

SVILUPPO ED APPLICAZIONE DI UN BIOSENSORE AMPEROMETRICO PER LA DETERMINAZIONE DELLA L-LISINA IN CAMPIONI ALIMENTARI

Rosanna Ciriello, Tommaso R. I. Cataldi, Stefania De Biasi ed Antonio Guerrieri

Dipartimento di Chimica, Università della Basilicata, Via N. Sauro n° 85, 85100 Potenza, I, e-mail: guerrieri@unibas.it

INTRODUZIONE

La L-Lisina è l'amminoacido essenziale più facilmente danneggiabile. La sua concentrazione negli alimenti può essere quindi utilizzata come indice di qualità del loro valore nutrizionale o più in generale delle tecniche di trasformazione dei prodotti alimentari [1]. L'impoverimento in lisina è causato principalmente da trattamenti termici durante i quali la L-lisina disponibile reagisce con gli zuccheri riducenti portando alla formazione dei cosiddetti "composti di Amadori". Qualsiasi processo di trasformazione degli alimenti che preveda trattamenti termici richiederebbe quindi un monitoraggio rapido del contenuto di lisina disponibile se si vuole preservare il carattere nutrizionale dell'alimento trasformato.

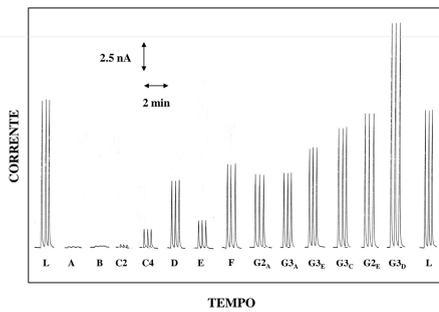
L'analisi della lisina negli alimenti è normalmente condotta tramite separazione cromatografica del campione pretrattato per idrolisi acida. Cromatografia a scambio ionico, gas cromatografia o cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) [2-4] sono fra le tecniche cromatografiche più utilizzate. Sfortunatamente l'approccio cromatografico, che richiede tra l'altro l'uso di strumentazione relativamente complessa e costosa, necessita la derivattizzazione dell'analita per la sua rivelazione il che complica la procedura analitica ed aumenta i tempi di analisi.

Lo scopo del presente lavoro di ricerca è stato quello di realizzare un dispositivo analitico avanzato per la rivelazione della L-lisina che costituisca una valida alternativa ai metodi cromatografici convenzionali. In particolare si è sviluppato un biosensore amperometrico per la lisina basato su un metodo classico di immobilizzazione enzimatica, combinato all'elettrosintesi di un film polimerico dalle spiccate caratteristiche permeabilizzanti, quale il polipirrolo ossidato [5]. Uno studio di ottimizzazione dei parametri sperimentali impiegati ha consentito di potenziare la specificità della traduzione enzimatica [6-8] e di realizzare un biosensore per la lisina caratterizzato da elevata sensibilità, ampio intervallo lineare, basso tempo di risposta, esente da problemi di interferenza faradica ed avvelenamento elettrodo e quindi impiegabile per l'analisi di matrici reali.

Il biosensore è stato applicato con successo all'analisi della lisina in vari tipi di formaggio. La stagionatura di un formaggio e la particolare lavorazione da esso subita influenzano enormemente il processo di proteolisi che determina la scissione dei peptidi fino al rilascio di amminoacidi liberi. La determinazione della quantità di L-lisina libera è importante non solo ai fini della stima della stagionatura di un formaggio e quindi del suo valore nutrizionale, ma può assumere particolare rilevanza per l'individuazione e/o conferma di eventuali frodi quali ad esempio l'uso nella produzione dei formaggi di materie prime non consentite, quali latte in polvere, caseina, caseinati, e formaggi fusi, cioè semilavorati che hanno subito un trattamento termico particolarmente spinto [9].

