

IMPIEGO DI LISOZIMA IMMOBILIZZATO IN BIOREATTORE A LETTO FLUIDIZZATO

Katia LIBURDI, Ilaria BENUCCI, Matteo ZAPPINO, Marco ESTI

Dept. for Innovation in Biological, Agro-food and Forest systems (DIBAF), Tuscia University, via S. Camillo de Lellis, 01100 Viterbo, Italy E-mail: k.liburdi@unitus.it

Lavoro presentato all'8^a edizione di Enoforum, Arezzo, 7-9 Maggio 2013

INTRODUZIONE

Il lisozima, enzima muramidasi estratto da bianco d'uovo (E.C. 3.2.1.17), è un agente antimicrobico che trova ampia applicazione nel settore enologico (Gerbaux et al., 1997). La selettività di questo composto, a differenza della SO₂, è derivata dalla sua azione specifica sulla parete cellulare dei batteri gram-positivi (Fig. 1), quali appunto i batteri lattici.

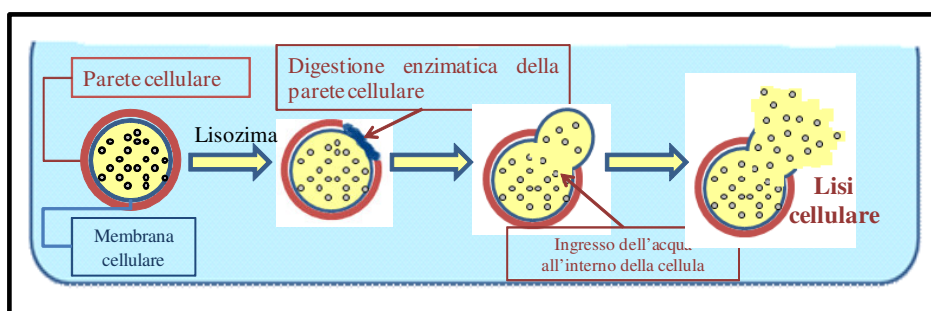


Figura 1: Effetto dell'azione litica del lisozima nei confronti di cellule batteriche Gram-positive. La rottura della parete è causata dall'idrolisi dei legami β -1,4 glicosidici del peptitoglicano (costituente principale della parete), questo meccanismo produce dei pori sulla superficie cellulare, che in condizioni ipotoniche, consentono il flusso di liquido all'interno della cellula provocandone un rigonfiamento interiore che porta alla lisi cellulare.

Il controllo dei batteri lattici indigeni è importante in diverse fasi della vinificazione, in particolare per i vini ad elevato pH, sui quali l'azione antibatterica della SO₂ è limitata. Il lisozima aiuta nella prevenzione di spunti lattici, controllo o blocco della fermentazione malolattica sui vini ove non è desiderata, riduzione della popolazione di batteri lattici e della produzione di ammine biogene durante l'affinamento dei vini, inoltre consente di operare con bassi dosaggi di SO₂.

Per disciplinare l'uso ormai consolidato del lisozima nel settore enologico, nel 1999 l'Unione Europea ne ha introdotto l'impiego con il Reg. 1493/1999/CE. Tuttavia nell'ultimo decennio il lisozima è stato oggetto di discussione nell'ambito della normativa relativa all'etichettatura degli allergeni alimentari (Fig. 2). L'insorgenza di fenomeni allergici di origine alimentare, ha infatti costretto il legislatore a rendere sempre più trasparente e leggibile l'etichetta dell'alimento. Nell'ottobre del 2011, l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ha pubblicato il proprio parere riguardo agli effetti allergenici del lisozima impiegato come coadiuvante tecnologico nel processo di vinificazione. Studi scientifici hanno confermato che i vini trattati con il lisozima, possono scatenare reazioni allergiche indesiderabili in alcuni individui sensibili.

