

Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XVII ciclo
Indirizzo Biotecnologie Vegetali
Università di Napoli Federico II



**USO DELL' ENZIMA TRANSGLUTAMINASI COME
STRUMENTO BIOTECNOLOGICO PER LA
PREPARAZIONE DI FILM IDROCOLLOIDI A
COMPOSIZIONE MISTA**

Dottoranda: Concetta Valeria Lucia Giosafatto

Relatore: Prof.ssa Loredana Mariniello

Coordinatore: Prof. Gennaro Marino

INDICE

RIASSUNTO	pag.	1
SUMMARY	"	2
INTRODUZIONE	"	7
MATERIALI E METODI	"	19
MATERIALI	"	19
METODI	"	19
PREPARAZIONE DELLA TRANSGLUTAMINASI MICROBICA (mTG)	"	19
PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI PROTEINE DA FARINA DI SEMI DI SOIA	"	19
PREPARAZIONE DELLE PECTINE DI MELA	"	19
PREPARAZIONE DEGLI OMOGENATI DI FINOCCHIO	"	19
CARATTERIZZAZIONE DELLE PECTINE DA FINOCCHIO	"	20
<i>Estrazione delle pectine</i>	"	20
<i>Idrolisi delle pectine</i>	"	20
<i>Riduzione dei monosaccaridi</i>	"	20
<i>Contenuto di acidi uronici e grado di esterificazione delle pectine</i>	"	21
<i>Viscosità delle pectine</i>	"	21
ESTRAZIONE DELLA FASEOLINA DA <i>PHASEOLUS VULGARIS</i>	"	21
SAGGIO DI POLIMERIZZAZIONE	"	21

PREPARAZIONE DEI FILM	pag.	22
<i>Preparazione dei film utilizzando pectine di mela di origine commerciale e proteine della soia</i>	"	22
<i>Preparazione dei film utilizzando omogenati di finocchio e proteine della soia</i>	"	22
<i>Preparazione dei film utilizzando pectine estratte da finocchio e faseolina</i>	"	22
MISURAZIONE DELLO SPESSORE DEI FILM	"	23
PERMEABILITÀ AL VAPORE ACQUEO	"	23
PERMEABILITÀ ALL'OSSIGENO ED ALL'ANIDRIDE CARBONICA	"	23
SOLUBILITÀ	"	25
PROPRIETÀ MECCANICHE	"	26
SWELLING	"	26
SAGGIO DI PROTEOLISI DELLA FASEOLINA	"	26
RISULTATI	"	28
FILM IDROCOLLOIDI A COMPOSIZIONE MISTA CONTENENTI MACROMOLECOLE MODELLO: PECTINE DI MELA DI ORIGINE COMMERCIALE E PROTEINE DELLA SOIA	"	28
SOLUBILITÀ	"	28
PERMEABILITÀ	"	30
FILM IDROCOLLOIDI A COMPOSIZIONE MISTA UTILIZZANDO OMOGENATI GREZZI DI FINOCCHIO E PROTEINE DELLA SOIA	"	31
STUDIO DELLE PROPRIETÀ MECCANICHE	"	33
CARATTERIZZAZIONE DELLE PECTINE ESTRATTE DA FINOCCHIO	"	34
PROPRIETÀ DEI FILM OTTENUTI CON PECTINE ESTRATTE DAL FINOCCHIO E FASEOLINA ESTRATTA DA <i>PHASEOLUS VULGARIS</i>	"	36

FASEOLINA COME SUBSTATO DELLA mTG	pag.	40
SAGGIO DI PROTEOLISI DELLA FASEOLINA	"	41
DISCUSSIONE	"	43
BIBLIOGRAFIA	"	48
APPENDICI		
A ELENCO PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSO	"	62
B COPIA DEL MANOSCRITTO IN CORSO DI STAMPA	"	63

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1. - Principali applicazioni della mTG	pag.	14
Tabella 2 - Proprietà barriera dei film	"	30
Tabella 3 - Proprietà meccaniche dei film	"	34
Tabella 4 - Caratteristiche delle pectine estratte dal finocchio	"	35
Tabella 5 - Spessore dei film ottenuti con le pectine estratte da finocchio in assenza ed in presenza di diverse quantità di faseolina	"	37
Tabella 6 – Resistenza della faseolina modificata dalla mTG all'azione della tripsina	"	41

ELENCO DELLE FIGURE

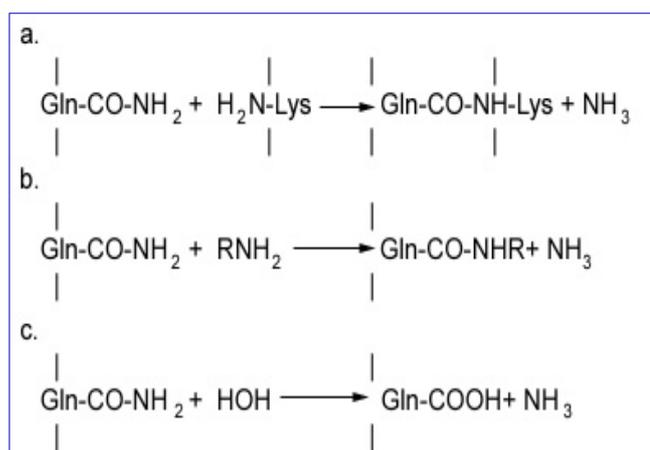
Fig. 1 – Formazione del legame isopeptidico intramolecolare (A) e intermolecolare (B) catalizzata dalle TG	pag.	7
Fig. 2 – Tipi di polimeri prodotti dalle TG	”	8
Fig. 3 – Meccanismo della reazione catalizzata dalle TG	”	9
Fig. 4 – Schema del metodo monometrico usato per misurare la permeabilità dei film all’ossigeno ed all’anidride carbonica	”	24
Fig. 5 – Solubilità dei film a differenti pH	”	28
Fig. 6 – Solubilità dei film in agenti denaturanti	”	29
Fig. 7 – Analisi mediante elettroforesi delle proteine della farina di soia polimerizzate dalla mTG in presenza di Finocchio	”	32
Fig. 8 – Viscosità intrinseca delle pectine di finocchio	”	34
Fig. 9 – Film ottenuto con pectine estratte dal Finocchio	”	36
Fig. 10 – <i>Swelling</i> dei film in funzione della forza ionica	”	37
Fig. 11 – <i>Swelling</i> dei film in funzione della pressione osmotica	”	38
Fig. 12 – <i>Swelling</i> dei film in funzione del pH	”	39
Fig. 13 – Modulo elastico in funzione dello <i>swelling</i>	”	39
Fig. 14 – Analisi mediante elettroforesi della faseolina polimerizzata dalla mTG in presenza di Finocchio	”	40

