at $8000 \times g$ for 5 min, and washed twice. Serial dilutions were plated on LB Km and incubated at 37°C . Km-resistant colonies were replica plated on LB glucose supplemented with Km and X-gal. Dark blue colonies were tested for acid phosphatase and phytase activity.

Localization of the *phy::MudI1734* element

The location of the *phy::MudI1734* element was determined by polymerase chain reaction (PCR) amplification of sequences flanking the right and left ends of the *MudI1734*

Fig. 5. Growth of *Raoultella terrigena* comb.nov. strains (A) DSM2687, (B) MW25, (C) MW49, and (D) MW52 in LB (◆), LB glucose (■), and LB galactose (▲).



element. MuR (forward): 5'-AAACGCTTTCGCCTTTTT-CGTGC-3' and MuL (reverse): 5'-GGACATTGGATTATT-CGGGAT-3'.

For this purpose, we also used primers derived from the DNA sequence of an *E. coli* pH 2.5 acid phosphatase gene (recently described as phytase; Golovan et al. 2000) (*appA*,

GenBank Accession No. 145283). Primers F1 (forward 254–267): 5'-GGAATTCCAGAGTGAGCCGGA-3' and R1 (reverse 1473–1486): 5'-GGGTACCTTACAAACTGCACG-3'.

PCR amplifications

The PCR reaction mixture (50 μ L) contained 400 ng of genomic DNA as a template, 50 pmol of each primer, and 45 μ L of PCR Supermix (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Rockville, Md.). The reaction was performed with the GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Shelton, Conn.). The thermal program included 1 cycle at 95°C (5 min), 30 cycles of (95°C (2 min), 50°C (1.5 min), and 72°C (1.5 min)), and 30 cycles of (92°C (1.5 min), 50°C (2 min), and 72°C (5 min)). The amplified PCR products were resolved using 1% agarose (Gibco BRL) gel electrophoresis.

Genomic DNA isolation

The genomic template was obtained using the method of bacterial lysis via alkali as described in Sambrook et al. (1989).

Nucleotide sequence

The amplified PCR fragment from *R. terrigena* MW25 was purified with the QIAquick DNA purification kit (Quiagen, Gene Alliance, Gilden, Germany). The nucleotide sequence was determined with the ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing kit with an ABI 377 DNA sequencer. Nucleotide homology searches were performed on National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases by BLAST searches. The nucleotide sequence data reported in this paper has been deposited in the GenBank under accession No. AF427147.

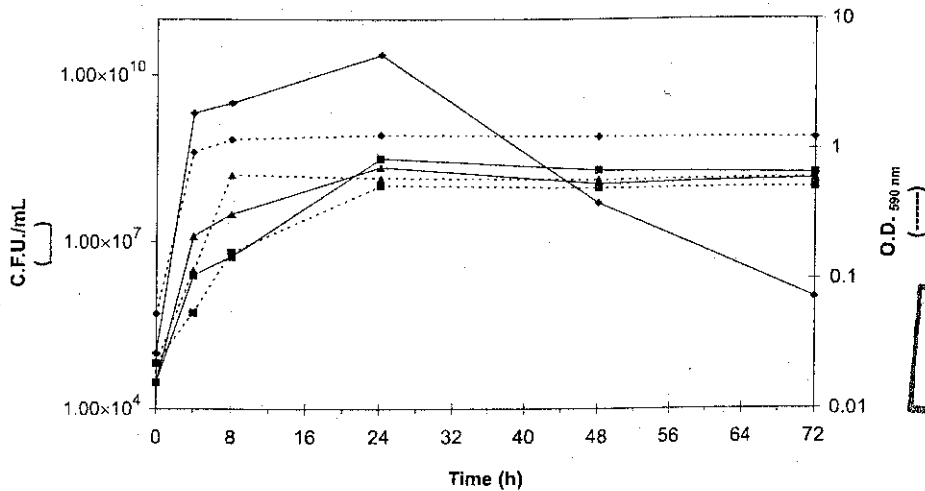
Results

Effect of carbon source in phytase activity expression during growth

The influence of various carbon sources in specific phytase activity was tested during *R. terrigena* comb.nov. (*Klebsiella terrigena* DSM2687) growth in minimal medium (Table 2). It was clear that whenever glucose was present there was a moderate increase in specific phytase activity during the stationary growth phase as opposed to the exponential phase. In other words, the fold increase of phytase activity in the stationary phase was higher in the presence of glucose. However, when inositol was used as a carbon source, the opposite occurred, and the fold increase of the stationary phase to the logarithmic growth (fold induction to stationary phase) was reduced. The same behavior was exhibited with other carbon sources, such as succinate or acetate.