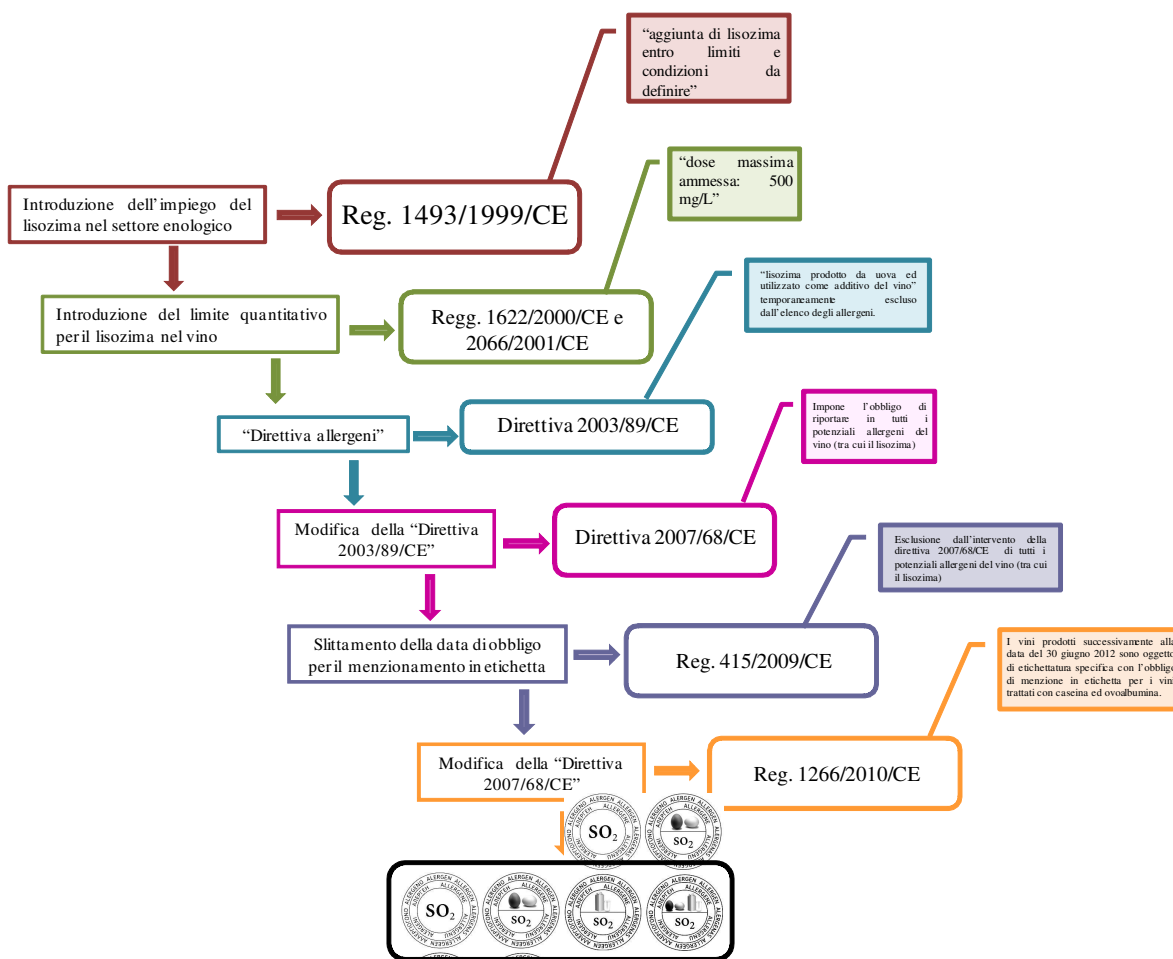


Figura 2: Diagramma dei procedimenti legislativi europei che, nell'ultimo decennio, hanno regolato l'applicazione al vino del lisozima estratto da bianco d'uovo.

E' stata consentita, quindi, la commercializzazione, senza menzione specifica in etichetta, fino all'esaurimento delle scorte dei vini messi sul mercato o etichettati prima del 30 giugno 2012. Oltre tale data, i vini contenenti lisozima dovranno essere oggetto di un'etichettatura specifica, ai sensi del Regolamento 1266/2010 della Commissione del 22 dicembre 2010, che modifica la Direttiva 2007/68/CE per quanto concerne gli obblighi vigenti in materia di etichettatura dei vini.

L'immobilizzazione covalente della proteina muramidasi su supporti *food grade* consentirebbe di superare i vincoli legislativi garantendo il recupero dell'enzima dal mezzo di reazione, il riutilizzo della sua attività residua, evitando, allo stesso tempo la contaminazione dell'alimento. Tuttavia è bene considerare che in presenza di un substrato insolubile e voluminoso come la cellula batterica, è nota la diminuzione dell'efficienza litica dell'enzima immobilizzato (Wu & Daschel, 2006). Questo tipo di problematica potrebbe essere risolta attraverso la messa a punto di meccanismi di immobilizzazione con distanziatori molecolari in grado di aumentare l'azione antimicrobica e l'emivita del lisozima. L'applicazione della proteina muramidasi immobilizzata in un Bioreattore a Letto Fluidizzato (BLF), potrebbe favorire un ulteriore abbattimento del *target* batterico del vino.