RIASSUNTO

L'obiettivo perseguito nel presente progetto si prefiggeva di ottenere film edibili idrocolloidi a composizione mista utilizzando come strumento biotecnologico la transglutaminasi microbica (mTG) per polimerizzare la componente proteica di tali film. La mTG catalizza la formazione di legami isopeptidici intra e/o intermolecolari fra il gruppo γ -carbossiamidico di residui glutamminici e il gruppo ϵ -aminico di residui lisinici entrambi endo-proteici. Proteine della farina dei semi di soia (modificate e non con la mTG) e pectine di mela sono state utilizzate come molecole modello per ottenere film manipolabili e trasparenti. Questi film sono stati caratterizzati da un punto di vista della solubilità (in differenti pH e condizioni denaturanti) e della permeabilità al vapore acqueo, ossigeno e anidride carbonica. Tali analisi hanno dimostrato che i film preparati in presenza di mTG presentano una minore solubilità rispetto ai film in cui è assente l'enzima. Le prove di permeabilità hanno indicato che i film preparati con proteine modificate dalla mTG offrono una barriera all'acqua, all'ossigeno ed all'anidride carbonica maggiore di quella fornita dai film preparati in assenza di mTG. Le pectine di origine commerciale sono state poi sostituite da omogenati provenienti dal finocchio (*Foeniculum vulgare*) allo scopo di trasformare tali "wastes" ad alto impatto ambientale in materie prime per ulteriori processi di trasformazione biotecnologici. Tali omogenati sono stati utilizzati per la preparazione di film in presenza delle proteine della soia modificate e non dall'enzima. I film ottenuti hanno dimostrato avere un ottimo grado di manipolabilità e sono stati quindi sottoposti a prove di natura meccanica, prove che sono servite a stabilire la resistenza dei film. I risultati ottenuti hanno dimostrato che tale parametro aumenta notevolmente in presenza della mTG, dimostrando che l'enzima crea un materiale con una reticolazione più omogenea e resistente. In un secondo momento gli estratti grezzi di finocchio sono stati sostituiti dalle pectine estratte da tale ortaggio. Per capire le basi responsabili delle loro capacità filmanti, queste pectine sono state caratterizzate dal punto di vista chimico-molecolare. Effettuata tale caratterizzazione, le pectine estratte dal finocchio sono state utilizzate come fonte glucidica per la preparazione di ulteriori film di cui la componente proteica era rappresentata dalla faseolina che, essendo una proteina globulare, è capace di formare complessi e coacervati con le pectine. Tali film sono stati sottoposti a prove di "swelling", ovvero di capacità di rigonfiamento in diverse condizioni, di pH, di pressione osmotica e forza ionica. Le pectine del finocchio, così come le pectine estratte da altre matrici vegetali, si rigonfiano con il diminuire della forza ionica e della pressione osmotica ma si restringono con l'aumentare del pH. Inoltre l'aggiunta della faseolina fa ridurre i valori di "swelling", dimostrando che l'aggiunta della proteina rende più compatta la matrice polisaccaridica, in modo tale da porre resistenza ad un'eccessiva idratazione. Tra le caratteristiche della faseolina si annovera la sua attività *anti-feeding* nei confronti di larve molto dannose all'agricoltura. Questa caratteristica risulta molto importante in previsione di un'applicazione dei film proposti come teli per la pacciamatura. È stato verificato, mediante un saggio *in vitro*, che l'attività *anti-feeding* della faseolina si conserva anche quando la proteina è modificata dalla mTG, lasciando immaginare quindi un possibile utilizzo dell'enzima anche per la produzione di pellicole da utilizzare in campo agronomico. Naturalmente in un prossimo futuro ci si propone di studiare questi film dal punto di vista della biodegradabilità, della solubilità e della permeabilità in condizioni simulanti le condizioni del terreno, ambiente di elezione per tutte le applicazioni destinate all'agricoltura.

SUMMARY

Modification of proteins by enzymes such as Transglutaminase (TG, E.C. 2.3.2.13) has recently become of great interest to scientists. TG is an enzyme capable of catalyzing the formation of covalent crosslinks between peptide-bound glutamyl residues (acyl donors) and ϵ -amino group of lysine residues (acyl acceptors) in proteins, including a variety of primary amines (Nonaka *et al.*, 1989). In the absence of amine substrate in the reaction system, water becomes the acyl acceptor



TG-catalysed reactions

and the γ -carboximide groups of glutamine residues are deaminated, becoming glutamic acid residues. TG has been found in invertebrates (Singh & Mehta, 1994), vertebrates including amphibians (Zhang & Masui, 1997), fish (Yasueda *et al.*, 1994) and birds (Puszkin & Raghuraman, 1985), plant tissue (Villalobos *et al.*, 2004) and microorganisms (Ando *et al.*, 1989).

In mammals TG are present in most tissues and body fluids and are involved in several biological processes, including blood clotting, wound healing and epidermal keratinization (Aeschlimann & Paulsson, 1994). Among these TG, the human blood coagulation Factor XIIIa, an activated form of plasma TG (Chung *et al.*, 1974) has been most characterized. By catalyzing the crosslinking between fibrin molecules, Factor XIII forms fibrin clots for haemostasis and heals a wound (Kashiwagi *et al.*, 2002). Many TG are homologous to human Factor XIII and share the common feature of Ca^{2+} dependent catalytic activity (Folk and Chung, 1973).

A microbial TG (mTG) has been isolated from the culture medium of *Streptovorticillium* sp. S-8112 (Ando *et al.*, 1989), which has been identified as a variant of *Streptovorticillium mobaraense*. This enzyme is the first TG obtained from a non-mammalian source. Although the physiological role of mTG is still unknown, this protein is secreted from the cytoplasm membrane as a zymogen and is activated by proteolytic processing (Pasternack *et al.*, 1998). A sequence analysis of mTG by Edman degradation revealed that the protein consists of 331 aminoacids with a molecular mass of 37.9 KDa (Kanaj *et al.*, 1993). In contrast to other members of the TG family, the mTG exhibits Ca^{2+} independent activity. Moreover, mTG is considered to be stable over a wide pH range (4-9) and the optimum temperature for enzymatic activity is 55 °C (Yokoyama *et al.*, 2004). Studies have shown that mTG catalyses the crosslinking of a number of proteins, including legume globulins such as 11 S globulin (Yildirim & Hettiarachchy, 1997) and oat globulins (Siu *et al.*, 2002), whey proteins (Mahmoud & Savello, 1993; Yildirim & Hettiarachchy, 1997), myosin (Nonaka *et al.*, 1989), fibrins (Nonaka *et al.*, 1989), milk proteins (Motoki *et al.*, 1986; Cozzolino *et al.*, 2003), including α -lactalbumin and β -lactalbumin, as well as many other albumins (Nonaka *et al.*, 1992; Kang *et al.*, 1994). For its characteristics (such as Ca^{2+} independence activity, the higher reaction rate, the broader substrate

specificity for the acyl donor, the lower activity for deamidation and the small molecular size) mTG is particularly useful for a industrial and biotechnological applications (Kashiwagi *et al.*, 2002). In fact it has been proved that the modification of food proteins by mTG leads to textured products, protects lysine residues in food proteins from various chemical reactions, improves elasticity, firmness and water holding capacity, modifies solubility and functional properties, and produces food proteins of higher nutrition value through crosslinking of different proteins containing essential aminoacids (Matheis & Whitaker, 1987; Kitabatake & Doi, 1993; Motoki & Seguro, 1994).

