

## IMMOBILIZZAZIONE DI BROMELINA DA GAMBO D'ANANAS SU SFERE DI CHITOSANO DA FONTE DIVERSA

Claudio LOMBARDELLI, Ilaria BENUCCI, Katia LIBURDI, Marco ESTI

Dipartimento per la Innovazione nei sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali (DIBAF), Università degli Studi della Tuscia, Via S. Camillo De Lellis snc, 01100 Viterbo, Italia

E-mail: claudiolomb@hotmail.it

Lavoro presentato all'8<sup>a</sup> edizione di Enoforum, Arezzo, 7-9 Maggio 2013

### Introduzione

La bromelina da gambo d'ananas (E.C. 3.4.22.32) è una proteasi cisteinica la cui applicazione, sia in forma libera che immobilizzata, è stata recentemente testata per la stabilizzazione proteica di vini bianchi (Esti *et al.*, 2011; Benucci *et al.*, 2011). La proteasi, legata covalentemente a supporti di natura inorganica (vetro e resine epossidiche) ed organica (sfere di chitosano commerciali), ha dimostrato un'apprezzabile attività, in vino modello, su substrato sintetico (Benucci *et al.*, 2012).

Il chitosano, ottenuto per deacetilazione alcalina dalla chitina contenuta nell'esoscheletro di crostacei, insetti ed in alcuni tipi di funghi, è un *carrier* idoneo per l'immobilizzazione di enzimi alimentari, poiché biocompatibile, biodegradabile e disponibile in diverse forme (polvere, gel, fibre e membrane). L'impiego industriale di chitosano da *shellfish* presenta numerose problematiche quali, la difficile standardizzazione della qualità del prodotto finale e lo smaltimento dei sottoprodotti del processo di deacetilazione.

Una fonte alternativa di questo polimero organico è rappresentata dal micelio di diverse specie fungine, tra cui *Aspergillus niger* (Pochanavanich e Suntornsuk, 2002), il cui contenuto di chitosano varia dal 20 al 22% del micelio secco (Cai *et al.*, 2006). Nell'immobilizzazione covalente di enzimi è spesso impiegato un *cross-linker*, come la glutaraldeide, in grado di legarsi sia a gruppi funzionali dell'enzima che del carrier. Il legame chimico tra biocatalizzatore e supporto può anche avvenire direttamente tra residui amminoacidici e gruppi funzionali del *carrier* (amminici, carbossilici, sulfidrilici, tiolici, fenolici e idrossilici) sufficientemente reattivi (Verga e Pilone 2002).

Obiettivo del presente lavoro è stato sviluppare un biocatalizzatore a base di bromelina da gambo d'ananas da applicare nella stabilizzazione proteica di vini bianchi. La proteasi è stata immobilizzata, mediante legame diretto e *cross-linking* con glutaraldeide, su 4 tipologie di sfere di chitosano prodotte in laboratorio: 3 a differente peso molecolare (alto, medio, basso) da *shellfish* e 1 da *Aspergillus niger*.

### Materiali e Metodi

#### Reagenti

Il preparato enzimatico a base di bromelina da gambo d'ananas (EC 3.4.22.32) è stato acquistato da Sigma-Aldrich (Milano, Italia) ed il substrato sintetico Bz-phe-val-arg-pNA, impiegato per testare l'attività proteasica, da Bachem (Germania); le differenti polveri di chitosano, utilizzate per la realizzazione dei *carrier* sono riportate in tabella 1.