ANALISI DI FORMAGGI A DIVERSO CONTENUTO DI LISINA

PROCEDURA DI ESTRAZIONE: 2 g di formaggio sono stati pesati e posti in 20 ml di acqua (bidistillata e deionizzata) bollente; il campione è stato sonificato a caldo per 30 min. La sospensione è stata filtrata con filtri di carta e la soluzione risultante è stata diluita 1:100 con tampone acetato a pH 5.0. La metodica di estrazione adottata ha evidenziato buona riproducibilità ed elevata resa (superiore al 90% per tutti i campioni analizzati).



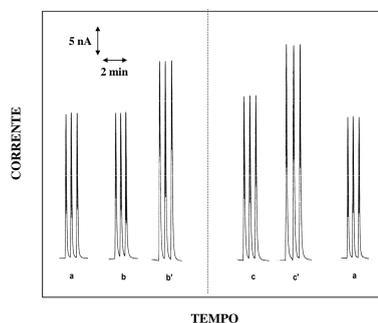
FORMAGGIO	CONTENUTO DI LISINA	
	mM	µmol/g*
Mozzarella (A)	-	-
Certosa (B)	-	-
Camembert (C ₁)	-	-
Taleggio (C ₂)	-	-
Gorgonzola (D)	1.8	18
Fontina (E)	0.76	7.6
Provolone (F)	2.3	23
Emmental (G _{2a})	2.2	22
Pecorino Sardo (G _{3a})	2.0	20
Pecorino Filiano (G _{3b})	2.7	27
Pecorino Romano (G _{3c})	3.2	32
Gruyère (G _{2b})	3.7	37
Parmigiano Reggiano (G _{3b})	6.4	64
Grana Padano	6.5	65
Lisina (L)	4.0	40

* µmol di lisina estratta / grammi di formaggio

La quantità di lisina libera è influenzata da diversi fattori quali la tecnologia di lavorazione e di produzione dei formaggi, i tempi e le condizioni di maturazione. La proteolisi gioca un ruolo importante nella maturazione dei formaggi; avviene ad opera di diversi agenti di natura enzimatica o chimica.

Tra questi vanno annoverati gli enzimi naturali del latte, il caglio o il coagulante residuo della cagliata, gli enzimi rilasciati da fermenti lattici, quelli rilasciati dalla microflora secondaria (es. Penicillium), e gli enzimi attivi dei batteri occasionali del latte e del formaggio (es. Pediococchi). Le diverse concentrazioni di lisina apprezzate per i vari formaggi investigati sono quindi giustificabili sia in termini di un diverso periodo di stagionatura sia in termini di una diversa attività proteolitica delle colture starter. Nella produzione della mozzarella e della crescenza, ad esempio, si impiega come starter lo *Str. thermophilus* che ha un alto potere acidificante ma scarsa attività proteolitica. Inoltre nel caso della mozzarella la stagionatura è assente, mentre per la crescenza è di soli 10 giorni, tempo insufficiente a liberare una quantità di L-lisina apprezzabile. Nei formaggi Grana, la quantità di L-lisina libera è abbastanza elevata, essendo dovuta non solo ai fermenti lattici omofermentativi ed eterofermentativi ma anche ai *Pediococchi*, microrganismi caratterizzati da una marcata attività proteolitica. È importante inoltre precisare che i formaggi di tipo Grana (Parmigiano Reggiano e Grana Padano) sono quelli a più lunga stagionatura.

INFLUENZA DELLA STAGIONATURA SUL CONTENUTO DI LISINA

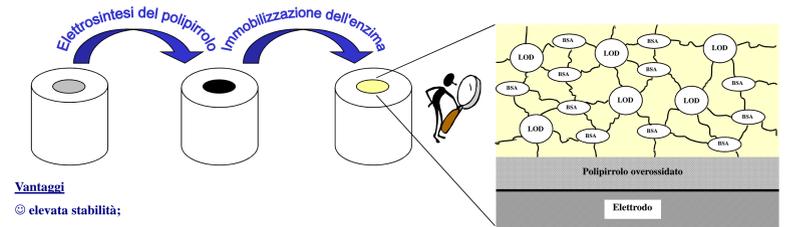


(a) = L-Lisina 0.08 mM
(b) = Grana Padano 18 mesi
(b') = Grana Padano 24 mesi
(c) = Parmigiano Reggiano 24 mesi
(c') = Parmigiano Reggiano 36 mesi