In the present study, it has been investigated the possibility of using mTG as a biotechnological tool for producing hydrocolloid films constituted by proteins and carbohydrates. Therefore different kinds of films were produced and partially characterized.

Recently Mariniello *et al.* (2003) reported that the treatment with mTG improved the mechanical properties of a film constituted by apple pectin and soy flour proteins. In this experimental project, it was completed the general characterization of such a film by describing its water solubility and permeability properties. The water solubility protein-soy flour films, prepared in the presence or absence of mTG, was investigated after 24 h incubation both at different values of pH and in the presence of different denaturing agents (Di Pierro *et al.*, in press). Solubility studies were conducted also with HDPE and Mater-Bi[®] films which resulted completely insoluble in water following the two treatments tested. Conversely, protein soy flours films prepared in the presence of mTG showed a significant decrease in solubility compared to uncrosslinked controls following 24 h incubation at the different pH because of the presence of soy protein isopeptide intermolecular bonds produced by the enzyme (Mariniello *et al.*, 2003). The solubility of the pectin soy flour films obtained in the presence of TG resulted lower than that of the controls also following treatment with SDS and urea, and much lower after incubation in the presence of β -mercaptoethanol (Di Pierro *et al.*, in press). Similar findings were obtained by Mahmoud and Savello (1993) with mTG-polymerized whey protein films, and by Yildirim and Hettiarachchy (1997) with films containing whey proteins and soybean 11S globulin crosslinked by the enzyme. The lower solubility in β -mercaptoethanol suggests that, in agreement with Yildirim and Hettiarachchy (1997), the contribution of disulphide bonds to the film integrity is less important than both hydrophobic interactions and hydrogen bonds (Di Pierro *et al.*, in press).

To investigate whether soy protein crosslinks produced by TG also influence the barrier properties of pectin soy flour films, permeability to oxygen, carbon dioxide and water vapour was examined and compared to that exhibited not only by uncrosslinked pectin soy flour, but also by HDPE and Mater-Bi[®] films. It is well known that many factors affect the film barrier properties besides the intermolecular crosslinking. Among these the polarity and the density of the molecules constituting the film, as well as the high level of chain-to chain packing, are the most important. In fact, these factors determine the film free volume that is a measure of the interstitial space among the different molecules (Miller & Krochta, 1997). The results demonstrate that the film permeability to oxygen and carbon dioxide were strongly influenced by the TG-mediated soy protein crosslinks, since the pectin-soy flour films obtained in the presence of the enzyme showed a significant decrease in permeability to both gases compared to control pectin soy flour films ($p < 0.01$). In particular, it was found extremely interesting that the pectin soy flour films obtained in the presence of TG showed a reduced permeability to both oxygen and carbon

dioxide when compared to HDPE films ($p < 0.01$). In the same manner, permeability to water vapour was found to be influenced by TG-mediated crosslinks, even though a modest decrease was observed. Therefore, it is reasonable to hypothesize that TG-mediated soy protein crosslinking markedly reduces the free volume inside the pectin soy flour film thus influencing its barrier properties.

Apple pectins were then substituted by *by-products* deriving from processed vegetables. In fact it is known that, due to the nature of cell wall cellulose, these kinds of *by-products* represent a major disposal problem for the industry concerned, but they are also promising sources of compounds which may be used because of their favourable technological and nutritional properties (Schieber *et al.*, 2001). In this project we used waste from fennel (*Foeniculum vulgare*), a well-known aromatic plant belonging to the Apiaceae family and typical of Mediterranean area (Piccaglia *et al.*, 2001). More than 70,000 tonnes of fennel are produced annually in Southern Italy as a vegetable crop, of which ~30% is waste. Our aim was to enable the development of uses for fennel waste, which is currently simply disposed by farmers, with a focus on the properties of biopolymer films prepared from raw fennel homogenates as well as from fennel-extracted pectin. To comprehend the molecular basis responsible of pectin film forming properties, molecular characterization of pectic polysaccharides extracted from fennel was carried out. Pectic substances are important polysaccharides of the cell walls of higher plants. They are implicated in a range of functions both vital to the plant and commercially important to the food and pharmaceutical industries. In fact, they act as a bonding substance with supporting and stabilizing functions and controls due to their great swelling ability and hydrocolloid nature of the plant water system and, as they form gels under certain condition, they are used in jams, jellies, marmalade, and confectioneries (Levigne *et al.*, 2002). They mainly consist of a backbone (1→4) linked partly methylesterified α -D-galacturonic acid units (MacDougall *et al.*, 1996). The linear chain may be interrupted by "hairy regions" composed of short neutral sugar side chains mainly composed of galactose and arabinose residues. These regions are non-gelling areas and so they often represent a problem in the commercial use of pectins (Peugnet *et al.* 2001). Neutral sugars distribution varies between pectic fractions according to many factors, including plant species and type of tissue. In this experimental project individual neutral sugars were analysed as their alditol acetate derivatives by gas chromatography after hydrolysis of fennel pectin by TFA treatment (Henry *et al.*, 1983; Selvendran *et al.*, 1979). The neutral sugars found were galactose, arabinose and rhamnose. An other important pectins characteristic is the degree of methyl esterification, as it influences their gelling properties (Thakur *et al.*, 1997). The degree of esterification of fennel pectic polysaccharides, obtained from the total uronic acid content and determination of the methanol release in alkali (MacDougall *et al.*, 2001a), was 48 %. It means that they don't need a very low pH to form gels (Thakur *et al.*, 1997).

After characterizing these polysaccharides, fennel pectin based films were prepared. One of the most important characteristics of biopolymer films, which have limited their industrial applicability, is their susceptibility to atmospheric moisture. A study of fennel pectin films was conducted to determine the basis of their swelling properties and to identify a method to reduce swelling. Factors affecting the swelling of polyelectrolytes include: the affinity of the polymer for water; the mobile counterions associated with the fixed charges of the polymer which generate an osmotic swelling force, (known as the Donnan effect) (Peppas *et al.*, 2000); the presence of crosslinks between polymer chains which resist swelling. The swelling of pectin films was

investigated over a range of osmotic pressures, pH and salt concentrations, and in the presence of a protein, phaseolin, which has the potential to form non-covalent crosslinks with the pectin, and reduce the magnitude of the Donnan effect.