Tabella 1: Polveri di chitosano impiegate per la produzione di 4 differenti carrier

Polvere di chitosano		Azienda produttrice	Sigla <i>carrier</i>
Origine	Peso molecolare		
Shellfish	alto	Sigma-Aldrich (Milano, Italia)	C <sub>sh</sub> APM
Shellfish	medio	Sigma-Aldrich (Milano, Italia)	C <sub>sh</sub> MPM
Shellfish	basso	Sigma-Aldrich (Milano, Italia)	C <sub>sh</sub> BPM
<i>Aspergillus niger</i>	-	Kitozyme (Herstal, Belgio)	C <sub>An</sub>

Preparazione e caratterizzazione dei *carrier* a base di chitosano

Per la produzione delle sfere di chitosano è stata adottata la stessa procedura con i differenti preparati (3 da *shellfish* e 1 da *Aspergillus niger*): la polvere di chitosano è stata disciolta in soluzione acetica al 5% e mantenuta in agitazione per 20 minuti circa, in presenza di silicato di magnesio. Mediante pompa peristaltica la sospensione è stata gocciolata in una soluzione di NaOH (2M) ed etanolo al 26% (v/v), sotto costante agitazione (fig. 1).

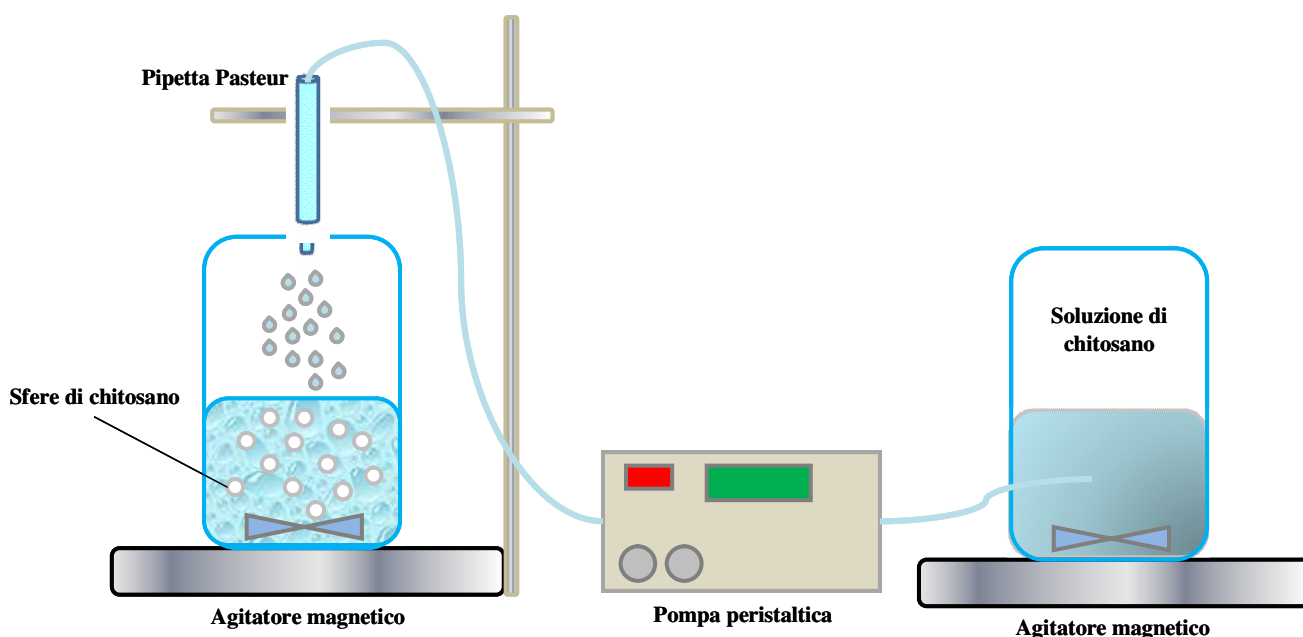


Figura 1: Schema di produzione delle sfere a base di chitosano

Le sfere di chitosano, così ottenute (tab.1), sono state allontanate dal liquido, lavate con acqua distillata e conservate in tampone fosfato (pH 7) a 4°C, in presenza di sodio azide.

I *carrier* sono stati caratterizzati determinando contenuto di umidità e calibro; successivamente è stata condotta l'osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM) presso il Centro interdipartimentale di microscopia elettronica dell'Università della Tuscia, (VT), al fine di descriverne la morfologia dettagliata, la struttura superficiale ed interna e l'eventuale presenza di pori.