Il Grana Padano può raggiungere una maturità quasi ottimale già dopo 13 mesi di stagionatura, quando il contenuto totale degli amminoacidi liberi è pari al 90% del valore massimo. Nel Parmigiano Reggiano il valore raggiunto a tale età è pari al 75% del valore massimo

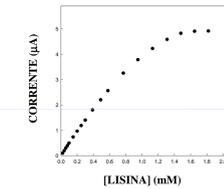
Per il Parmigiano Reggiano è possibile correlare l'età con la quantità di amminoacidi liberati, a differenza del Grana Padano, formaggio il cui contenuto di amminoacidi liberi è variabile [10]

Realizzazione del biosensore



- Vantaggi**
- elevata stabilità;
 - caratteristiche di reiezione eccellenti;
 - tempi di risposta sufficientemente brevi

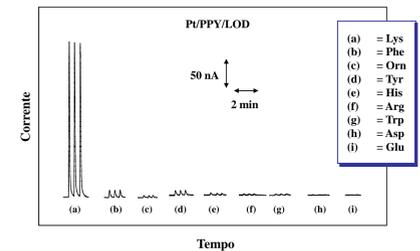
Caratterizzazione del biosensore



- K'_M : 2.1 ± 0.2 mM
- Sensibilità: $1.4 \mu A/(mM \cdot mm^2)$
- Range lineare: 0.6 mM
- Tempo di risposta: 6 - 7 secondi
- Stabilità: dopo circa 40 giorni la sensibilità è pari al 90% del valore iniziale

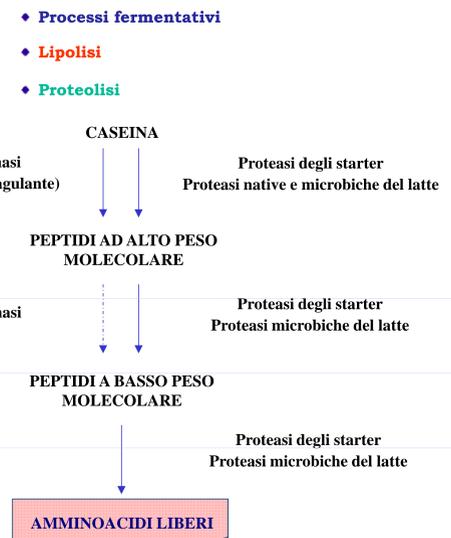
Ottimizzazione della specificità del biosensore

L'ottimizzazione di alcuni parametri sperimentali quali la velocità di flusso ed il pH, unitamente all'impiego del polimero permeabile, hanno consentito di minimizzare il responso di corrente di altri L-amminoacidi rispetto a quello della lisina



STAGIONATURA DEI FORMAGGI: PROCESSI BIOCHIMICI

La stagionatura è un insieme di processi biochimici e di condizioni ambientali controllate tali da permettere al formaggio di raggiungere tessitura, aroma e sapore desiderati. La stagionatura di un formaggio e la particolare lavorazione da esso subita influenzano enormemente il processo di proteolisi che determina la scissione dei peptidi fino al rilascio di amminoacidi liberi



CONCLUSIONI

Il presente lavoro di ricerca ha consentito la realizzazione e lo sviluppo di un dispositivo analitico avanzato di sicuro interesse per la rivelazione e determinazione della L-lisina in campo alimentare. È stato messo a punto un biosensore amperometrico (Pu/PPy/LOD) basato su un metodo classico di immobilizzazione enzimatica, combinato all'elettrosintesi di un film polimerico dalle spiccate caratteristiche permeabilizzanti. Il biosensore è caratterizzato da un tempo di risposta molto breve (6-7 secondi) ed è quindi impiegabile come rivelatore amperometrico in flusso fornendo notevoli prestazioni in termini di sensibilità e stabilità. L'ottimizzazione dei parametri sperimentali impiegati ha consentito di minimizzare il contributo di corrente di alcuni amminoacidi interferenti, caratterizzati da una affinità più o meno marcata per la lisina ossidasi impiegata in questo lavoro, potenziando quindi la specificità della traduzione enzimatica nei confronti della L-lisina.

