

CHITOSANO IN ENOLOGIA: UN'ANALISI RAPIDA E INNOVATIVA PER GARANTIRE L'ORIGINE DA FUNGO.

Perini Matteo, Nardin Tiziana

Fondazione Edmund Mach, Via E. Mach n. 2, 38010 San Michele all'Adige (TN), Italia

matteo.perini@fmach.it

Introduzione

Il chitosano è un polisaccaride lineare composto da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, legate tramite legami $\beta(1-4)$. Ha un gran numero di applicazioni commerciali, ad esempio in medicina viene utilizzato per il trattamento dell'obesità (Han, Kimura, and Okuda 1999), come antibatterico o per facilitare l'assorbimento dei farmaci attraverso la pelle (Felt, Buri, and Gurny 1998). In agricoltura viene impiegato per il trattamento delle sementi (Bautista-Baños, Romanazzi, and Jiménez-Aparicio 2016) e in enologia come antiossidante, chiarificante, chelante dei metalli e per il controllo microbiologico riducendo il ricorso ai solfiti (Cheung et al. 2015). La produzione di chitosano, economicamente più vantaggiosa, avviene per deacetilazione della chitina (No and Meyers 1995) che rappresenta un elemento strutturale dell'esoscheletro dei crostacei (quali gamberetti e granchi, con una produzione mondiale stimata attorno a 1.2×10^6 tonnellate di scarto).

Tra i crostacei, i gamberetti rappresentano la prima causa di reazione allergica anche severa (quali l'anafilassi) (No and Meyers 1995; Faber et al. 2017) ed il chitosano, prodotto a partire da questa materia prima, è accusato di poter provocare anch'esso reazioni allergiche. La causa potrebbe essere riconducibile alla possibile contaminazione di proteine, quali la tropomiosina, che verrebbero rilasciate dopo l'ingestione del prodotto (Chagas, Monteiro, and Ferreira 2012). Allo stato attuale, non sono riportati in letteratura metodi chimici e/o fisici in grado di rimuovere in maniera efficace o denaturare completamente le proteine durante il trattamento della chitina garantendo l'assenza di rischi allergici. Per questo motivo negli ultimi anni è stato introdotto sul mercato un chitosano estratto da funghi appartenenti alla famiglia dei Zygomycetous (ordine Mucorales)

La disponibilità di residui della lavorazione dei crostacei è influenzata da fattori esterni quali la stagione e la dislocazione geografica dei siti di stoccaggio, il micelio fungale può essere ottenuto tramite un processo di fermentazione senza limitazioni di tipo stagionale e/o geografico. Inoltre, i funghi possono essere coltivati in laboratorio a basso costo e il chitosano può essere ottenuto tramite semplici procedure e con maggiore costanza in termini di qualità e disponibilità (White, Farina, and Fulton 1979).

In campo enologico l'OIV (Organizzazione mondiale della vite e del vino) ammette esclusivamente l'utilizzo di chitosano da fungo e prescrive tre differenti metodi per confermarne l'origine: viscosità, densità battuta e residuo di glucani.

Il chitosano da fungo deve rispettare tutti e tre i parametri prescritti, ossia avere una viscosità inferiore a 15 cP (chitosano in soluzione 1% di acido acetico 1%), una densità battuta superiore o uguale a 0.7 g/cm³ e un residuo di glucani > 2%. e talvolta, non tutti i parametri sono rispettati e il campione risulta di difficile identificazione.

L'analisi dei rapporti isotopici (²H/¹H, ¹³C/¹²C, ¹⁵N/¹⁴N, ¹⁸O/¹⁶O) viene comunemente utilizzata per distinguere l'origine sintetica e naturale dei prodotti commerciali. Diversi sono gli studi riportati in letteratura, quali ad esempio la monacolina K, chimicamente indistinguibile dalla statina lovastatina, che mostra invece una caratteristica composizione isotopica dovuta ai differenti substrati utilizzati

per la sua produzione (riso nel caso della monacolina K e canna nel caso della lovastatina; (Perini, Carbone, and Camin 2017).

