



ILARIA BENUCCI
 DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE E FORESTALI - DAFNE
 UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
 ILARIA.BE@UNITUS.IT

ENZIMI IMMOBILIZZATI SU CARRIERS FOOD-GRADE INNOVATIVI: APPLICAZIONI AL SETTORE ALIMENTARE

Il chitosano è un polimero naturale, atossico e biodegradabile, che negli ultimi anni ha trovato numerose applicazioni industriali. Ad oggi è anche utilizzato come materia prima a basso costo per la produzione di carriers food-grade innovativi, sotto forma di perle e film, per l'immobilizzazione di enzimi da impiegare in diversi processi in continuo per il settore alimentare.

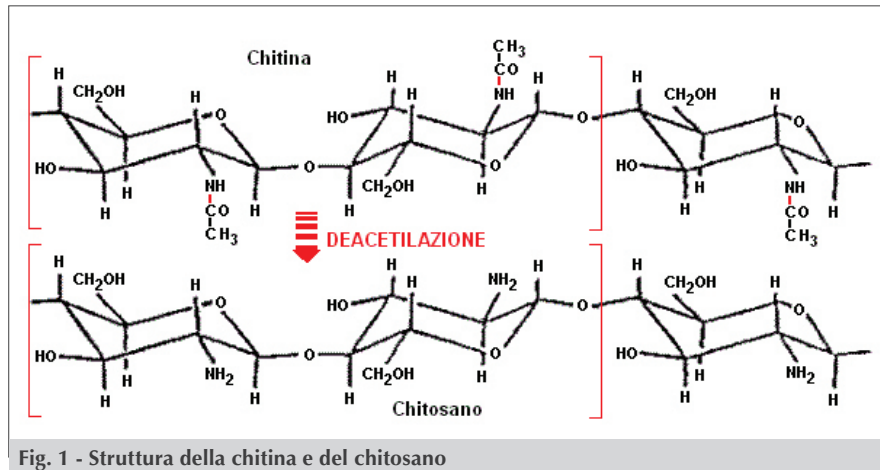


Fig. 1 - Struttura della chitina e del chitosano

Il chitosano

Il chitosano è un co-polimero a catena lineare, costituito da unità di *D*-glucosammina e *N*-acetil-*D*-glucosammina condensate attraverso legami β-1,4-*O*-glicosidici, che, a seconda della lunghezza della catena, presenta diverso peso molecolare (50-200 kDa) e differente grado di deacetilazione (40-98%). Il chitosano deriva dalla chitina (Fig. 1), scoperta dal chimico e farmacista francese Henri Braconnot nel 1811, che rappresenta il secondo polisaccaride più abbondante in natura dopo la cellulosa ed è uno dei principali componenti dell'es-

scheletro di insetti, crostacei e della parete cellulare dei funghi [1]. La chitina, ad oggi prodotta per un ammontare di 50.000 tonnellate annue, ha rappresentato per molto tempo un serio problema per l'industria ittica a causa della sua lenta biodegradabilità, fino a quando è stata scoperta la possibilità di trasformarla in un prodotto ad elevato valore aggiunto: il chitosano. In tal modo, la chitina si è trasformata da prodotto di scarto a materia prima disponibile a basso costo, diven-

tando così una risorsa di grande utilità. Industrialmente, il chitosano di origine animale (da *shellfish*) è ottenuto a partire dagli scarti della lavorazione dei crostacei; la materia prima (code, zampe e gusci di crostacei) viene sottoposta a pretrattamenti (lavaggio, macinazione e setacciatura), ad un processo di demineralizzazione con HCl 0,25 N a temperatura ambiente, in rapporto 1:40 p/v, che si completa in circa 15 minuti. Segue la deproteinizzazione con NaOH 1 N a 70 °C per 24 ore, al termine della quale si ottiene la chitina che viene sottoposta a deacetilazione a temperature elevate (100-120 °C), im-



piegando una soluzione di NaOH al 60% (p/v) [2]. La produzione di chitosano da *shellfish* presenta delle criticità, in particolare:

- i) elevata variabilità del prodotto finito, le cui caratteristiche dipendono dalla composizione del materiale di partenza, che è soggetta a stagionalità;
- ii) produzione di grandi quantitativi di reflui;
- iii) eventuale presenza di inquinanti (metalli pesanti) e di potenziali allergeni (proteine di origine animale, fra cui tropomiosina e pen m2) estratti da *shellfish*.