Un'aliquota di sfere di chitosano, a peso umido ( $P_u$ ) noto, è stata lasciata in stufa per 24 ore alla temperatura di 90 °C, al termine delle quali, è stato definito il peso secco ( $P_s$ ). L'umidità (%) è stata calcolata come segue:

$$\frac{P_u - P_s}{P_u} \times 100$$

Il diametro delle sfere è stato misurato, dapprima, mediante calibro manuale e poi nel corso dell'osservazione al SEM.

#### Procedure di immobilizzazione e capacità di carico dei *carrier*

La proteasi, disciolta in tampone tartarico pH 3,2, è stata immobilizzata sulle 4 tipologie di sfere di chitosano mediante 2 differenti tecniche: legame diretto e *cross-linking* con glutaraldeide. Nel primo caso, a 1 g di sfere sono stati aggiunti 10 ml di soluzione immobilizzante, lasciando in agitazione a 20 °C overnight. Per la seconda procedura, la funzionalizzazione è stata condotta aggiungendo a 1g di sfere di chitosano 10 ml di glutaraldeide (GDA) al 3% (v/v), mantenendo in agitazione per 1h, ai supporti lavati con acqua bidistillata, sono stati aggiunti 10 ml di soluzione immobilizzante, lasciando incubare per 2h a 20 °C.

Al fine di individuare la massima capacità di carico dei *carrier*, per entrambe le procedure, sono state impiegate soluzioni immobilizzanti a diverso contenuto di proteina (0,45; 0,9; 1,35; 1,8; 2,25; 4,5; 9 e 18 mg ml<sup>-1</sup>).

Al termine dell'incubazione, i supporti sono stati sottoposti a lavaggi utilizzando NaCl (2 M) e tampone tartarico, così da rimuovere tutte le proteine legate non covalentemente alle sfere di chitosano. La resa di immobilizzazione (%) è stata calcolata indirettamente, per differenza fra le proteine contenute nella soluzione immobilizzante e quelle riscontrate nel surnatante e nei liquidi di lavaggio raccolti al termine dell'incubazione, quantificate mediante saggio colorimetrico Bradford (Bradford, 1976).

#### Attività specifica

La bromelina è in grado di idrolizzare il substrato sintetico Bz-Phe-Val-Arg-pNA, scindendo il legame estereo tra l'amminoacido in posizione N-terminale e la p-nitroanilina (pNA), che viene liberata in seguito all'azione della proteasi e rilevata spettrofotometricamente ( $\lambda$  410 nm,  $\epsilon_{410nm} = 8,48 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) mediante letture in continuo (Hale *et al.*, 2005). I saggi di attività sono stati condotti in vino modello (tampone tartarico pH 3,2 contenente etanolo al 12% v/v), ponendo i biocatalizzatori a contatto con il substrato sintetico, lasciando avvenire la reazione per 10 minuti a 20 °C in agitazione, e monitorando la variazione di assorbanza (ABS) nel tempo (t). L'attività specifica dei biocatalizzatori, espressa in milliUI per mg di proteina immobilizzata (mUI mg<sup>-1</sup> P<sub>I</sub>), è stata calcolata considerando la porzione lineare del grafico ABS vs t.

## **Risultati e discussione**

Le foto al SEM mostrano che la superficie dei supporti appariva liscia ed omogenea, priva di pori dalle dimensioni importanti. Le sfere di chitosano da *Aspergillus niger* (Fig. 2 a) avevano una forma più precisa e rotondeggiante rispetto a quelle da *shellfish* (Fig. 2 b). Non sono state riscontrate, inoltre, differenze significative fra i *carrier* tal quali e quelli funzionalizzati.