In questo studio sono stati considerati 18 diversi campioni di chitosano dichiarati da esoscheletro animale o da fungo. L'origine dei vari campioni è stata confermata tramite le analisi ufficiali prescritte dall'OIV. I rapporti isotopici di idrogeno, ossigeno, carbonio, azoto e zolfo sono stati analizzati tramite uno spettrometro di massa isotopica collegato con un pirolizzatore e un analizzatore elementare.

Scopo di questo studio era quello di investigare le potenzialità dell'analisi isotopica come strumento per identificare in modo rapido l'origine del chitosano utilizzato in enologia.

Materiale e metodo

Campionamento

Diciotto campioni di chitosano (50 gr), 11 da fungo e 7 da esoscheletro animale, sono stati reperiti sul mercato direttamente dai produttori che hanno garantito la loro origine. La purezza dei campioni era sempre superiore al 95%.

Analisi ufficiali

L'origine dei 18 campioni è stata confermata tramite l'applicazione dei tre metodi ufficiali prescritti dall'OIV.

Il residuo di glucani è stato misurato tramite spettrofotometro (UV-Visible spectrophotometer, Cary 100, Varian, US). La procedura si basa su una reazione di tipo colorimetrico nella quale la risposta è dipendente dal grado di degradazione dei glucani trattati con acido solforico. La degradazione provoca un incremento della colorazione giallo bruna la cui intensità è proporzionale a quella di glucani residui. La curva di calibrazione è stata preparata partendo da 5000 mg/L di beta-glucano in soluzione acquosa (92.5:7.5, v/v) successivamente diluita 25 volte con acido acetico all' 1% (acido acetico:acqua, 1:99, v/v). Infine, sono stati preparati 7 punti di calibrazione (0-10-30-50-70-140-175 mg/L) tramite diluizione con acqua. I campioni sono stati preparati pesando 100 mg di chitosano in una vial da 50 ml e aggiungendo 25 mL di acido acetico in soluzione all'1%. I campioni sono stati mescolati per 12 h (Multi Reax, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany) e successivamente centrifugati (10 minutes at 4100 rpm; IEC CL31 Multispeed, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) per eliminare la frazione solida in sospensione. 1 ml di ogni campione e 1 ml di ogni punto di calibrazione dello standard di beta-glucano sono stati aggiunti di 5 ml di acido solforico concentrato, mescolati per 10 secondi e posta al freddo per un'ora. La soluzione ottenuta è stata analizzata allo spettrofotometro a 490 nm contro acqua. I risultati sono stati espressi in $\mu\text{gglucani/gchitosano}$.

La viscosità è stata determinata con un viscosimetro. I campioni (0.25 g) sono stati pesati in una vials da 25 mL e disciolti con acido acetico 1% e centrifugati. Il campione è stato posto nel viscosimetro tramite un adattatore per basse viscosità. I risultato sono stati espressi in cP.

La densità abbattuta è stata misurata ponendo 5 g di chitosano in un cilindro graduato agganciato ad un tester meccanico. La velocità del motore è stata settata a 250 rpm e dopo 2 minuti e 4 minuti si sono letti i volumi (V1 e V2, rispettivamente). Nel caso in cui la differenza di tali valori risultasse essere maggiore del 2% si attuava un ulteriore ciclo di 4 minuti fino al raggiungimento di un $\Delta V < 2\%$. Soddifatto questo parametro è stato possibile calcolare la densità battuta dividendo la massa (espressa in g) con il volume finale della polvere (espresso in ml).

La solubilità dei campioni è stata controllata ponendo 5g in 100 ml di acqua distillata e agitando per 2 minuti. Il campione è stato centrifugato e il supernatante rimosso. Per eliminare il liquido residuo il campione è stato posto in stufa a 40°C per una notte e in seguito pesato. La solubilità del campione non doveva essere superiore al 5%.