Scopo di questo lavoro è stato lo sviluppo di un metodo di trattamento del vino con lisozima immobilizzato su chitosano mediante due diversi *cross-linker* a corta e lunga catena carboniosa. L'efficienza catalitica della proteina muramidasi, libera ed immobilizzata, è stata misurata impiegando due tipologie di bioreattori: *batch stirred* e a letto fluidizzato.

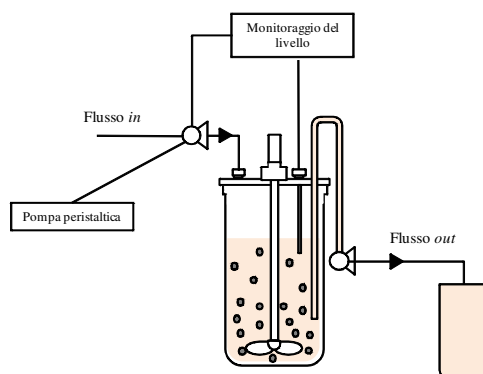


Figura 4: Diagramma schematico del bioreattore batch stirred operante in continuo.

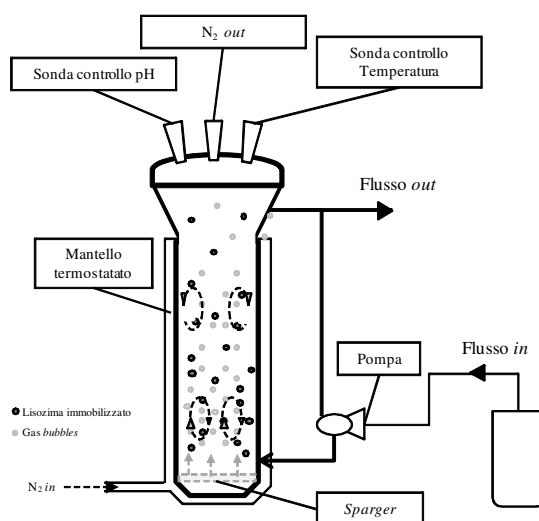


Figura 5: Diagramma schematico del bioreattore a letto fluidizzato (BLF) operante in continuo.

In tabella 1 sono riportate le dimensioni ed i parametri di processo dei due sistemi di reazione (*batch* e BLF).

L'attività della proteina muramidasi, in forma libera ed immobilizzata, è stata determinata misurando il decremento della densità ottica della sospensione cellulare di *O. oeni* a 600 nm (OD_{600} ; Deckers et al., 2008). I risultati ottenuti sono stati espressi come tasso di mortalità cellulare di *O. oeni* (T , $CFU\ ml^{-1}\ min^{-1}$).

Tabella 1: Dimensioni e parametri di processo dei due ambienti di reazione (BLF e batch) utilizzati per la lisi di *O. oeni*, in vino modello, impiegando lisozima in forma libera ed immobilizzata.

	Bioreattore a letto fluidizzato (BLF)	Bioreattore batch stirred (Batch)
DIMENSIONI		
Altezza (h, cm)	30	9,5
Diametro (\varnothing , cm)	3	7
Volume (v , cm ³)	220	250
PARAMETRI di PROCESSO		
Temperatura (T, °C)	20	
pH	3,2	3,2
Flusso volumetrico (ϕ , ml*min ⁻¹)	0,6	-
Volume trattato (V, ml)	500	250

Risultati e Discussione

I risultati di questa ricerca, espressi in termini di tasso di mortalità cellulare di *O. oeni* (T), hanno messo in evidenza che il lisozima libero idrolizza la parete cellulare di *O. oeni* in maniera efficiente in entrambi i sistemi di reazione (Fig. 6 A e B). Al contrario una riduzione dell'attività enzimatica è stata misurata per i biocatalizzatori immobilizzati (Fig. 6 A e B).