In a rich LB medium, either supplemented with glucose or not, a sharp increase in specific phytase activity was observed at the beginning of growth and during the exponential phase (Fig. 1). This activity declined during late exponential growth, reaching a background level in the early and late stationary phases in unsupplemented LB. However, in glucose-supplemented LB, the activity declined to a non-detectable level in the late exponential phase and increased in the stationary phase. The sharp increase in phytase activity at the beginning of growth was three to four fold lower in

Fig. 6. Viability of *Raoultella terrigena* comb.nov. in LB glucose. Parent strain MW25 (◆); *phy::MudI1734* mutants MW49 (■) and MW52 (▲).



the LB glucose medium, suggesting a catabolite repression mechanism for phytase regulation.

Effect of cAMP and RpoS on phytase expression

cAMP is synthesized by the adenylate cyclase enzyme, and its level depends upon cell physiology. It acts as a sensory signal in gene regulation in conjunction with the Catabolite Repression Protein (CRP) and participates in a wide regulatory network involved in activating and repressing the expression of many genes (Saier et al. 1996). The RpoS sigma factor (σ^S) in enteric bacteria is either required for the expression of a number of genes during nutrient limitation and during growth into stationary phase or is required in response to environmental stresses (Lowen and Hengge-Aronis 1994).

As mentioned above, phytase activity expression is influenced by the nature of the carbon source in both minimal and rich media. This may be due to positive regulation by the CRP-cAMP complex, since cAMP concentration within a cell increases with this type of carbon source and LB medium as compared with cAMP concentrations in a glucose medium (Kolb et al. 1993). In the present study, the fold increase in phytase activity during the stationary phase was above 1.0, except when cells were grown under catabolite repression conditions. This also likely suggests a stationary phase induction.

Another factor potentially affecting phytase expression is RpoS. In enteric bacteria, the RpoS σ^S is either essential for or elevates the expression of a number of genes that are induced during the stationary phase (Lowen and Hengge-Aronis 1994).

To establish the involvement of cAMP and RpoS in *R. terrigena* comb.nov. phytase expression, we used mutants defective in one or the other. The *cya::Tn5* mutant (MW29), which is unable to synthesize a functional adenylate cyclase, exhibited very low activity during exponential growth in rich media, with or without glucose. A clear increase during stationary phase is indicative of a positive effect of cAMP during exponential phase and a negative effect during stationary

growth (Table 3). In contrast, the inactivation of *rpoS* resulted in a high increase in specific phytase activity during the exponential phase in LB and LB glucose media, clearly decreasing by twofold the induction to stationary phase compared with the wild isogenic *R. terrigena* comb.nov. strain MW25.