Il biosensore Pu/PPy/LOD, poiché mostra una risposta relativamente bassa nei confronti di altri amminoacidi, è stato utilizzato per la determinazione del contenuto di L-lisina in campioni reali. È stato possibile discriminare vari tipi di formaggio in base al diverso contenuto di lisina. Lo scopo è stato quello di verificare l'importanza della tecnologia di lavorazione e produzione dei formaggi sulla quantità di lisina libera, e di stabilire inoltre l'incidenza dei tempi e delle condizioni di maturazione.

È possibile quindi concludere che il dispositivo sviluppato consente l'analisi in tempi brevi di campioni alimentari senza ricorrere a particolari pretrattamenti. I risultati sperimentali ottenuti per la L-lisina verranno in futuro convalidati mediante confronto con metodiche ufficiali già consolidate, quali l'analisi cromatografica, e incoraggiano l'impiego del biosensore per il controllo di qualità di prodotti alimentari che possono subire danni come conseguenza di trattamenti termici troppo spinti. È sicuramente di conforto l'accordo riscontrato per taluni formaggi tra le concentrazioni di lisina stimate ed i dati riportati in letteratura. Nel caso ad esempio dell'Emmental [11] è riportato un contenuto di L-lisina libera pari a 29 µmol/g; per quanto riguarda invece il Parmigiano Reggiano [12] è riportata la presenza di circa 3 g di lisina libera per 100 g di proteine totali corrispondenti a 67 µmol/g.

Tra le tante possibili applicazioni in campo alimentare, il biosensore Pu/PPy/LOD, può essere impiegato per determinare il contenuto di L-lisina negli idrolizzati proteici del siero di latte. Infatti, il siero di latte, che fino a 10 anni fa era considerato un problema soprattutto per il suo smaltimento, è stato ampiamente rivalutato per l'alto contenuto di sostanze nutritive [13]. Le proteine del siero, ad esempio, risultano ricche di amminoacidi essenziali, ma soprattutto stimolano la sintesi proteica, tanto da essere definite proteine "anaboliche".

Riferimenti

- 1) R. F. Hurrel, K. J. Carpenter, *Prog. Food Nutr. Sci.* **5** (1981) 159
- 2) N. P. Thio, D. H. Tompkins, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72** (1989) 609
- 3) A. Cubedo Fernandez-Traipella, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **73** (1990) 935
- 4) B. N. Jones, J. P. Gilligan, *J. Chrom.* **266** (1983) 471
- 5) D. Centone, A. Guerrieri, C. Malatesta, F. Palmisano, P. G. Zambonin, *Fresenius J. Anal. Chem.* **342** (1992) 729-733
- 6) E. Marconi, G. Panfilii, M. C. Messia, R. Cubadda, D. Compagnone, G. Pallechi, *Anal. Lett.* **29** (1996) 1125
- 7) M. G. Lavagnini, D. Moscone, G. Pallechi, D. Compagnone, C. Cremisini, *Talanta* **40** (1993) 1301
- 8) A. L. Simonian, I. E. Badalian, T. T. Berezov, I. P. Smirnova, S. H. Khaduev, *Anal. Lett.* **27** (1994) 2849
- 9) P. Cappelli, V. Vannucchi, "Chimica degli alimenti, conservazione e trasformazione", Ed. Zanichelli 1994
- 10) P. Resmini, J. A. Hogenboom, C. Pazzaglia, L. Pellegrino, "Scienza e tecnica lattiro-casearia" **44**, (1) (1995) 7-19
- 11) I. G. Casella, M. Gatta, T. R. I. Cataldi, *J. Chromatography A* **878** (2000) 57-67
- 12) M. Careri, S. Spagnoli, G. Panari, M. Zanoni, G. Barbieri, *Int. Dairy Journal* **6** (1996) 147-155
- 13) L. V. Kirillova, I. P. Chernikovich, V. K. Pestis, *Food Biotechnology*, S. Bielecki, J. Trampler and J. Polak (Editors) 2000 Elsevier Science B. V.