At a constant ionic strength and pH, film swelling decreased with increasing osmotic stress. At a constant osmotic stress and pH, swelling increased with decreasing ionic strength. Such a dependence on ionic strength is characteristic of polyelectrolytes and the swelling generated by the Donnan effect. At a constant osmotic stress and ionic strength, swelling increased with increase in pH over the range of pH associated with the ionisation of the carboxyl group of the galacturonic acid. In all cases the swelling of films containing phaseolin was reduced demonstrating the effectiveness of the globular protein in generating a network into which fennel pectin was entrapped. This is partly due to the inclusion of a multivalent counterion, and is also partly a result of specific interactions of the protein with the pectin chain reducing its effective charge. Therefore, the ionic interactions between protein and pectic polysaccharides have the potential to contribute to the structural assembly of pectin network (MacDougall *et al.*, 2001b).

Phaseolin is the major storage protein in the cotyledons of the bean *Phaseolus vulgaris* and belongs to the vicilins or 7 S class of legume storage proteins (Lawrence *et al.* 1994). Vicilins proteins for which cDNA or gene sequences are available include soybean beta-conglycinin (Doyle *et al.*, 1986), pea vicilin (Watson *et al.*, 1988), and canavalin from the species *Canavalia ensiforme* (Ng *et al.*, 1993) as well as bean phaseolin (Lawrence *et al.*, 1994). Vicilins from the different legume seed exhibit a considerable amount of sequence homology and have similar 3D structures (Lawrence *et al.* 1994); in particular phaseolin shows a high homology sequence with soy proteins, specially with α and β subunits of beta-conglycinin. In this study we reported, by SDS-PAGE profiles of mTG treated phaseolin, that phaseolin is reactive, like soy proteins, to the microbial enzyme. In fact the polymerization occurred even when the protein was mixed with the enzyme at a ratio of 600:1. Furthermore Sathe and Sze-tao (1997) showed that native phaseolin is resistant to trypsin, chymotrypsin and pepsin proteolysis *in vitro*. They also reported significantly improved proteolysis when the protein was subjected to moist heat. The low digestibility of phaseolin is one of the most important reason why the phaseolin is considered exerting anti-feeding activity against many agriculture dangerous bruchids (Yunes *et al.* 1998; Moraes *et al.* 2000). Therefore, we investigated the effects of mTG treatment of the *in vitro* rate of proteolysis. Our data reported that mTG mediated modification affected considerably the phaseolin proteolysis, in fact the protein showed a very low susceptibility to trypsin hydrolysis. This feature is particularly interesting in view of future application of such films in agronomy.

Fennel raw homogenates were used as carbohydrate source to produce hydrocolloid films where the protein component was represented by the whole soy-flour in the absence or presence of mTG. In fact it is known that many proteins occurring in soy flour are able to act as substrate for mTG when they are present all together in the assay mixture (Mariniello *et al.*, 2003). In this thesis we demonstrated by SDS-PAGE that soy flour proteins were modified by mTG either in presence or in absence of fennel homogenates. In fact, in either case, mTG treatment led to the disappearance of many soy protein bands together with the appearance of new proteins bands at higher molecular weight and the accumulation of protein polymers at the gel origins.

Fennel homogenates-soy flour films cast in presence or absence of mTG were solubilized in Laemmli buffer and analysed by SDS-PAGE. Electrophoresis pattern of films fragments confirmed the mTG protein modification during the casting as shown

by the formation of polymers of about 250 KDa and the presence of high molecular weight polymers unable to penetrate the stacking gel. Finally, to establish whether mTG treatment modified mechanical properties of fennel homogenate-soy protein based films, their tensile strength and their elongation to break were investigated. These experiments showed that there is no significant difference in terms of elongation to break between the fennel homogenate films obtained with or without soy protein in absence or presence of mTG, indicating that all the films had the same flexibility. Regarding tensile strength, it is noticeable that homogenate-based films without soy proteins present the same value as the ones prepared in the presence of unmodified soy flour films, but this value greatly increased in mTG-crosslinked films, showing that the introduction of covalent iso-peptide bonds into the proteins considerably improved the network structure and, as consequence, the mechanical resistance of the films. Similar results have been reported for α -lactalbumin and β lactalbumin based films by Mahmoud and Savello (1993) and for soy-flour-pectins based films reported by Mariniello *et al.* (2003).

Based on these results, we can say that the application field of these films can be very broad. In fact we can suggest a possible use of the protein pectin-soy flours films obtained in the presence of mTG as edible wraps for food packaging. In particular, because of their barrier properties they would find application to prevent quality changes in products, like meat pieces or high-moisture low sugar cakes, that require to be enveloped by films with low permeability to oxygen and carbon dioxide and moderate permeability to water vapour (Di Pierro *et al.*, in press). Furthermore, since the use of natural hydrophilic polymers as drug carriers is receiving a growing attention especially from the viewpoint of environmental pollution and safety, mTG-crosslinked films might be also considered as potential pharmaceutical coatings for a controlled release of drugs and/or macromolecules such vaccines and peptides (Bromberg, 2003).

An other potential and very important use of these films could be in agronomic field as biodegradable "mulching films", to reduce the high environmental impact of plastic mulches. Furthermore the usage of phaseolin could confer to these films an added value of anti-feeding capacity against very dangerous agricultural pests.

In the next future, further studies will be addressed to complete the characterization of these films with the aim of studying their biodegradability, solubility and permeability (in particular regarding CO₂) under soil-like conditions.

INTRODUZIONE

Sin dalla loro scoperta, le transglutaminasi (R-glutammi-peptide: ammina-gamma-glutammi transferasi; E.C. 2.3.2.13; TG) hanno suscitato un notevole interesse sia nella comunità accademica, sia nel settore commerciale dal momento che le reazioni catalizzate da questi enzimi modificano le caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche delle proteine substrato (Collighan *et al.*, 2002). Le diverse TG, distribuite in un gran numero di organismi viventi, manifestano caratteristiche differenti nei confronti della specificità di substrato, della modalità d'azione, della temperatura e del pH a cui sono stabili.

Le transglutaminasi sono una famiglia di enzimi, per la prima volta descritti nel 1959 da Waelsch *et al.* (Clarke *et al.*, 1959) che catalizza la formazione di legami covalenti sia intra che intermolecolari (Fig. 1) tra residui glutamminici e lisinici presenti in proteine substrato.