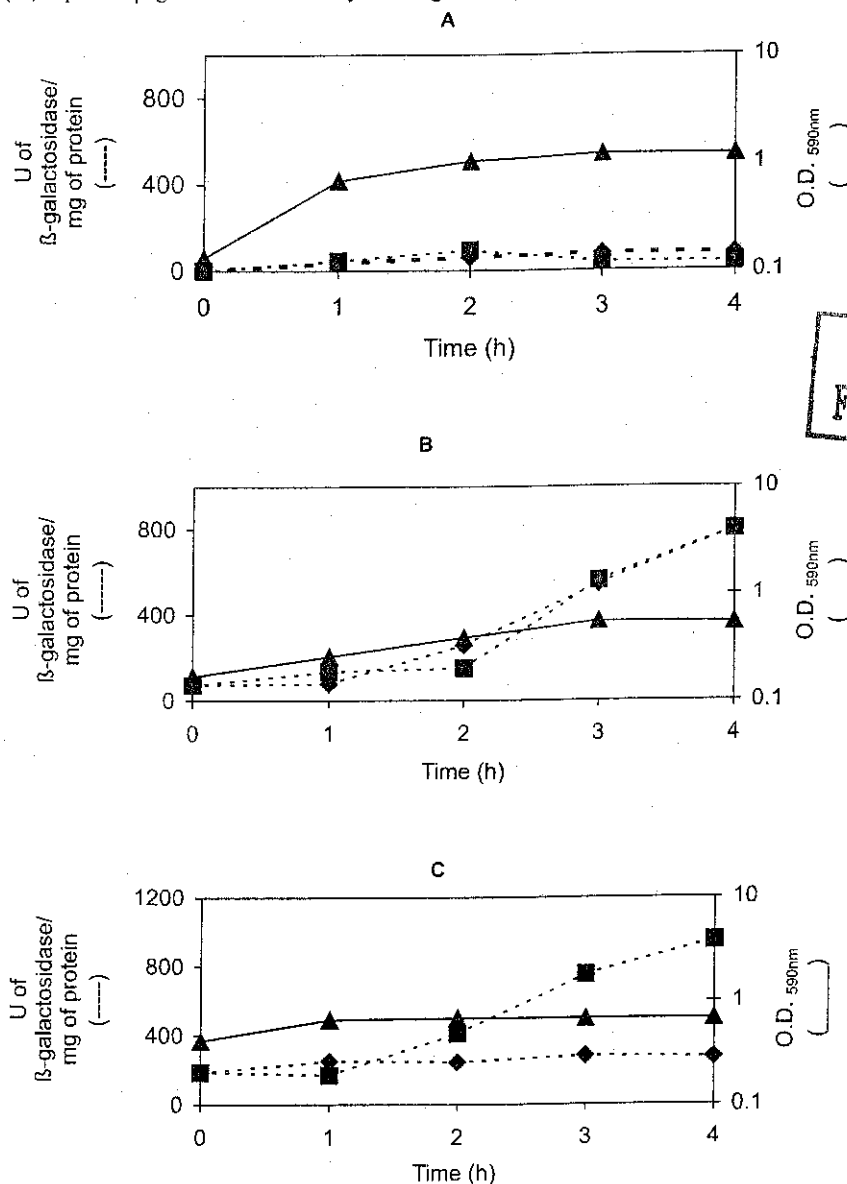
The increase in phytase activity during exponential phase in the *rpoS*⁻ mutant is not clearly understood, since RpoS is supposed to have a major effect only during stationary growth or during growth under stress conditions. One possible explanation is that the lack of a functional σ^S may have altered other physiological conditions that indirectly affect phytase activity expression.

The wild-type strain DSM2687 exhibited induction to stationary phase activity in minimal glucose medium. The addition of cAMP increased phytase activity during the exponential phase and decreased fold induction to stationary phase (Table 4). This suggests that the positive effect of *cya* on phytase expression during the exponential growth phase is probably due to the increase of intracellular cAMP. The absence of *cya* in MW29 clearly increased the fold induction at the stationary phase in either minimal glucose or rich media. In general, addition of cAMP slightly increased the specific phytase activity during exponential growth and decreased it in the stationary phase.

Isolation of *phy::MudI1734* mutants

Since phytase activity within the cell could result from more than one acid phosphatase acting cooperatively in response to environmental fluctuations, and their enzyme activity could be masking the effect of other regulators, *lac* fusions using *MudI1734* phage insertions were isolated. A lysate was prepared by thermal induction of *E. coli* Mu1734 (MuKm^R, hP1 cts62) with titres of 2.5×10^9 PFU/mL. This phage suspension was then used to infect *R. terrigena* MW25. Thirty-six percent of the Km^R *MudI1734* lysogens showed dark blue color in LB glucose supplemented with Km and X-gal. Sixty-six mutants with no acid phosphatase activity were recovered after mutagenesis with *MudI1734*. Only two

Fig. 7. Effect of cAMP on β -galactosidase activity in *Raoultella terrigena* comb.nov. strains (A) MW25, (B) MW49, and (C) MW52. Growth in LB glucose (\blacktriangle). Specific β -galactosidase activity in LB glucose (\blacksquare) and in LB glucose supplemented with cAMP (\blacklozenge).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

of these mutant strains (MW49 and MW52) showed no phytase activity during stationary phase in LB, and they had only very low detectable activity level in LB glucose (Table 5). The level of β -galactosidase activity in these mutants clearly increased three to four fold during stationary growth, suggesting that the lack of phytase activity was due to *MudI1734* insertion.