Una fonte alternativa di tale biopolimero è rappresentata da alcune specie fungine, tra cui *Aspergillus niger*, il cui contenuto in chitosano varia dal 20 al 22% di micelio secco [3]. Il chitosano da fonte fungina, rispetto a quello da *shellfish*, presenta proprietà più omogenee e standardizzate, soprattutto in riferimento al grado di deacetilazione, al peso molecolare, alla viscosità, all'assenza di inquinanti e potenziali allergeni. Negli ultimi decenni il chitosano ha assunto notevole importanza come biomateriale, per le sue peculiari caratteristiche biologiche (biocompatibilità, biodegradabilità e atossicità) oltre che per le sue proprietà chimiche, poiché, essendo una poliammina lineare, è ricco di gruppi amminici e idrossilici reattivi, disponibili per la formazione di legami.

Attualmente il chitosano trova impiego in numerose applicazioni ambientali, quali il trattamento delle acque reflue per la rimozione dei metalli pesanti o nei processi di potabilizzazione dell'acqua; nel settore tessile come fibra naturale; nell'industria cosmetica come additivo; in campo farmaceutico nei processi di rilascio controllato dei farmaci; in ambito medico per l'ingegneria biomedica dei tessuti, la costruzione

di pelle artificiale e per il trattamento delle ustioni; nell'industria alimentare, come integratore coadiuvante per il controllo del peso corporeo, la conservazione dei cibi, il *food packaging* e nel settore enologico. A tal riguardo, il chitosano di origine fungina (da *A. niger*) è stato approvato dalla commissione OIV nel 2009, che lo ha introdotto nel "Codice internazionale delle prassi enologiche". Il suo impiego nel mosto è stato autorizzato per facilitare la sfeccatura e la chiarifica e per prevenire la casse proteica. Nel vino, invece, il suo impiego è ammesso nelle operazioni di: riduzione del tenore di metalli pesanti (ferro, piombo, cadmio, rame) e di eventuali contaminanti (ad esempio ocratossina A); prevenzione della casse ferrica, rameica e proteica; controllo dei microrganismi indesiderati (*Brettanomyces* spp.); riduzione della torbidità mediante precipitazione dei colloidali in sospensione.

In campo biotecnologico, il chitosano è impiegato nella cromatografia e, soprattutto, come materia prima per la preparazione di supporti per l'immobilizzazione enzimatica. In quest'ultimo caso, i *carriers* a base di chitosano possono essere sotto forma di polvere, film, gel, fibre, membrane e sfere.