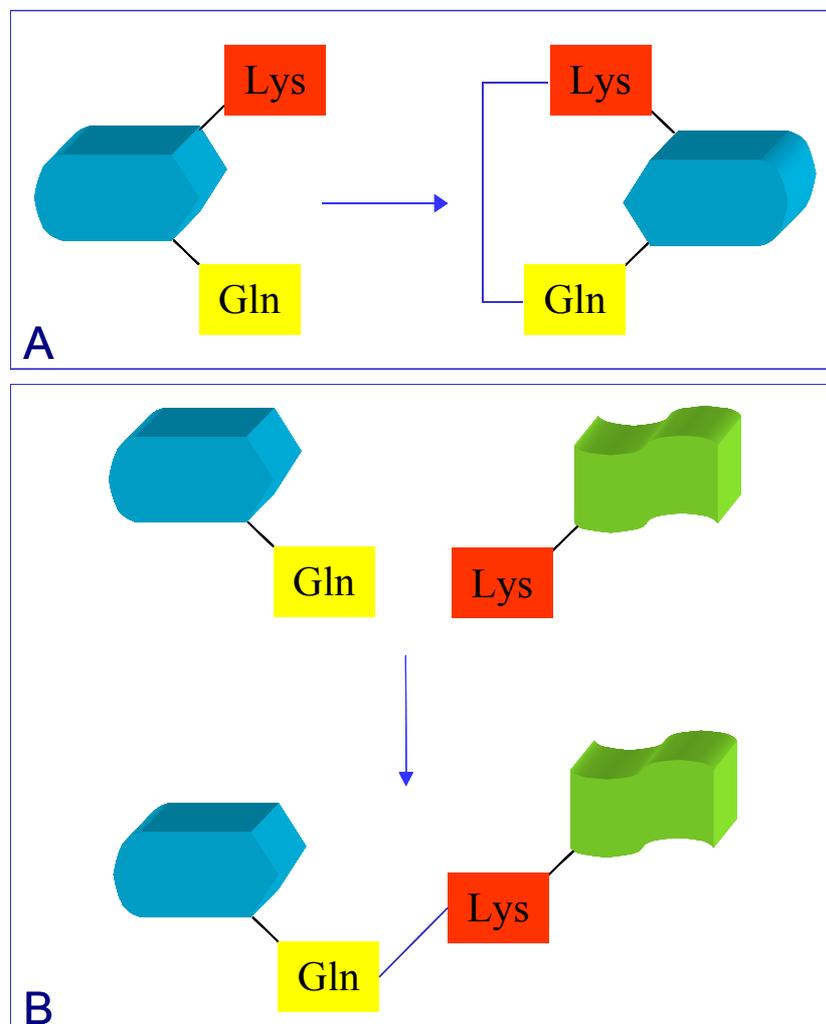


Fig. 1 - Formazione del legame isopeptidico intramolecolare (A) e intermolecolare (B) catalizzata dalle TG

Se i residui reattivi sono presenti sulla stessa o su diverse specie proteiche, si avrà la possibilità formare omopolimeri lineari e/o ramificati ed eteropolimeri lineari e/o ramificati (Fig. 2).

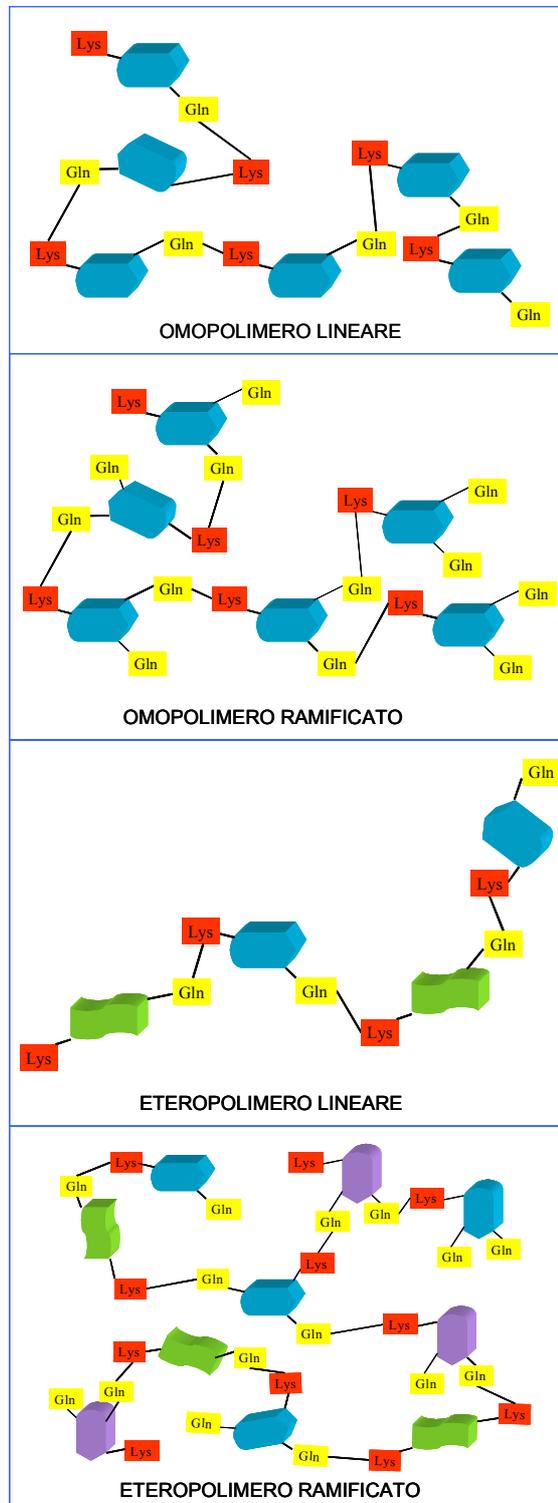


Fig. 2 – Tipi di polimeri prodotti dalle TG

La reazione catalizzata dalle TG è una reazione di sostituzione nucleofila che avviene con scarsa variazione di energia libera e prevede due stadi. Nel primo stadio un residuo di cisteina, presente nel sito catalitico, reagisce con un gruppo γ -carbossiammidico di un residuo di glutamina formando un intermedio γ -glutammil-tioestere, liberando ammoniaca, che in condizioni fisiologiche viene immediatamente protonata. Successivamente, il gruppo ϵ -amminico di un residuo di lisina reagisce con il carbonio acilico del tioestere intermedio producendo un legame γ -glutammil-isopeptidico, con rigenerazione del gruppo sulfidrilico della cisteina del sito attivo (Fig. 3) (Folk & Finlayson, 1977).