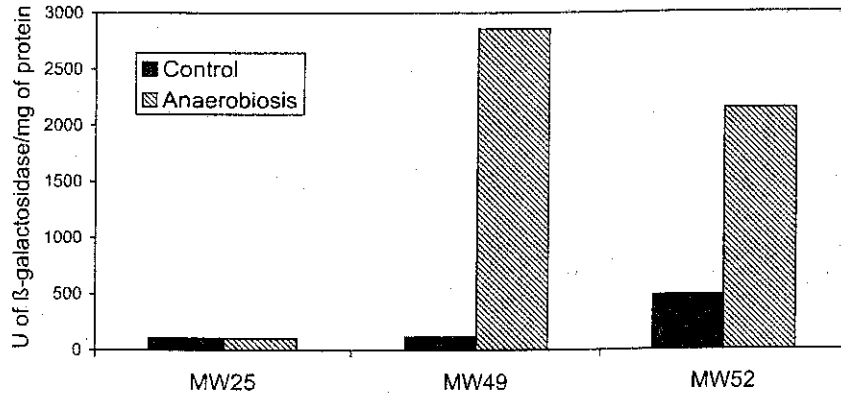
Confirmation of *MudI1734* insertion in the phytase gene

Fragments of approximately 1200 and 400 bp were amplified from the genomic DNA of *R. terrigena* MW25 using primers derived from the *E. coli appA* gene (Fig. 2). These fragments were absent in the MW49 and MW52 mutants. The insertion of the *MudI1734* element in these mutants was

determined by PCR amplification of (i) the sequences flanking the right and left ends of the *MudI1734* element and (ii) the primers derived from the *E. coli appA* gene. Only two PCR products were obtained: one fragment of approximately 300 bp, using F1 and MUR primers; and another of approximately 600 bp, using R1 and MUL primers with MW52 DNA (see also Fig. 2). These results indicate that the 1200-bp fragment, which disappeared during *MudI1734* transposon insertion in the *R. terrigena* MW52 mutant, corresponds to a DNA fragment whose partial sequence shares 83% homology with the *E. coli appA* (accession No. 145283) (Fig. 3).

MW49 may result from a different *MudI1734* bacteriophage insertion, since no DNA fragment was amplified with the different primers.

Fig. 8. Effect of anaerobiosis on specific β -galactosidase activity in *Raoultella terrigena* comb.nov. MW25 (parent strain) and *phy::MudI1734* mutants MW49 and MW52.



Phenotypic characterization of *phy::MudI1734* mutants

The *phy::MudI1734* mutants, MW49 and MW52, formed smaller colonies than the MW25 parent strain when plated on LB or LB glucose (Fig. 4) and did not grow in minimal media or under anaerobiosis. They grew aerobically in LB and LB glucose at a much lower rate than did MW25 and only reached low optical densities (Fig. 5). MW52 showed a slightly higher growth rate when LB was supplemented with glucose, while MW49 decreased its growth rate in the presence of glucose. This suggests that both these phytase-less mutants could result from different *MudI1734* bacteriophage insertions, confirming the observations made with the PCR amplification of the MW49 DNA.

To determine if the low optical density reached during growth was due to glucose sensitivity, we evaluated viable counts. The *phy::MudI1734* mutants maintained viability during the stationary phase (Fig. 6), while the parent strain MW25 decreased in the number of viable cells. This behavior suggests that the failure to synthesize a functional phytase increases viability during the stationary phase.

β -Galactosidase expression in *phy::MudI1734* mutants

The level of β -galactosidase activity in the MW49 and MW52 mutants was almost the same as in the MW25 parent strain at the beginning of the exponential growth phase in LB glucose, but increased three to four fold during stationary growth (Table 5). Phytase activity drastically decreased during this same growth phase in the same medium, probably indicating that the phytase activity detected in this medium during the exponential growth phase could be due to the action of other nonspecific phosphatases. On the other hand, no phytase activity was detected in LB medium in either growth phase.

The β -galactosidase level in MW49 and MW52 did increase twofold during the exponential phase in LB medium. Also, a threefold induction was observed during stationary growth (Table 5), indicating that the increased phytase activity observed in this medium is not due to other phosphatases and is subject to catabolite repression. These results also confirm that phytase is primarily expressed during stationary growth or under carbon limitation.

The addition of cAMP during the exponential growth phase of MW52 in LB glucose caused a decrease in β -galactosidase activity during the stationary phase, while its

addition in MW49 showed no significant change in expression of this enzyme (Fig. 7). This effect of cAMP in MW52 confirms its negative effect on phytase expression during stationary growth, noted in a previous section.