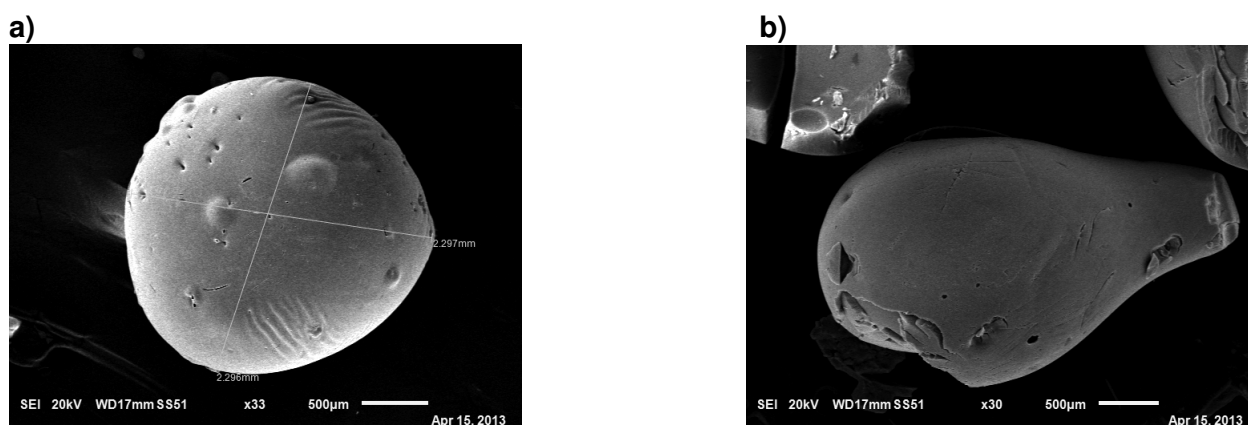


Figura 2: Immagini al SEM di carrier a base di chitosano: (a) da *Aspergillus niger* ( $C_{An}$ ) e (b) da shellfish ( $C_{Sh}$ )

Come indicato in tabella 2, le 4 tipologie di sfere umide presentavano un diametro analogo (3-3,5 mm) ma differente umidità, con un contenuto d'acqua maggiore per le  $C_{Sh}$  (94%) rispetto alle  $C_{An}$  (86%).

Tabella 2: Diametro e umidità relativa delle 4 tipologie di sfere a base di chitosano

Carrier	Diametro (mm)	Umidità (%)
$C_{Sh}APM$	$3,5 \pm 0,2$	$93 \pm 1$
$C_{Sh}MPM$	$3,0 \pm 0,3$	$94 \pm 1$
$C_{Sh}BPM$	$3,5 \pm 0,2$	$94 \pm 1$
$C_{An}$	$3,0 \pm 0,2$	$86 \pm 1$

La capacità di carico dei supporti, è stata definita per entrambe le procedure, impiegando soluzioni enzimatiche a diversa concentrazione ( $0,45-18 \text{ mg ml}^{-1}$ ). I risultati ottenuti hanno mostrato che, aumentando il contenuto proteico nella soluzione immobilizzante, la quantità di proteina legata aumentava linearmente, per tutte e 4 le tipologie di *carrier*, fino a  $2,25 \text{ mg}$  di proteina per ml. In corrispondenza di tale concentrazione, è stata osservata la più elevata resa di immobilizzazione, che si è mantenuta pressoché invariata aumentando ulteriormente la concentrazione proteica iniziale (Fig. 3).