Analisi isotopica

L'analisi dei rapporti isotopici di H, C, N e O è stata misurata nei campioni di chitosano puro al 95% liofilizzato e macinato finemente.

L'analisi dei rapporti isotopici di δ è stata eseguita utilizzando uno spettrometro di massa isotopica (IRMS) (Isoprime, Isoprime Ltd., UK) collegato con un analizzatore elementare (VARIO CUBE, Elementar Analysensysteme GmbH, Germania). In accordo con le linee guida IUPAC i valori isotopici sono stati riportati in delta e in riferimento agli standard internazionali V-PDB (δ) per il carbonio e AIR per l'azoto. I dati sono stati espressi in accordo con la seguente formula

$$\delta_i = \frac{i_{RSA} - i_{RREF}}{i_{RREF}}$$

Dove i è il numero di massa dell'isotopo più pesante, RSA è il rapporto isotopico del campione e $RREF$ è il rapporto isotopico dello standard internazionale.

Il delta è stato moltiplicato per mille e espresso in unità "per mille" (‰).

I campioni sono stati analizzati in doppio e corretti tramite l'utilizzo di uno standard interno (proteina) calibrato contro gli standard internazionali NBS-22, IAEA CH6 e IAEA NO3.

L'incertezza di misura (2s) è <0.3‰ per il carbonio e l'azoto.

Risultati e discussione

Come mostrato in tabella 1 tutti i campioni considerati e dichiarati da fungo (da A a M) sono stati correttamente assegnati sulla base dei risultati di densità battuta (> 0,7 g/mL) e viscosità in soluzione all'1% (< 15 cP).

Sulla base del residuo di glucani invece, i campioni L e M non vengono correttamente classificati come da fungo. Questi campioni presentano infatti una bassa concentrazione di glucani residui, inferiore al 2%. La bassa viscosità, 1 cP, suggerisce una concentrazione elevata di chitina che probabilmente non è stata trasformata in chitosano durante la deacetilazione che risulta pertanto parziale. Come riportato da Duarte et al. (Duarte et al. 2002) la ricerca di un metodo rapido e accurato per determinare il grado di deacetilazione (%DD) rappresenta un problema irrisolto, come dimostrano le molte diverse tecniche proposte spesso con risultati discordanti. L'uso di una tecnica non appropriata potrebbe spiegare la presenza in commercio di prodotti con alte concentrazioni di chitina.

L'uso dei metodi prescritti da OIV, risulta particolarmente gravosa a causa dei tempi lunghi per eseguire i processi (più di 3 ore a campione) e questo ci ha spinto ad esplorare le potenzialità di una tecnica innovativa e rapida quale quella isotopica.

Come mostrato in tabella 1, la via biosintetica adottata per produrre la chitina, da esoscheletro animale o da fungo, influenza la sua composizione isotopica con differenze statisticamente significative per tutti i rapporti isotopici indagati.

Nessuno dei campioni provenienti da esoscheletro animale rispetta i limiti imposti dall'OIV per il chitosano da fungo. Questa tipologia di chitosano presenta in media valori di ^{13}C intorno a -20‰ e

di ^{15}N attorno a -2‰ che possono essere giustificati, in assenza di significativi frazionamenti di tipo isotopico, dalla diretta correlazione tra il chitosano, il suo precursore chitina e il corpo dall'animale da cui proviene l'esoscheletro.

Come dimostrato da (Bosley and Wainright 1999) il lavaggio acido adottato per produrre la chitina a partire da esoscheletro non influenza i rapporti isotopici. Inoltre, la successiva deacetilazione della chitina per ottenere il chitosano non provoca alcun significativo frazionamento di tipo isotopico (Schimmelmann et al. 1986).