The role of RpoS could not be confirmed, since no double mutant *rpoS::Tn10 phy::MudI1734* could be isolated after several trials. However, the effect of acid stress and anaerobiosis was tested, and high β -galactosidase activity induction was observed only during anaerobiosis (Fig. 8).

Discussion

The phytase activity expression in *R. terrigena* comb.nov. cells during growth was dependent on the nature of the carbon source in the culture media. Depending on the growth phase, cAMP and RpoS exhibited both negative and positive effects. The expression of β -galactosidase in *phy::MudI1734* mutants demonstrated that phytase should be expressed under certain stress conditions imparted during stationary growth, such as carbon limitation and anaerobiosis. Additionally, the negative effect of cAMP during the stationary phase was confirmed, though the effect of RpoS was not clearly determined, probably because the σ^S does not exert a direct effect on phytase gene expression. In *E. coli*, upon carbon starvation, the expression of *appA* was weakly induced in the wild-type strain and in the *rpoS* mutant (Ailung et al. 1997). The weak induction was dependent on AppY in both the absence and presence of RpoS.

The partial sequence of the amplified *R. terrigena* comb.nov. DNA fragment showed 83% homology with the *appA* gene, from nucleotides 230–531. Except for the *E. coli appA* gene, no significant sequence homologies were found in the GenBank database using BLAST program. This probably indicates a novel enzyme having phytase activity and could explain the difference in specific activity with *E. coli* (Greiner et al. 1997).

Salmonella P1-sensitive mutants have been reported to be a subclass of *galE* mutants (Goldberg et al. 1974). The *galE* gene is part of the galactose operon, a set of genes encoding proteins required for galactose utilization (Neidhardt 1987). The *galE* gene product, UDP-galactose 4-epimerase, catalyzes both the conversion of UDP-galactose to UDP-glucose and the reverse reaction. UDP-galactose can serve as the galactose donor for polysaccharide biosynthesis in the

production of lipopolysaccharide (LPS). *galE* mutants, therefore, cannot produce wild type LPS structures on their cell surface. Addition of small amounts of galactose to the growth media of these mutants results in the production of sufficient UDP-galactose to restore wild type LPS production. However, *galE* mutants fed with excess galactose and glucose accumulate UDP-galactose, which is toxic to the cell (Neidhardt 1987; Krispin and Allmansberger 1998). Since the P1-sensitive strain of *R. terrigena* (MW25) could be a subclass of *galE* mutants, and the lack of phytase activity in MW52 provoked a slight growth recuperation in contrast with the decrease in growth of MW25 when glucose was added to the growth medium, we suggest that phytase could be involved in the amphibolic metabolism of glucose and galactose. In other words, it could be metabolizing UDP-galactose and not allowing its accumulation.

The low growth rate, the low optical densities obtained, and the increase in survivor numbers during the stationary phase of the *phy::MudI1734* mutants indicate that the transposon insertion in the phytase gene effected cell growth by showing an early expression of the characteristic stationary phase phenotype. It seems that the cells are entering an early stationary phase before the limitations and stress conditions typical of this growth phase are manifested. This may be due to an increase in expression of an important regulator of the stationary phase whose expression is subject to direct or indirect negative regulation by phytase or *myo*-inositol phosphohydrolase.

The phytase activity expression observed in the present study (i) when cells had to adapt to environmental fluctuations imposed before the onset of growth and (ii) when actively growing cells are shifted to stressful conditions suggests that phytase activity could be involved in a signal transduction mechanism of metabolism regulation. Several inositol phosphatases have recently been identified in gram-negative bacteria and are probably involved in signal transduction. For instance, *Salmonella dublin* excretes an inositol polyphosphate 4-phosphatase, which contributes to its virulence by subverting cellular inositol phosphate signaling reactions (Norris et al. 1998). Two proteins with inositol monophosphate phosphatase activity implicated in the control of gene expression have also been reported in *E. coli* (Inada and Nakamura 1996) and *Rhizobium leguminosarum* (Janczarek et al. 1999).

Raoultella terrigena comb.nov. phytase is expressed under stressful conditions, such as carbon limitation and anaerobiosis. cAMP exerts a negative effect during its stationary phase expression, is probably involved in the amphibolic metabolism of glucose and galactose, and may also be directly or indirectly involved in controlling the expression of an important stationary growth regulator.