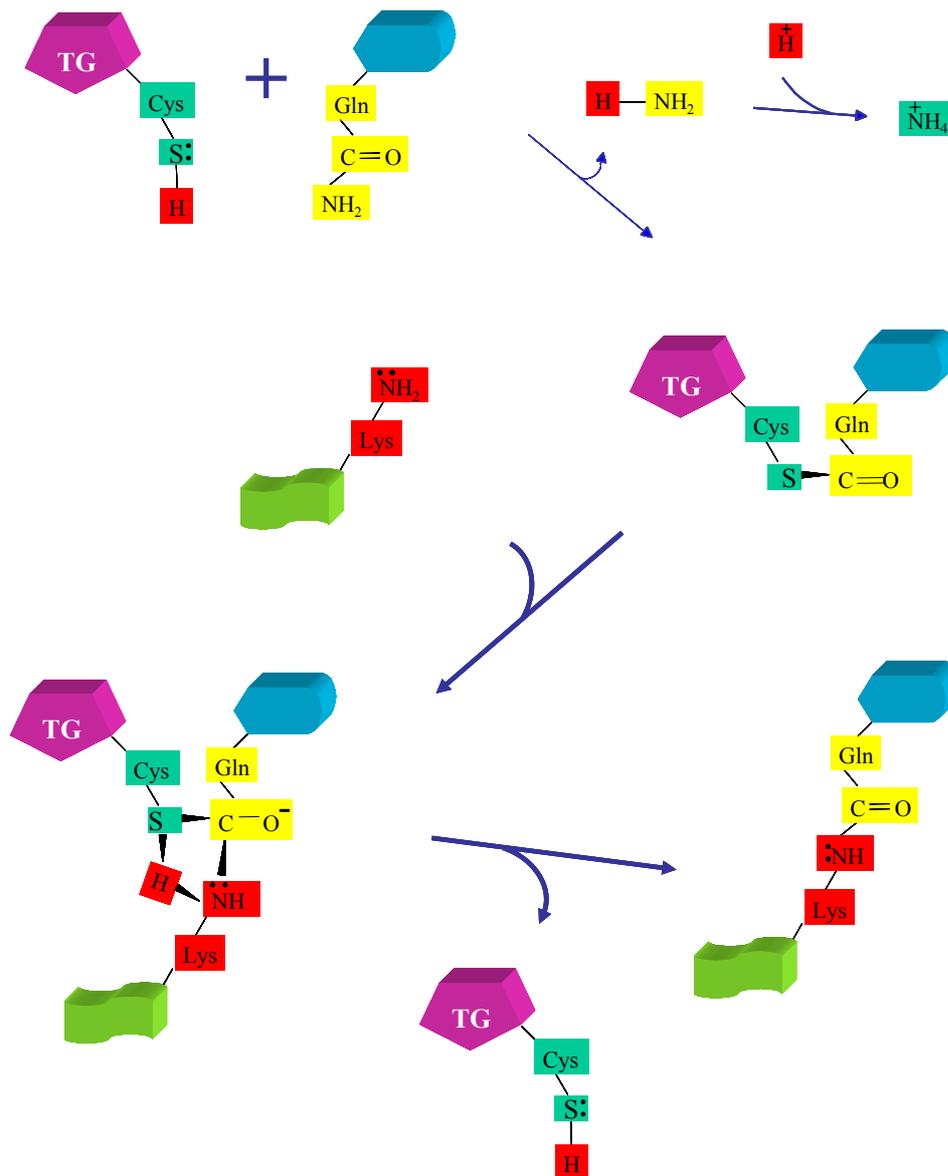


Fig. 3 – Meccanismo della reazione catalizzata dalle TG

Lo stesso tipo di reazione avviene quando il gruppo acil-accettore è rappresentato da un gruppo amminico primario di ammine a basso peso molecolare, come putrescina, spermina e spermidina, aventi una catena metilenica confrontabile per lunghezza con la catena laterale della lisina (Folk, 1983), con formazione di derivati N-mono(γ -glutamminil) poliamminici ed N,N-bis(γ -glutamminil)poliamminici (Folk & Chung, 1973).

In assenza di ammine primarie, il gruppo acil-accettore può essere una molecola di acqua. In quest'ultimo caso, per deamidazione, si ha la trasformazione del residuo glutamminico in residuo glutammico (Motoki *et al.*, 1986).

I prodotti derivanti dai legami crociati catalizzati dalle TG, spesso di alto peso molecolare, sono largamente resistenti ai cambiamenti meccanici ed il loro accumulo è stato rilevato in un elevato numero di tessuti tra cui pelle, capelli e sangue (Griffin *et al.*, 2002).

Il numero di proteine capaci di fungere da substrati donatori di gruppi acilici per l'enzima è piuttosto ristretto poiché sia i residui adiacenti alla glutammina che la conformazione della proteina ne determinano la reattività. Al contrario sono molte le proteine capaci di fornire il gruppo ϵ -amminico che funziona da nucleofilo del gruppo acilico nella reazione di crosslinking (Groenen *et al.*, 1994).

L'interesse crescente di questa famiglia di enzimi è correlato essenzialmente al fatto che esistono numerose isoforme di TG distribuite in organismi diversi, come i batteri (Kanaji *et al.*, 1993), le piante (Villalobos *et al.*, 2004) gli invertebrati (Singh & Mehta, 1994), i vertebrati inclusi gli anfibi (Zhang & Masui, 1997), i pesci (Yasueda *et al.*, 1994) e gli uccelli (Puszkin & Raghuraman, 1985). Questi enzimi sono stati utilizzati come biocatalizzatori in un ampio *range* di settori commerciali variando dall'industria tessile a quella cosmetica. Inoltre, l'identificazione di tali enzimi come strumenti terapeutici nei confronti di numerose malattie ha determinato, negli ultimi anni, l'incremento di interesse da parte di industrie farmaceutiche e diagnostiche (Collighan *et al.*, 2002). Infatti per il loro coinvolgimento in numerose patologie quali malattie neurodegenerative (Lesort *et al.*, 2000), cancro (Birckbichler, 1977) e malattie autoimmuni, come la celiachia (Dieterich *et al.*, 1997), le TG destano particolare interesse anche nel settore medico.

Inoltre, le TG svolgono importanti ruoli fisiologici all'interno delle cellule come collante biologico (Fesus *et al.*, 1996), interagendo con la matrice cellulare nella stabilizzazione dell'epidermide, dei capelli e, in generale, nel mantenimento dell'integrità tissutale (Gentile *et al.*, 1992; Greenberg *et al.*, 1991). In particolare, è risultata interessante come collante biologico la TG tissutale che, più recentemente, è stata utilizzata come proteina per l'adesione di cellule nuove per rivestire impianti medici (Griffin *et al.*, 2002).

Le TG possono trovare impiego anche nell'industria dei cosmetici. Infatti tali enzimi possono essere utilizzati per incorporare nella pelle antimicrobici, agenti antinfiammatori, antiossidanti, agenti coloranti, profumi e repellenti per insetti ed inoltre possono essere impiegati per proteggere dalle radiazioni UV (Bailey *et al.*, 1996). Recentemente, inoltre, ha suscitato attenzione l'utilizzo delle TG nelle industrie tessili e del pellame. Il trattamento di tessuti di lana con le TG ha riportato infatti un incremento nella qualità del capo finito (Collighan *et al.*, 2002). La lana risulta, infatti, più resistente, più morbida, di aspetto migliore, e ne viene ridotta la tendenza ad infeltrire, ne aumenta il candore e la capacità di assumere coloranti (Winkler & McDevitt, 1999).

Non va dimenticato che l'impiego degli enzimi quali strumenti biotecnologici rappresenta, da tempo, un argomento di notevole interesse che coinvolge diversi settori anche dell'industria agro-alimentare. In tale settore, l'interesse crescente per

le TG è legato, senza alcun dubbio, alla loro capacità di modificare la componente proteica degli alimenti. Le proteine modificate dalle TG possono contribuire, infatti, a migliorare la consistenza e le proprietà reologiche degli alimenti che le contengono o, ancora, a modificarne la solubilità e le proprietà emulsionanti. Inoltre, la reazione di transglutaminazione può avere un effetto protettivo per la lisina dalla reazione di Maillard o arricchire la componente proteica di determinati alimenti mediante incorporazione covalente di proteine ad alto valore nutrizionale (Nielsen, 1995; Zhu *et al.*, 1995).