Per Perga et al. (Perga 2010) l'esoscheletro di crostacei presenta un valore di $\delta^{13}\text{C}$ simile a quello di tutto il corpo animale. Schimmelmann et al. (Schimmelmann 2011) conferma questo andamento con differenze tra composizione del chitosano e del corpo animale attorno a -9‰ .

Come riportato da Button et al. (Button 1991) mentre le macroalghe marine presentano un valore di $\delta^{13}\text{C}$ attorno a -15‰ , i vertebrati marini come i gamberetti, a causa del progressivo arricchimento isotopico lungo la catena trofica, presentano un valore di $\delta^{13}\text{C}$ attorno a -17 .

Differenti autori riportano range di variabilità del carbonio per i gamberetti tra -23.2‰ e -20.7‰ e per l'azoto tra $+3.5\text{‰}$ e tra $+9.6\text{‰}$ (Rau, Heyraud, and Cherry 1989; Schimmelmann 2011).

I campioni dichiarati, e confermati di origine fungina sulla base dei metodi OIV, presentano un valore elevato di $\delta^{13}\text{C}$ (in media $-13,7\text{‰}$) e basso di $\delta^{15}\text{N}$ ($-4,2\text{‰}$). La massa fungina viene normalmente prodotta per fermentazione sommersa (SmF) nella quale il medio viene inoculato con una sospensione di spore e incubato in un incubatore rotante per diversi giorni (Nwe et al. 2002).

L'elevato valore di $\delta^{13}\text{C}$ dei campioni di chitosano può essere spiegato sulla base degli ingredienti utilizzati come nutrienti basso costo per confezionare il medio. Questo normalmente contiene estratto di lievito, peptone, D-glucosio e zucchero di canna come fonti di carbonio. La canna da zucchero (*Saccharum officinarum* L.) appartiene alla famiglia delle piante a ciclo fotosintetico C4 che presenta un tipico valore di ^{13}C attorno a -11‰ (Bauer-Christoph et al. 1997). Questo può giustificare i valori elevati di ^{13}C registrati nei campioni da fungo.

Il basso valore di ^{15}N risulta probabilmente correlato con l'aggiunta di solfato di ammonio al brodo di lieviti come fonte di azoto ($\delta^{15}\text{N} = -3,1$) (Kurtzman et al. 2011).

Conclusioni

Questo lavoro propone un metodo innovativo, robusto ed efficace basato sull'analisi dei rapporti di isotopi stabili di carbonio e azoto che può essere utile per identificare l'origine del chitosano. L'analisi rapida e automatizzata del $\delta^{13}\text{C}$ appare come la via migliore per discriminare il chitosano animale da quello da fungo. La diffusione di laboratori attrezzati per l'analisi di tipo isotopico rende questo approccio di tipo routinario con risparmio di tempi e costi,