Acknowledgements

Appreciation is expressed to Regine Hengge-Aronis for kindly providing *E. coli* RH90, to Carmen Gómez for *E. coli* MK1010, and to Laura Camarena for *E. coli* M8820 and Mu1734. We thank Dr. Rossana Rodríguez from CINVSTAV-IPN Unidad Mérida for her support during the

PCR analysis. This work was supported by a grant from the International Foundation for Science.

References

- Atlung, T., and Brøndsted, L. 1994. Role of the transcriptional activator AppY in regulation of the *cyx appA* operon of *Escherichia coli* by anaerobiosis, phosphate starvation, and growth phase. *J. Bacteriol.* **176**: 5414–5422.
- Atlung, T., Knudsen, K., Heerfordt, L., and Brøndsted, L. 1997. Effects of σ^S and the transcriptional activator AppY on induction of the *Escherichia coli* *hya* and *cbdAB-appA* operons in response to carbon and phosphate starvation. *J. Bacteriol.* **179**: 2141–2146.
- Balla, T., Nakanishi, S., and Catt, K.J. 1994. Cation sensitivity of inositol 1,4,5-trisphosphate production and metabolism in agonist-stimulated adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 16 101 – 16 107.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Castilho, B.A., Olfson, P., and Casadaban, M.J. 1984. Plasmid insertion mutagenesis and *lac* gene fusion with mini-Mu bacteriophage transposons. *J. Bacteriol.* **158**: 488–495.
- Csonka, L.N., Howe, M.M., Ingraham, J.L., Pierson, L.S., II, and Turnbough, C.L., Jr. 1981. Infection of *Salmonella typhimurium* with coliphage MudI (Ap^r *lac*): construction of *pyr::lac* gene fusions. *J. Bacteriol.* **145**: 299–305.
- Dassa, E., Fsihi, H., Marck, C., Dion, M., Kieffer-Bontemps, M., and Boquet, P.L. 1991. A new oxygen-regulated operon in *Escherichia coli* comprises the genes for a putative third cytochrome oxidase and for pH 2.5 acid phosphatase (*appA*). *Mol. Gen. Genet.* **229**: 341–352.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., and Rousselier, P. 2001. Phylogenetic analysis of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen.nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb.nov., *Raoultella terrigena* comb.nov., and *Raoultella planticola* comb.nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 925–932.
- Gerhardt, P., Murray, R., Wood, W., and Krieg, N. 1994. Methods for general and molecular bacteriology. American Society of Microbiology, Washington, D.C. pp. 555–585.
- Goldberg, R.B., Bender, R.A., and Streicher, S.L. 1974. Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. *J. Bacteriol.* **118**: 810–814.
- Golovan, S., Wang, G., Zhang, J., and Forsberg, C.W. 2000. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* *appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Can. J. Microbiol.* **46**: 59–71.
- Greiner, R., Konietzny, U., and Jany, K.D. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**: 107–113.
- Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U., and Jany, K.D. 1997. Purification and characterization of *Klebsiella terrigena* phytase. *Arch. Biochem. Biophys.* **341**: 201–206.
- Greiner, R., Carlsson, N., and Alminger, M.L. 2000. Stereospecificity of *myo*-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **84**: 53–62.
- Inada, T., and Nakamura, Y. 1996. Autogenous control of *subB* expression of *Escherichia coli*. *Biochimie*, **78**: 209–212.
- Irving, G.C., and Cosgrove, D.J. 1971. Inositol phosphate

production of lipopolysaccharide (LPS). *galE* mutants, therefore, cannot produce wild type LPS structures on their cell surface. Addition of small amounts of galactose to the growth media of these mutants results in the production of sufficient UDP-galactose to restore wild type LPS production. However, *galE* mutants fed with excess galactose and glucose accumulate UDP-galactose, which is toxic to the cell (Neidhardt 1987; Krispin and Allmansberger 1998). Since the P1-sensitive strain of *R. terrigena* (MW25) could be a subclass of *galE* mutants, and the lack of phytase activity in MW52 provoked a slight growth recuperation in contrast with the decrease in growth of MW25 when glucose was added to the growth medium, we suggest that phytase could be involved in the amphibolic metabolism of glucose and galactose. In other words, it could be metabolizing UDP-galactose and not allowing its accumulation.

The low growth rate, the low optical densities obtained, and the increase in survivor numbers during the stationary phase of the *phy::MudI1734* mutants indicate that the transposon insertion in the phytase gene effected cell growth by showing an early expression of the characteristic stationary phase phenotype. It seems that the cells are entering an early stationary phase before the limitations and stress conditions typical of this growth phase are manifested. This may be due to an increase in expression of an important regulator of the stationary phase whose expression is subject to direct or indirect negative regulation by phytase or *myo*-inositol phosphohydrolase.