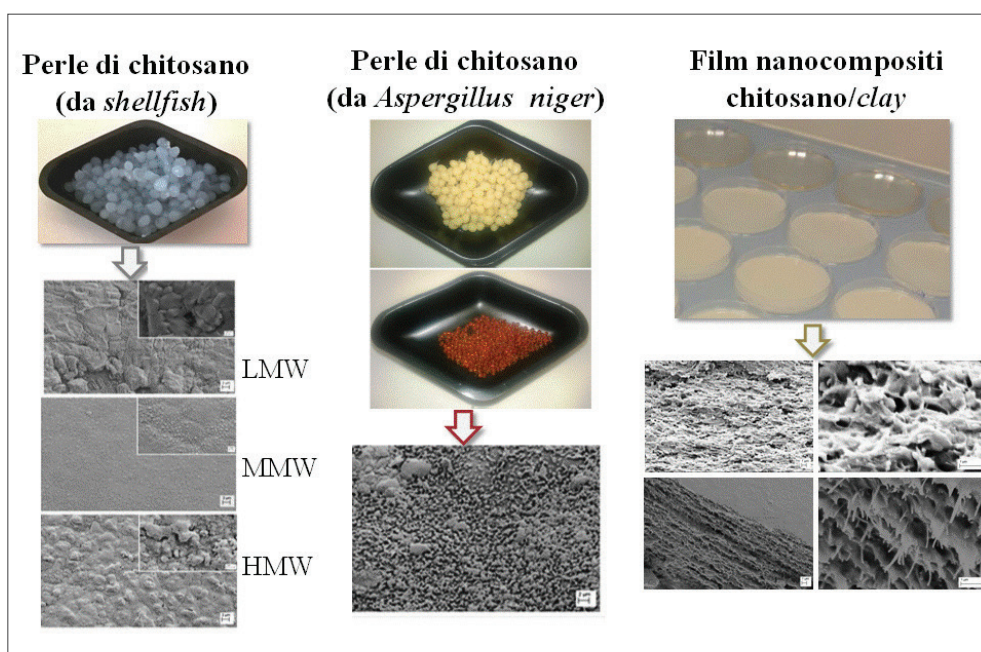


Fig. 2 - *Carriers food-grade* innovativi a base di chitosano da *shellfish* a diverso peso molecolare (LMW: basso peso molecolare, MMW: medio peso molecolare, HMW: alto peso molecolare) e da fonte microbica (*A. niger*), sotto forma di perle e film

Produzione di carriers food-grade a base di chitosano

Grazie alla sua biocompatibilità, biodegradabilità e atossicità, il chitosano si presenta come un materiale utile per la produzione di *carriers*, da utilizzare per l'immobilizzazione di enzimi di interesse alimentare. Fino a poco tempo fa, si trovavano in vendita delle perle a base di chitosano da *shellfish* chiamate 'Chitopearl' e commercializzate da Fuji Spinning Co. Ltd. (Tokyo, Giappone). In alternativa, è comunque semplice preparare in laboratorio supporti a base di chitosano ed in letteratura sono stati descritti diversi metodi [2]: i) evaporazione del solvente; ii) neutralizzazione; iii) cross-linking; iv) gelificazione ionotropica.

In questo ambito, il gruppo di ricerca coordinato dal Prof. Marco Esti, presso il Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE) dell'Università della Tuscia, si occupa da diversi anni della produzione di *carriers food-grade* innovativi a base di chitosano da *shellfish* (a diverso peso molecolare) e da fonte microbica (*A. niger*), sotto forma di perle e film (Fig. 2). L'aggiunta di materiali nanocompositi, ed in particolare di *nanoclay*, è stata recentemente testata con l'obiettivo di migliorare le proprietà meccaniche e termiche di tali *carriers*, che sono utilizzati per l'immobilizzazione di numerosi enzimi, fra cui proteasi vegetali, enzimi pectolitici e lisozima, da impiegare in diversi processi in continuo per il settore alimentare.

Rimozione selettiva di proteine instabili in vini bianchi mediante proteasi vegetali su perle e su film nanocompositi di chitosano

L'impurezza e stabilità sono requisiti fondamentali della qualità dei vini bianchi e possono influenzarne l'accettabilità da parte del consumatore. Le proteine solubili dell'uva, che si ritrovano nel vino, sono responsabili di uno dei più comuni difetti dei vini bianchi: l'instabilità (casse) proteica, che si manifesta con la comparsa di intorbidamenti e precipita-

ti in bottiglia. Nonostante il meccanismo di induzione della casse proteica non sia stato ancora pienamente chiarito, studi recenti hanno dimostrato che l'instabilità del vino non è correlata al contenuto totale di proteine, bensì alla presenza di particolari categorie, identificate come *pathogenesis-related proteins* che includono chitinasi e *thaumatin-like proteins*. L'impiego della bentonite rappresenta la pratica enologica più diffusamente applicata per la stabilizzazione proteica dei vini bianchi, nonostante si tratti di un metodo non selettivo che induce un depauperamento qualitativo del vino, in particolare delle molecole che contribuiscono all'aroma e al colore [4].