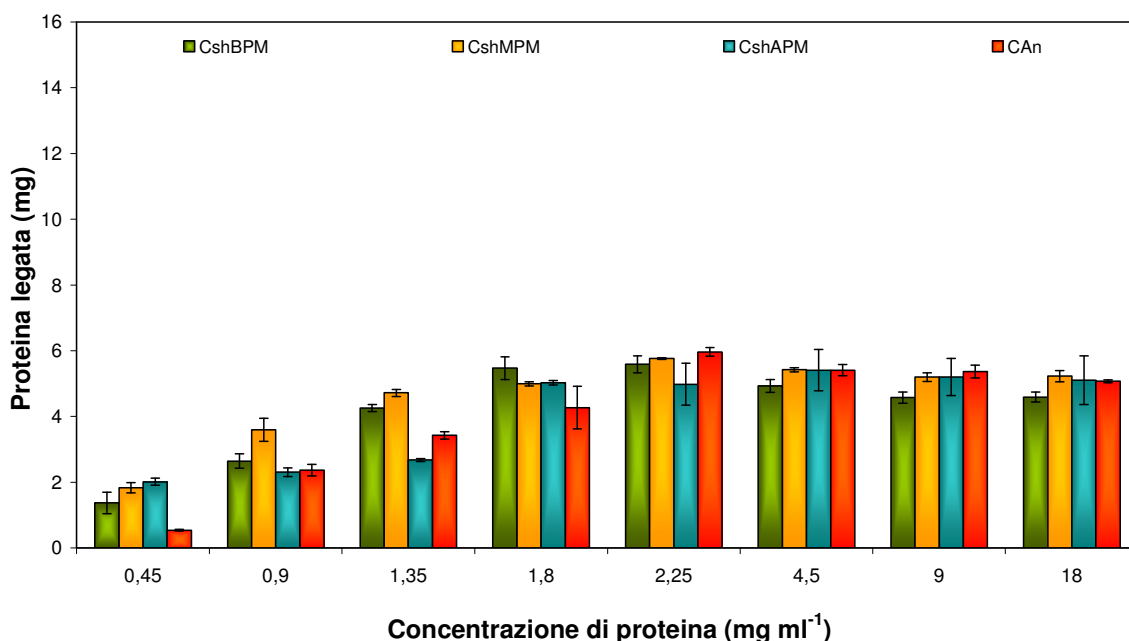


Figura 3: Capacità di carico dei diversi supporti al variare della concentrazione di proteina nella soluzione di partenza, immobilizzando mediante legame diretto

Un analogo risultato è stato osservato immobilizzando la bromelina su sfere di chitosano funzionalizzate con glutaraldeide, con un andamento che riproduce esattamente quanto sopra descritto: la quantità di proteina legata aumentava linearmente, per tutte e 4 le tipologie di carrier, fino a 2,25 mg di proteina per ml, per poi mantenersi invariata aumentando ulteriormente la concentrazione proteica iniziale (Fig. 4). L'immobilizzazione mediante *cross-linker*, tuttavia, ha permesso di legare una quantità di proteina maggiore rispetto al legame diretto, come si evince dalla figura 4 e dalla tabella 3, probabilmente per l'elevato numero di legami covalenti che si formano tra la glutaraldeide ed i residui di lisina dell'enzima (Migneault *et al.*, 2004).