The phytase activity expression observed in the present study (i) when cells had to adapt to environmental fluctuations imposed before the onset of growth and (ii) when actively growing cells are shifted to stressful conditions suggests that phytase activity could be involved in a signal transduction mechanism of metabolism regulation. Several inositol phosphatases have recently been identified in gram-negative bacteria and are probably involved in signal transduction. For instance, *Salmonella dublin* excretes an inositol polyphosphate 4-phosphatase, which contributes to its virulence by subverting cellular inositol phosphate signaling reactions (Norris et al. 1998). Two proteins with inositol monophosphate phosphatase activity implicated in the control of gene expression have also been reported in *E. coli* (Inada and Nakamura 1996) and *Rhizobium leguminosarum* (Janczarek et al. 1999).

Raoultella terrigena comb.nov. phytase is expressed under stressful conditions, such as carbon limitation and anaerobiosis. cAMP exerts a negative effect during its stationary phase expression, is probably involved in the amphibolic metabolism of glucose and galactose, and may also be directly or indirectly involved in controlling the expression of an important stationary growth regulator.

Acknowledgements

Appreciation is expressed to Regine Hengge-Aronis for kindly providing *E. coli* RH90, to Carmen Gómez for *E. coli* MK1010, and to Laura Camarena for *E. coli* M8820 and Mu1734. We thank Dr. Rossana Rodríguez from CINVSTAV-IPN Unidad Mérida for her support during the

PCR analysis. This work was supported by a grant from the International Foundation for Science.

References

- Atlung, T., and Brøndsted, L. 1994. Role of the transcriptional activator AppY in regulation of the *cyx appA* operon of *Escherichia coli* by anaerobiosis, phosphate starvation, and growth phase. *J. Bacteriol.* **176**: 5414–5422.
- Atlung, T., Knudsen, K., Heerfordt, L., and Brøndsted, L. 1997. Effects of σ^S and the transcriptional activator AppY on induction of the *Escherichia coli* *hya* and *cbdAB-appA* operons in response to carbon and phosphate starvation. *J. Bacteriol.* **179**: 2141–2146.
- Balla, T., Nakanishi, S., and Catt, K.J. 1994. Cation sensitivity of inositol 1,4,5-trisphosphate production and metabolism in agonist-stimulated adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 16 101 – 16 107.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Castilho, B.A., Olfson, P., and Casadaban, M.J. 1984. Plasmid insertion mutagenesis and *lac* gene fusion with mini-Mu bacteriophage transposons. *J. Bacteriol.* **158**: 488–495.
- Csonka, L.N., Howe, M.M., Ingraham, J.L., Pierson, L.S., II, and Turnbough, C.L., Jr. 1981. Infection of *Salmonella typhimurium* with coliphage MudI (Ap^r *lac*): construction of *pyr::lac* gene fusions. *J. Bacteriol.* **145**: 299–305.
- Dassa, E., Fsihi, H., Marck, C., Dion, M., Kieffer-Bontemps, M., and Boquet, P.L. 1991. A new oxygen-regulated operon in *Escherichia coli* comprises the genes for a putative third cytochrome oxidase and for pH 2.5 acid phosphatase (*appA*). *Mol. Gen. Genet.* **229**: 341–352.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., and Rousselier, P. 2001. Phylogenetic analysis of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen.nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb.nov., *Raoultella terrigena* comb.nov., and *Raoultella planticola* comb.nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 925–932.
- Gerhardt, P., Murray, R., Wood, W., and Krieg, N. 1994. Methods for general and molecular bacteriology. American Society of Microbiology, Washington, D.C. pp. 555–585.
- Goldberg, R.B., Bender, R.A., and Streicher, S.L. 1974. Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. *J. Bacteriol.* **118**: 810–814.
- Golovan, S., Wang, G., Zhang, J., and Forsberg, C.W. 2000. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* *appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Can. J. Microbiol.* **46**: 59–71.
- Greiner, R., Konietzny, U., and Jany, K.D. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**: 107–113.
- Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U., and Jany, K.D. 1997. Purification and characterization of *Klebsiella terrigena* phytase. *Arch. Biochem. Biophys.* **341**: 201–206.
- Greiner, R., Carlsson, N., and Alminger, M.L. 2000. Stereospecificity of *myo*-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **84**: 53–62.
- Inada, T., and Nakamura, Y. 1996. Autogenous control of *subB* expression of *Escherichia coli*. *Biochimie*, **78**: 209–212.
- Irving, G.C., and Cosgrove, D.J. 1971. Inositol phosphate