L'applicazione di proteasi acide vegetali (bromelina da gambo d'ananas e papaina da lattice di papaia), immobilizzate su *carriers home-made* a base di chitosano (perle e film nanocompositi), rappresenta un approccio selettivo e sostenibile per la stabilizzazione proteica dei vini bianchi, che può essere condotta in continuo all'interno di bioreattori, come ad esempio quelli a letto impaccato (PBR). Questi ultimi rappresentano una soluzione ideale e facilmente applicabile in cantina, come alternativa al trattamento con bentonite. In questo contesto, un bioreattore a letto impaccato contenente bromelina su perle di chitosano da *A. niger* (Fig. 3) è risultato efficiente sia nella riduzione dell'instabilità proteica potenziale (70-75%) di un vino Sauvignon blanc che nella rimozione delle frazioni proteiche responsabili di tale fenomeno, preservando le caratteristiche cromatiche, chimiche e organolettiche del vino trattato [5]. Prove sperimentali, condotte in *batch-mode*, hanno inoltre dimostrato che anche la papaina da lattice su

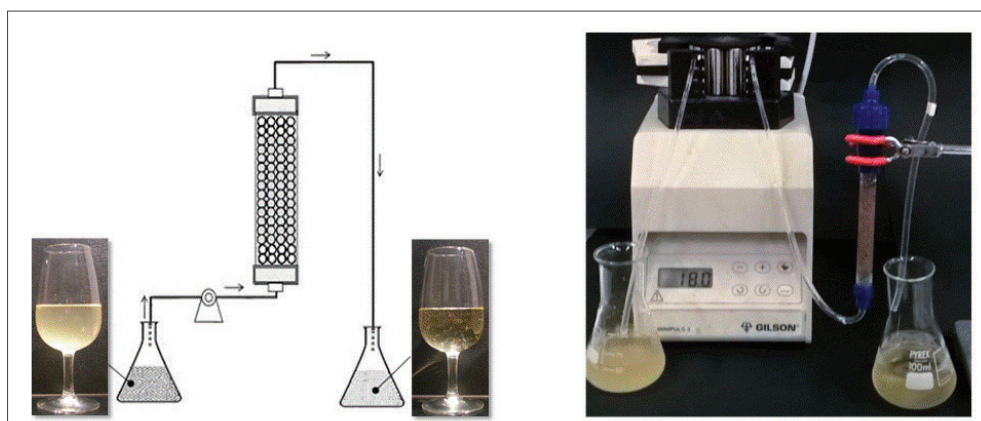


Fig. 3 - Bioreattore a letto impaccato da banco contenente proteasi immobilizzate

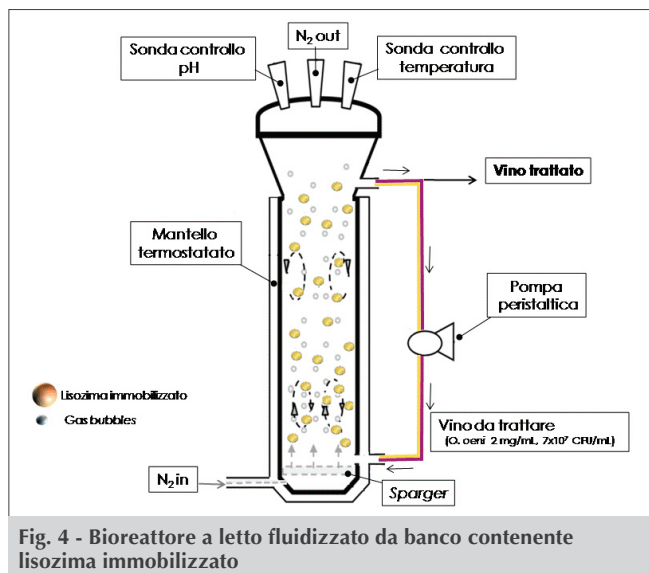


Fig. 4 - Bioreattore a letto fluidizzato da banco contenente lisozima immobilizzato

film nanocompositi a base di chitosano da *shellfish* (LMW) ha mostrato buone prestazioni catalitiche quando applicata in vini bianchi instabili (Sauvignon blanc e Manzoni), sia in termini di riduzione dell'instabilità proteica potenziale (31-83%, rispettivamente) che delle proteine totali (12-73%, rispettivamente). Questi risultati preliminari aprono interessanti prospettive per l'applicazione di enzimi immobilizzati su film in processi in continuo, mediante bioreattori a membrana.