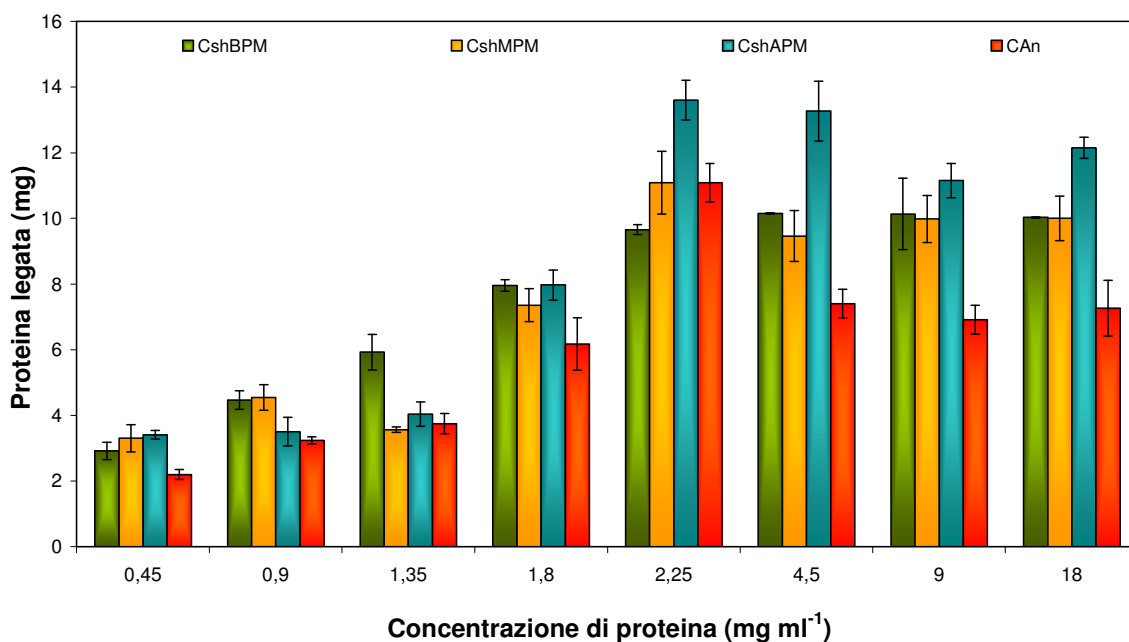


Figura 4: Capacità di carico dei diversi supporti al variare della concentrazione di proteina nella soluzione di partenza, immobilizzando mediante cross-linking con GDA

Per tutti i *carrier*, indipendentemente dalla procedura adottata (legame diretto o *cross-linking* con GDA), la più elevata resa di immobilizzazione (%) è stata ottenuta impiegando una soluzione immobilizzante contenente 1,8-2,2 mg ml<sup>-1</sup> di proteina (Tab. 3). Aumentando ulteriormente la concentrazione proteica iniziale, la resa diminuiva in modo significativo, forse per l'ingombro sterico e/o per i fenomeni di autoidrolisi a cui la bromelina, essendo una proteasi, era soggetta durante il periodo di incubazione necessario per la formazione del legame covalente fra enzima e supporto.

Non è stato possibile determinare l'attività specifica della bromelina immobilizzata, mediante legame diretto, sul chitosano da *shellfish*, poiché tali supporti, alle condizioni operative applicate, si solubilizzavano nel vino modello. Non sono stati riscontrati problemi simili per le sfere derivanti da chitosano da *Aspergillus niger*, né tantomeno nel caso delle sfere precedentemente funzionalizzate con GDA. La bromelina legata su C<sub>sh</sub>, mediante cross-linker, ha mostrato un'attività analoga, indipendente dal peso molecolare del chitosano da cui sono stati ottenuti i supporti (Tab. 3). Una differenza significativa è stata, invece, riscontrata immobilizzando su C<sub>An</sub>, con un'attività specifica della proteasi nettamente superiore nel caso del legame diretto rispetto al *cross-linker* con GDA. Tale risultato può essere giustificato dalla distorsione strutturale a cui l'enzima andrebbe incontro in seguito alla formazione del legame covalente con il *cross-linker* (Migneault *et al.*, 2004).

Tabella 3: Resa di immobilizzazione (%) e attività specifica (mUI mg<sup>-1</sup> pI) della bromelina legata covalentemente a 4 differenti tipologie di carrier a base di chiosano

	Tipo di legame	Concentrazione di proteina (mg ml <sup>-1</sup> )	Resa di immobilizzazione (%)	Attività specifica (mUI mg <sup>-1</sup> pI)
<b>C<sub>sh</sub>BPM</b>	Diretto	1,8	30 ± 2	-
		2,2	25 ± 1	-
		4,5	11 ± 1	-
	Cross-linking GDA	1,8	43 ± 1	0,86 ± 0,07
		2,2	44 ± 1	0,93 ± 0,09
		4,5	23 ± 1	1,87 ± 0,05
<b>C<sub>sh</sub>MPM</b>	Diretto	1,8	28 ± 1	-
		2,2	26 ± 1	-
		4,5	12 ± 1	-
	Cross-linking GDA	1,8	41 ± 3	0,75 ± 0,06
		2,2	49 ± 4	0,79 ± 0,01
		4,5	21 ± 2	1,91 ± 0,01
<b>C<sub>sh</sub>APM</b>	Diretto	1,8	28 ± 1	-
		2,2	24 ± 2	-
		4,5	12 ± 1	-
	Cross-linking GDA	1,8	44 ± 3	0,61 ± 0,07
		2,2	60 ± 3	0,45 ± 0,04
		4,5	29 ± 2	1,11 ± 0,24
<b>C<sub>An</sub></b>	Diretto	1,8	24 ± 4	14,09 ± 0,15
		2,2	26 ± 1	9,86 ± 1,48
		4,5	12 ± 1	8,39 ± 0,89
	Cross-linking GDA	1,8	34 ± 4	0,86 ± 0,08
		2,2	49 ± 3	0,47 ± 0,05
		4,5	16 ± 1	1,14 ± 0,03