L'uso di alcune isoforme di TG è stato proposto in campo biotecnologico non solo per la loro specificità di substrato ma anche per il fatto che esse possono essere manipolate più facilmente all'esterno del loro ambiente naturale. Ad esempio la TG da cheratinociti (TG_K) che è attivata previa modificazione post-trascrizionale (Chakravarty *et al.*, 1989), non è stata mai utilizzata come strumento biotecnologico ma, dal momento che è coinvolta nella fase terminale del differenziamento dei cheratinociti (Griffin *et al.*, 2002), è stata proposta solamente in campo biomedico come possibile *target* per la terapia genica per la cura della ittiosi lamellare (Huber *et al.*, 1995). Anche la TG epidemiale (TG_E) necessita di modificazioni post trascrizionali che la trasformino nella forma attiva e analogamente alla TG_K è espressa in fasi diverse della differenziazione delle cellule epidermiali, catalizzando la formazione di "crosslink" tra proteine strutturali e contribuendo quindi alla formazione dello strato corneo dell'epidermide (Aeschlimann & Thomazy, 2000).

Uno dei settori in cui sono utilizzate alcune isoforme di TG è inoltre quello biomedico; tra queste ricordiamo il Fattore XIII e la TG tissutale. Il Fattore XIII è di origine extracellulare ed è una delle forme di TG meglio caratterizzata. È una proteina plasmatica che consiste di due subunità catalitiche "a" e due subunità stabilizzatrici non catalitiche "b" (Schwartz *et al.*, 1973; Chung *et al.*, 1974). Il Fattore XIII esiste inoltre sotto forma di dimero di sole subunità "a" nelle piastrine, nella placenta, nell'utero, nella prostata e nei macrofagi. Esso è sintetizzato sotto forma di zimogeno e convertito nel sangue in forma attiva dalla trombina in presenza di fibrina e ioni calcio (Lewis *et al.*, 1985; Cook & Holbrook, 1974). Il Fattore XIII è stata la prima TG ad essere utilizzata per la modificazione di proteine e peptidi (Nielsen, 1995) ed è utilizzata come agente terapeutico di numerose patologie dal momento che è implicata nel processo della coagulazione del sangue e della cicatrizzazione dei tessuti (Mikkola & Palotie, 1996). Per quanto riguarda la TG tissutale essa è un monomero di circa 77 kDa largamente distribuito in vari tessuti e cellule di diversa origine (uomo, topo, bue, etc.) che può essere isolato in forma attiva dal citoplasma cellulare (Chung, 1972). Pur possedendo numerosi residui di cisteina e siti potenziali di N-glicosilazione la TG tissutale non contiene ponti disolfurici e non è glicosilata, inoltre l'estremità ammino terminale è bloccata mediante acetilazione (Aeschlimann & Paulsson, 1994). L'attività enzimatica della TG tissutale è regolata da molteplici fattori, essa è infatti attivata dal Ca⁺⁺ che induce un cambiamento conformazionale, mentre è inibita da ioni quali Fe²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺ (Boothe & Folk, 1969; Ambrus *et al.*, 2001; Griffin *et al.*, 2002). Inoltre, sebbene diverse TG mostrino la capacità di legare il GTP, la TG tissutale è l'unica isoforma in grado catalizzarne l'idrolisi (Nakaoka *et al.*, 1994).

Vari sono i ruoli biologici attribuiti alla TG tissutale sia a livello extracellulare che intracellulare. E' stato, infatti, ipotizzato che intervenga nei processi di proliferazione e di differenziamento cellulare (Birckbichler *et al.*, 1978, 1981; Aeschlimann *et al.*, 1996), nei processi di invecchiamento cellulare (Melino & Piacentini, 1998), nell'endocitosi (Levitzi *et al.*, 1980), nello stimolo al rilascio di insulina (Sener *et al.*,

1985), nella morte programmata o apoptosi (Fesus *et al.*, 1987; Melino & Piacentini, 1998), nei fenomeni di adesione cellula-cellula (Akimov *et al.*, 2000), nell'interazione cellula-matrice e nel riparo tissutale (Aeschlimann & Thomazy, 2000).

Oltre ad avere un importante ruolo in fenomeni fisiologici, la TG tissutale è implicata in diversi eventi patologici. Numerose evidenze sperimentali indicano un coinvolgimento della TG tissutale in malattie quali cancro (Darro *et al.*, 1998), infezione dovuta a HIV (Amendola *et al.*, 1996), cirrosi epatica (Kuncio *et al.*, 1998), cataratta (Murthy *et al.*, 1998a) e in vari disordini neurologici come il morbo di Alzheimer (Murthy *et al.*, 1998b). Infine la TG tissutale può essere coinvolta anche nella genesi di diverse patologie di tipo autoimmune (Piacentini & Coalizzi, 1999; Utz & Anderson, 1998). Risale al 1997 la scoperta che la TG tissutale presente nella mucosa intestinale è il principale autoantigene dell'intolleranza al glutine, una patologia di tipo alimentare più comunemente nota come celiachia (Dieterich *et al.*, 1997; Piacentini & Coalizzi, 1999; Utz & Anderson, 1998).

Per quanto riguarda le sue applicazioni, la TG tissutale è stata utilizzata per modificare molecole di interesse farmacologico come, ad esempio, la Sostanza P, un peptide di 11 amminoacidi appartenente alla famiglia delle tachichinine, implicato nella regolazione di molti processi biologici come la vasodilatazione, l'aumento della permeabilità vascolare e la contrazione della muscolatura liscia. È stato dimostrato che l'introduzione di poliammine, ad opera della TG tissutale, sulla glutammina in posizione 5 della Sostanza P produce una riduzione di tali effetti (Mancuso *et al.*, 1994; Esposito *et al.*, 1995).

Un secondo esempio riguarda l'SV-IV, una delle maggiori proteine secrete dell'epitelio delle vescichette seminali di ratto, capace di indurre *in vitro* il rilascio di citochine, sia da cellule mononucleari del sangue periferico umano che da linfociti e monociti isolati. Anche in questo caso, modifiche strutturali di questa proteina ad opera della TG tissutale mediante l'inserimento di poliammine come la spermidina sulle glutammine substrato, riducono il rilascio di alcune citochine abbassando la risposta immunitaria (Tufano *et al.*, 1996; Metafora *et al.*, 1987).

Inoltre, per la particolare affinità della TG tissutale per il collagene, è stato ipotizzato il suo utilizzo nel settore della cosmesi, per aumentare le proprietà emulsionanti di matrici proteiche utilizzate nelle creme (Patent Application JP 58149645, 1982; Patent Application JP 61172807, 1985; Nio *et al.*, 1986a; Nio *et al.*, 1986b).