- phosphatases of microbiological origin. Some properties of a partially purified bacterial phytase. *Aust. J. Biol. Sci.* **24**: 547–557.
- Janczarek, M., Krol, J., and Skorupska, A. 1999. The *pssB* gene product of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is homologous to a family of inositol monophosphatases. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**: 319–325.
- Kerovuo, J., Laureaus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., and Apajalahti, J. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2079–2085.
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Grges, S., and Adhya, S. 1993. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 749–795.
- Krispin, O., and Allmansberger, R. 1998. The *Bacillus subtilis* *galE* gene is essential in the presence of glucose and galactose. *J. Bacteriol.* **180**: 2265–2270.
- Lange, R., and Hengge-Aronis, R. 1991. Growth phase regulated expression of *bolA* and morphology of stationary phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor σ^S . *J. Bacteriol.* **173**: 4474–4481.
- Lee-Rivera, I., and Gómez-Eichelmann, M.C. 1994. *Escherichia coli* cells with mutations in the gene for adenylate cyclase (*cya*) exhibit a heat shock response. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**: 35–38.
- Lim, D., Golovan, S., Forsberg, C.W., and Jia, Z. 2000. Crystal structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 108–113.
- Lowen, P.C., and Hengge-Aronis, R. 1994. The role of the sigma factor σ^S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 53–80.
- Mattingly, R.R., Stephens, L.R., Irvine, R.F., and Garrison, J.C. 1991. Effects of transformation with the *v-src* oncogene on inositol phosphate metabolism in rat-1 fibroblasts. *D-myo-Inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate* is increased in *v-src*-transformed rat-1 fibroblasts and can be synthesized from *D-myo-inositol 1,3,4-trisphosphate* in cytosolic extracts. *J. Biol. Chem.* **266**: 15 144 – 15 153.
- Miller, J.H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mitchell, D.B., Vogel, K., Weimann, B., Pasamontes, L., and van Loon, A.P.G.M. 1997. The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes of two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology (Reading, U.K.)*, **143**: 245–252.
- Neidhardt, F.C. 1987. Multigene systems and regulons. Chap. 98. *In Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. Vol. II. Edited by F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K. Brooks Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H.E. Umbarger. ASM Press, Washington, D.C. pp. 1313–1317.
- Norris, F.A., Wilson, M.P., Wallis, T.S., and Galyov, E.E. 1998. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 14 057 – 14 059.
- Pasamontes, L., Haiker, M., Henriquez-Huecas, M., Mitchell, D.B., and van Loon, A.P.G.M. 1997a. Cloning of the phytases from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1353**: 217–223.
- Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., and van Loon, A.P.G.M. 1997b. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1696–1700.
- Piddington, C.S., Houston, C.S., Paloheimo, M., Cantrell, M., Miettinen-Oinonen, A., Nevalainen, H., and Rambosk, J. 1993. The cloning and sequencing of the genes encoding phytase (*phy*) and pH 2.5-optimum acid phosphatase (*aph*) from *Aspergillus niger* var. *awamori*. *Gene*, **133**: 55–62.
- Saier, M.H., Jr., Ramseier, T.M., and Reizer, J. 1996. Regulation of carbon utilization. *In Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. Edited by F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K. Brooks, M.S. Magasanik, and H.E., Umbarger. ASM Press, Washington, D.C. pp. 1325–1343.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Shears, S.B. 2001. Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate. *Cell. Signalling*, **13**: 151–158.
- Shimizu, M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (*natto*) N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**: 1266–1269.
- Tambe, S.M., Kaklij, G.S., Kelkar, S.M., and Parekh, L.J. 1994. Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: evidence for unusually small active enzyme peptide. *J. Ferment. Bioeng.* **77**: 23–27.
- Torriani-Gorini, A., F.G. Rothman, S. Silver, A. Wright, and Y. Yagil (Editors). 1987. *Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms*. ASM, Washington, D.C. p. 347.
- Zhou, D., Chen, L.M., Hernández, L., Shears, S.B., and Galan, J.E. 2001. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol. Microbiol.* **39**: 248–259.