Bibliografia

- Bauer-Christoph, C., Helmut Wachter, Norbert Christoph, Andreas Rßmann, and Ludwig Adam. 1997. "Assignment of Raw Material and Authentication of Spirits by Gas Chromatography, Hydrogen- and Carbon-Isotope Ratio Measurements." *Zeitschrift Für Lebensmitteluntersuchung Und -Forschung A*. <https://doi.org/10.1007/s002170050111>.
- Bautista-Baños, Silvia, Gianfranco Romanazzi, and Antonio Jiménez-Aparicio. 2016. "Preface." *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802735-6.00018-5>.
- Bosley, Keith L., and Sam C. Wainright. 1999. "Effects of Preservatives and Acidification on the Stable Isotope Ratios ($^{15}\text{N}:$ ^{14}N , $^{13}\text{C}:$ ^{12}C) of Two Species of Marine Animals." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. <https://doi.org/10.1139/f99-153>.
- Boutton, Thomas W. 1991. "Stable Carbon Isotope Ratios of Natural Materials: I. Sample Preparation and Mass Spectrometric Analysis." *Carbon Isotope Techniques*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-179730-0.50015-1>.
- Chagas, Ricardo, Sara Monteiro, and Ricardo Boavida Ferreira. 2012. "Assessment of Potential Effects of Common Fining Agents Used for White Wine Protein Stabilization." *American Journal of Enology and Viticulture*. <https://doi.org/10.5344/ajev.2012.12016>.
- Cheung, Randy Chi Fai, Tzi Bun Ng, Jack Ho Wong, and Wai Yee Chan. 2015. "Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications." *Marine Drugs* 13 (8): 5156–86.
- Duarte, M. L., M. C. Ferreira, M. R. Marvão, and João Rocha. 2002. "An Optimised Method to Determine the Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan by FTIR Spectroscopy." *International Journal of Biological Macromolecules* 31 (1-3): 1–8.
- Faber, M. A., M. Pascal, O. El Kharbouchi, V. Sabato, M. M. Hagendorens, I. I. Decuyper, C. H. Bridts, and D. G. Ebo. 2017. "Shellfish Allergens: Tropomyosin and beyond." *Allergy*. <https://doi.org/10.1111/all.13115>.
- Felt, Olivia, Pierre Buri, and Robert Gurny. 1998. "Chitosan: A Unique Polysaccharide for Drug Delivery." *Drug Development and Industrial Pharmacy*. <https://doi.org/10.3109/03639049809089942>.
- Han, L. K., Y. Kimura, and H. Okuda. 1999. "Reduction in Fat Storage during Chitin-Chitosan Treatment in Mice Fed a High-Fat Diet." *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 23 (2): 174–79.
- Kurtzman, Cletus P., Jack W. Fell, Teun Boekhout, and Vincent Robert. 2011. "Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts." *The Yeasts*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52149-1.00007-0>.
- No, Hong K., and Samuel P. Meyers. 1995. "Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan—A Review." *Journal of Aquatic Food Product Technology*. https://doi.org/10.1300/j030v04n02_03.
- Nwe, Nitar, Suwalee Chandkrachang, Willem F. Stevens, Theingi Maw, Teck Koon Tan, Eugene Khor, and Sek Man Wong. 2002. "Production of Fungal Chitosan by Solid State and Submerged Fermentation." *Carbohydrate Polymers*. [https://doi.org/10.1016/s0144-8617\(01\)00355-1](https://doi.org/10.1016/s0144-8617(01)00355-1).
- Perga, Marie-Elodie. 2010. "Potential of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of Cladoceran Subfossil Exoskeletons for Paleo-Ecological Studies." *Journal of Paleolimnology*. <https://doi.org/10.1007/s10933-009-9340-9>.
- Perini, Matteo, Gianfranco Carbone, and Federica Camin. 2017. "Stable Isotope Ratio Analysis for Authentication of Red Yeast Rice." *Talanta*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.057>.
- Rau, G. H., M. Heyraud, and R. D. Cherry. 1989. " $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in Mesopelagic Shrimp from the Northeast Atlantic Ocean: Evidence for Differences in Diet." *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(89\)90080-0](https://doi.org/10.1016/0198-0149(89)90080-0).
- Schimmelmann, Arndt. 2011. "Carbon, Nitrogen and Oxygen Stable Isotope Ratios in Chitin." *Topics in Geobiology*. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9684-5_4.

Schimmelmann, Arndt, Michael J. Deniro, Mathieu Poulicek, Marie-Francoise Voss-Foucart, Gerhard Goffinet, and Ch Jeuniaux. 1986. "Stable Isotopic Composition of Chitin from Arthropods Recovered in Archaeological Contexts as Palaeoenvironmental Indicators." *Journal of Archaeological Science*. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(86\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0305-4403(86)90040-3).

White, S. A., P. R. Farina, and I. Fulton. 1979. "Production and Isolation of Chitosan from *Mucor Rouxii*." *Applied and Environmental Microbiology* 38 (2): 323–28.