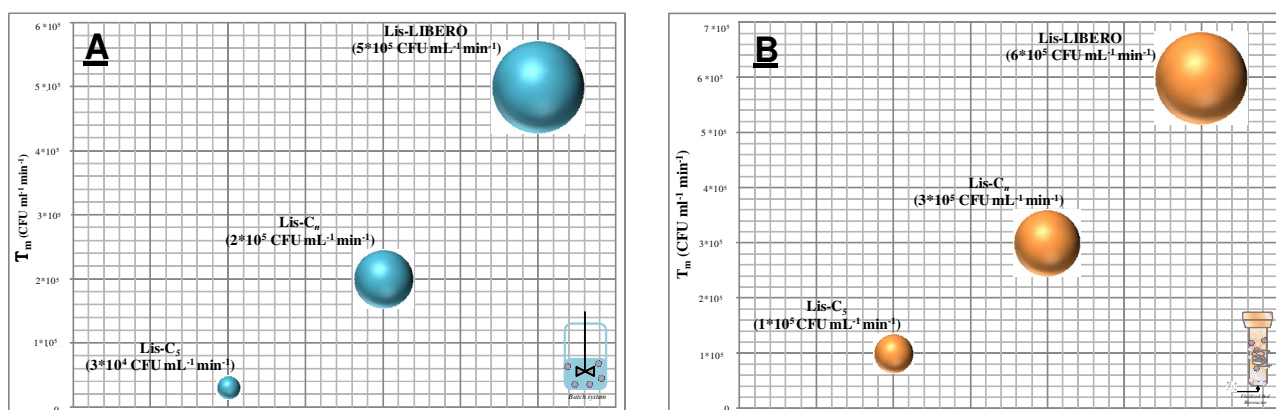


Figura 6: Tasso di mortalità cellulare dei batteri lattici (T , CFU mL⁻¹ min⁻¹) misurata nei due sistemi di reazione: batch (A) e BLF (B). La misura dell'attività litica dei biocatalizzatori (Lis-LIBERO, Lis-C₅ e Lis-C_n) è stata condotta in vino modello (pH 3.2) alla temperatura di 20 °C.

Il lisozima immobilizzato, è in fase solida, come pure le cellule batteriche, un sistema così eterogeneo non è in grado di consentire l'ottimale diffusione tra enzima e substrato, riducendo così le collisioni tra il sito attivo dell'enzima ed il substrato cellulare. Wu & Daschel (2006), infatti, riportano che, in presenza di un substrato insolubile e voluminoso come la cellula batterica, si osserva una considerevole diminuzione dell'efficienza litica della proteina muramidasi immobilizzata.

Alcuni autori (Zacchigna et al., 1996), ipotizzano che inserendo un agente chimico, con funzione di distanziatore (*spacer* molecolare), tra la proteina muramidasi e la matrice del supporto, può essere aumentata la flessibilità dell'enzima immobilizzato ottenendo così effetti positivi sulla sua efficienza catalitica. I dati riportati in figura 6 (A e B), sembrano supportare questa tesi poiché il biocatalizzatore preparato impiegando il distanziatore molecolare con n atomi di C (Lis- C_n), ha avuto un'attività enzimatica comunque efficiente in entrambi i sistemi di reazione (BLF e *batch*), mentre Lis- C_5 ha mostrato una migliore efficienza catalitica solo nel BLF (Fig. 6 B).

In figura 7, è riportata la percentuale dell'attività litica della proteina muramidasi libera ed immobilizzata (Lis-LIBERO, Lis- C_5 e Lis- C_n), misurata nelle due tipologie di bioreattori. Il grafico mostra che non sono state osservate differenze significative tra i due bioreattori nei casi di impiego del lisozima libero o immobilizzato con *spacer* molecolare a lunga catena carboniosa (Lis- C_n), al contrario l'impiego del BLF ha favorito un aumento dell'attività litica dell'enzima immobilizzato con *cross-linker* a 5 atomi di C (Lis- C_5). Questo confermerebbe quanto riportato da altri autori, (Senthilkumar et al., 2008), i quali hanno registrato un aumento dell'efficienza catalitica di enzimi immobilizzati covalentemente, senza l'impiego di distanziatori molecolari, in BLF contenenti substrato insolubile e voluminoso.