Controllo selettivo di *Oenococcus oeni* in vino mediante lisozima su perle di chitosano in bioreattore a letto fluidizzato

La fermentazione malolattica (MLF), condotta nei vini ad opera di batteri lattici, consente di ottenere un prodotto finale più aromatico e microbiologicamente stabile. Sebbene la MLF conferisca al vino una minor asprezza e acidità, l'eventuale crescita incontrollata dei batteri lattici può comportare un'alterazione delle proprietà organolettiche del prodotto. Ancora oggi, l'impiego di conservanti chimici, come l'anidride solforosa (SO₂), rappresenta il metodo più diffusamente applicato nella pratica enologica per il controllo della MLF, nonostante l'aumento progressivo delle allergie manifestate nei confronti di questa sostanza.

A tal fine, è stato sviluppato un sistema in continuo per il controllo selettivo della popolazione lattica (*Oenococcus oeni*) in vino, costituito da un bioreattore enzimatico *food-grade*, a base di lisozima da albumo d'uovo (HEWL) immobilizzato covalentemente su

perle di chitosano da *A. niger*, realizzate *home-made*. L'attività idrolitica di HEWL, espressa in percentuale di cellule (*O. oeni*) rimosse, è stata ottimizzata in vino modello e poi determinata in vino reale (bianco e rosso), sottoposto a trattamento in bioreattore a letto fluidizzato (FBR, Fig. 4). Il HEWL immobilizzato su perle di chitosano essiccate ha mostrato attività paragonabile a quella dell'enzima libero, sia in vino bianco che in vino rosso [6]. Il trattamento in FBR, contenente HEWL su perle umide, è risultato il più efficiente, soprattutto in vino rosso, con un tasso di degradazione cellulare (23%) circa doppio rispetto alla forma libera (10%). L'immobilizzazione su perle umide ha, probabilmente, reso il HEWL più resistente all'effetto inibente dei tannini procianidinici. Questi risultati indicano che il trattamento in FBR è efficace nel controllo selettivo della popolazione lattica di vini bianchi e rossi. Infine, il HEWL su perle umide ha mostrato un'emivita significativamente superiore rispetto all'enzima in forma libera o legato su perle essiccate, preservando il 50% circa dell'attività iniziale dopo 21 giorni di operatività e risultando ancora attivo dopo 49 giorni se conservato a 4 °C.

BIBLIOGRAFIA

- [1] P.K. Dutta, J. Dutta, V.S. Tripathi, *J. Sci. Ind. Res.*, 2004, **63**, 20.
- [2] B. Krajewska, *Enzyme Microb. Technol.*, 2004, **35**, 126.
- [3] J. Cai, J. Yang, Y. Du *et al.*, *Carbohydr. Polym.*, 2006, **65**, 211.
- [4] F.X. Sauvage, B. Bach *et al.*, *Food Chem.*, 2010, **118**, 26.
- [5] I. Benucci, C. Lombardelli *et al.*, *Food Hydrocoll.*, 2016, **61**, 191.
- [6] E. Cappanella, I. Benucci *et al.*, *Food Chem.*, 2016, **210**, 49.

Enzymes Immobilized on Novel Food-grade Carriers: Application in Food Industry

Chitosan is a natural, non-toxic, biodegradable polymer widely applied in industry. Currently it is used as an affordable raw material to produce novel food-grade carriers, such as pearls and films, for the immobilization of enzymes, which could be conveniently applied in continuous processes for food industry.