## Conclusioni

La bromelina da gambo d'ananas è stata immobilizzata covalentemente, mediante legame diretto e *cross-linking* con glutaraldeide, su 4 tipologie di sfere di chitosano, prodotte in laboratorio: 3 a differente peso molecolare (alto, medio, basso) da *shellfish* e 1 da *Aspergillus niger*.

La massima capacità di carico è stata osservata, per tutti i *carrier*, in presenza di *cross-linker* e, indipendentemente dal protocollo di immobilizzazione, incubando con soluzione enzimatica 2,2 mg ml<sup>-1</sup> di proteina. La bromelina legata direttamente su sfere da *Aspergillus niger* è apparso il biocatalizzatore *food-safe* più interessante, dimostrando una spiccata resistenza alla solubilizzazione nell'ambiente acido di reazione ed una discreta attività specifica.

## Bibliografia

- Benucci I, Esti M, Liburdi K, Garzillo. 2012. Pineapple stem bromelain immobilized on different supports: catalytic properties in model wine. *Biotechnology progress*, 28 (6), 1472–1477.
- Benucci I, Liburdi K, Garzillo AMV, Esti M. 2011. Bromelain from pineapple stem in alcoholic-acidic buffers for wine application. *Food Chemistry*, 124, 1349–1353.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cai J, Yang J, Du Y, Fan L, Qiu Y, Li J, Kennedy JF. 2006. Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant. *Carbohydrate Polymers*, 64, 151–157.
- Esti M, Benucci I, Liburdi K, Garzillo AMV. 2011. Effect of wine inhibitors on free pineapple stem bromelain activity in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3391–3397.
- Hale LP, Greer PK, Trinh CT, James CL. 2005. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *International Immunopharmacology*, 5, 783-793.
- Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37, 790-802
- Pochanavanich P, Suntornsuk W. 2002. Fungal chitosan production and its characterization. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 17–21.
- Verga R, Pilone MS. 2002. *Biochimica industriale. Enzimi e loro applicazioni nella bioindustria*.

## Riassunto

Il chitosano è un *carrier* idoneo per l'immobilizzazione di enzimi alimentari, poiché biocompatibile, biodegradabile e disponibile in diverse forme (polvere, gel, fibre e membrane). Il presente lavoro è stato finalizzato allo sviluppo di un biocatalizzatore a base di bromelina da gambo d'ananas (E.C. 3.4.22.32) per la stabilizzazione proteica di vini bianchi. L'enzima è stato immobilizzato su sfere (Ø 2 mm), prodotte in laboratorio, di 4 tipologie di chitosano: 3 a differente peso molecolare (alto, medio, basso) da *shellfish* e 1 da *Aspergillus niger*. Al fine di ottimizzare le condizioni di preparazione del biocatalizzatore sono state testate differenti concentrazioni del preparato enzimatico e 2 procedure di immobilizzazione: legame diretto e *cross-linking* con glutaraldeide. L'attività proteasica della bromelina libera ed immobilizzata è stata valutata su substrato sintetico (Bz-Phe-Val-Arg-pNA) in vino modello (tampone tartarico pH 3.2, etanolo 12% v/v). I risultati ottenuti hanno evidenziando che la massima capacità di carico è stata raggiunta, per tutti i *carrier*, in presenza di *cross-linker* e, indipendentemente dal protocollo di immobilizzazione, incubando con soluzione enzimatica 2,2 mg ml<sup>-1</sup> di proteina. La bromelina legata direttamente su *carrier* da *Aspergillus niger* è apparso il biocatalizzatore *food-safe* più interessante, dimostrando spiccata resistenza alla solubilizzazione nell'ambiente acido di reazione e discreta attività specifica (0,014 I.U. mg<sup>-1</sup>).