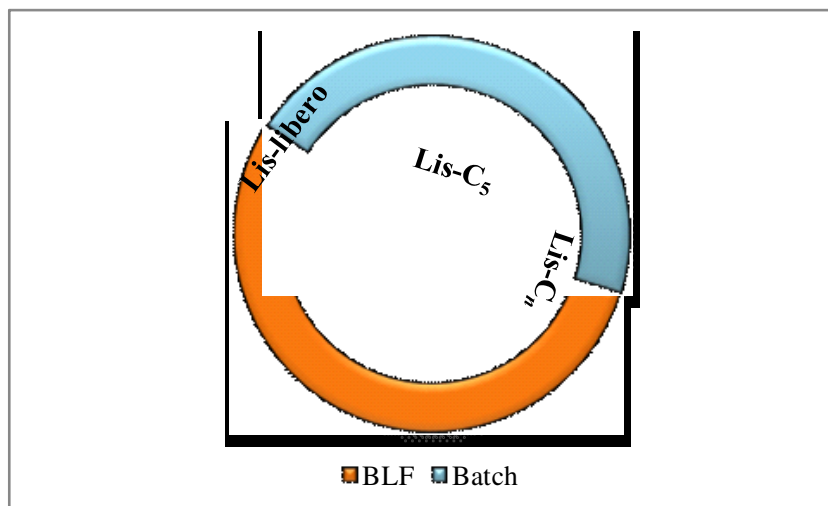


Figura 7: percentuale dell'attività litica dei biocatalizzatori liberi ed immobilizzati (Lis-LIBERO, Lis- C_5 e Lis- C_n) nei bioreattori batch e BLF.

Conclusioni

L'immobilizzazione covalente del lisozima su sfere di chitosano, effettuata impiegando il distanziatore molecolare ad n atomi di carbonio, ha prodotto un biocatalizzatore immobilizzato con sufficiente capacità litica. La più costante ed omogenea turbolenza, garantita nell'ambiente di reazione del bioreattore a letto fluidizzato, ha consentito una maggiore diffusività del substrato e quindi migliori *performance* operative di enzimi immobilizzati covalentemente e destinati al trattamento di substrati cellulari.

Bibliografia

- Bradford M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Gerbaux V., Villa A., Monamy C., Bertrand A., 1997. Use of Lysozyme to Inhibit Malolactic Fermentation and to Stabilize Wine After Malolactic Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48 (1), 49-54.
- Deckers D., Vanlint D., Callewaer L., Aertsen A., Michiels C.W., 2008. Role of the lysozyme inhibitor ivy in growth or survival of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in hen egg white and in human saliva and breast milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 4434–4439.
- Senthilkumar S.R., Dempsey M., Krishnan C., Gunasekaran P., 2008. Optimization of biobleaching of paper pulp in an expanded bed bioreactor with immobilized alkaline stable xylanase by using response surface methodology. *Bioresource Biotechnology*, 99, 7781-7787.
- Wu Y, Daeschel M.A., 2007. Lytic antimicrobial activity of hen egg white lysozyme immobilized to polystyrene beads. *Journal of Food Science*, 72, 369-374.
- Zacchigna M., Di Luca G., Lassiani L., Varnavas A., Pitotti A., Boccù E., 1999. Improved activity in acidic media of immobilized lysozyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 76, 71- 181.

Riassunto

Il lisozima, enzima muramidasi da bianco d'uovo (E.C. 3.2.1.17), trova ampia applicazione nel settore enologico, aggiunto in forma solubile per il controllo della flora lattica; da luglio 2012, è però obbligatoria (Reg. CE 579/2012) la sua menzione in etichetta se residuante nel vino. Scopo del lavoro è stato sviluppare un metodo di trattamento del vino con lisozima immobilizzato al fine di superare i vincoli legislativi, pur tenendo conto dell'inefficienza litica della proteina muramidasi in caso di substrato insolubile e voluminoso come la cellula batterica. L'attività del lisozima libero o immobilizzato covalentemente su chitosano (mediante due *cross-linker* a corta e lunga catena carboniosa), è stata determinata, in vino modello, utilizzando due bioreattori: *batch stirred* o a letto fluidizzato. I risultati, espressi in tasso di mortalità cellulare di *Oenococcus oeni*, hanno evidenziato che il biocatalizzatore preparato secondo la più diffusa metodologia con *cross-linker* a corta catena carboniosa, ha migliore capacità litica nel bioreattore a letto fluido. Non sono, invece, emerse differenze significative tra i due bioreattori nei casi di impiego del lisozima libero o immobilizzato con *cross-linker* a lunga catena carboniosa. La più costante ed omogenea turbolenza, garantita nell'ambiente di reazione del bioreattore a letto fluidizzato, consentirebbe una maggiore diffusività del substrato e quindi migliori *performance* operative di enzimi immobilizzati destinati al trattamento di substrati cellulari.