Un'altra applicazione della TG tissutale è nel campo dell'industria del pellame come strumento per stabilizzare il collagene. In questo caso, l'uso dell'enzima viene proposto per aumentare la resistenza della pelle e anche la flessibilità, permettendo così la riduzione dell'uso del cromo, un agente altamente inquinante (Patent Application JP 208674, 1988; Patent Application JP 4091750, 1990; Patent Application WO 94/13839).

La recente scoperta del coinvolgimento della TG tissutale umana (htTG) nella malattia celiaca, di cui rappresenterebbe il principale auto-antigene (Dieterich *et al.*, 1997) ha contribuito ulteriormente ad aumentare la richiesta di mercato di tale enzima. L'utilità di questa isoforma, infatti, è legata al fatto che la diagnosi della celiachia prevede l'allestimento di test per rivelare la presenza di auto-anticorpi diretti contro la TG tissutale nel siero di pazienti sospettati di possedere essere affetti malattia (Sollid *et al.*, 1997). Le isoforme di TG tissutale utilizzate come antigene nei test clinici di prima generazione sono state la TG tissutale purificata da fegato di cavia (gptTG) commercialmente disponibile e la TG tissutale umana (htTG) ricombinante prodotta in *E.coli*. Tuttavia, recentemente, tali isoforme sono state sostituite dalla htTG ricombinate prodotta in cellule di insetto (Osman *et al.*, 2002;

Schmitt, 2003). Infatti, è stato dimostrato che la sensibilità e la specificità dei test clinici condotti utilizzando la htTG prodotta in un sistema eucariotico risultano notevolmente aumentate (Blackwell *et al.*, 2002; Sorrentino *et al.*, *in corso di stampa*).

Una TG simile alla tissutale è stata ritrovata nel fegato di un vertebrato marino tipico del Mar Rosso, *Pagrus major*, (Fish-derived TG, FTG; Yasueda *et al.*, 1994), anche se non è ancora conosciuta la sua funzione biologica. È noto, comunque, che la FTG svolge un ruolo fondamentale per la formazione di gel nella carne tritata di pesce (Noguchi *et al.*, 2001). Recentemente ne è stata determinata la struttura tridimensionale (Noguchi *et al.*, 2001); essa è uno zimogeno e consiste di 4 domini il cui sito attivo è simile a quello del Fattore XIII, ma presenta significative differenze nella struttura superficiale e nella distribuzione di cariche intorno ai siti di legame acil-donatori (Noguchi *et al.*, 2001).

Le TG sono state ritrovate non solo nei tessuti dei mammiferi, nei pesci e nelle piante (Muszbek *et al.*, 1999), ma anche in alcuni microrganismi. La prima TG microbica caratterizzata fu quella da Attinomicete (Ando *et al.*, 1989) e a partire da essa sono stati realizzati processi per ottenere una grossa quantità di enzima per applicazioni commerciali (Gerber *et al.*, 1994).

Una nuova forma di TG microbica è stata isolata recentemente da *Bacillus circulans* presente nell'ambiente acquatico dell'Amazzonia (de Barros Soares *et al.*, 2003). Essa presenta un peso molecolare di 45 kDa, un punto isoelettrico pari a 6.3, temperatura e pH ottimali rispettivamente di 47°C e 7.0, differentemente dalla forma di TG isolata da *Bacillus subtilis*, che presenta una temperatura ottimale di 60°C ed un pH di 8.2, inoltre, la sua attività è Ca²⁺ indipendente (Suzuki *et al.*, 2000).

Una isoforma di TG che non richiede calcio per esplicare la propria attività è stata isolata anche da colture di *Streptovorticillium* (mTG). Questa caratteristica rende questa isoforma di origine microbica differente dalle altre TG di origine animale, sebbene presenti nel sito attivo un residuo di cisteina fondamentale per l'attività catalitica (Ando *et al.*, 1989). L'analisi della sequenza amminoacidica condotta attraverso la degradazione di Edman del ceppo S-8112, identificato come una variante di *Streptovorticillium mobaraense* (Washizu *et al.*, 1994), ha rivelato una proteina di 331 amminoacidi, di peso molecolare pari a 37.9 kDa (Kanaji *et al.*, 1993). Le informazioni riguardanti il ruolo fisiologico svolto da tale enzima non sono chiare, anche se è stato ipotizzato il suo coinvolgimento nella differenziazione cellulare e nello sviluppo miceliare (Pasternack *et al.*, 1998).

Oltre all'indipendenza dal calcio, una caratteristica importante per questa forma di TG è rappresentata dal fatto che è attiva in un ampio *range* di pH con una stabilità a pH compreso tra 5 e 9 (Yokoyama *et al.*, 2004). Inoltre possiede una notevole stabilità termica e raggiunge il massimo dell'attività ad una temperatura compresa fra i 50 ed i 55 °C (Yokoyama *et al.*, 2004). Le caratteristiche sopra descritte, unitamente all'ampia specificità di substrato e la scarsa capacità deamidativa, rappresentano prerequisiti indispensabili e non trascurabili per un'applicazione dell'enzima a livello industriale e soprattutto nel campo agro-alimentare (Kashiwagi *et al.*, 2002). L'Ajinomoto Inc. produce svariate preparazioni di mTG che sono commercializzate sotto diversi nomi che cambiano a seconda del tipo di stabilizzante utilizzato. Ad esempio, l'Activa WM (utilizzata per il presente progetto sperimentale) viene usata principalmente per migliorare la consistenza e le caratteristiche reologiche di alimenti a base di carne (Kuraishi *et al.*, 1997) e per lo sviluppo di nuovi prodotti caseari (Cozzolino *et al.*, 2003); mentre l'Activa MP viene proposta per modificare alimenti a base di proteine del latte come formaggio e yogurt. In accordo con la legislazione

europea (Direttiva 89/107/EC), l'Ajinomoto dichiara che la mTG può essere considerata come un coadiuvante nel processo di lavorazione degli alimenti e per tale ragione la sua presenza non deve essere indicata sull'etichetta del prodotto finito.

L'interesse per l'enzima nel campo biotecnologico è dato dalla possibilità di disporre di grosse quantità di enzima a bassi costi (Kashiwagi *et al.*, 2002). Le principali applicazioni della mTG sono riportate in Tabella 1.

Substrati	Prodotti Principali	Effetti
Carne	Hamburger; ravioli ripieni; carne in scatola; Carne congelata	Elasticità, struttura e aroma migliori, shelflife prolungata
Pesce	Colla di pesce	Aspetto e texture migliori
Grano	Prodotti da forno	Texture migliore e aumento del volume
Soia	<i>Tofu</i>	Texture migliore, shelflife prolungata
Vegetali e Frutta	Acceleranti per l'assorbimento di sostanze minerali	Stimola l'assorbimento di minerali nell'intestino
Grassi; olio; proteine	Grassi solidi	Sostituenti del maiale con texture, sapore e aroma eccellenti
Proteine vegetali	Proteine liofilizzate	Formazione di gel con buona texture e buon sapore
Proteine del latte	Latte e prodotti caseari	Viscosità aumentata, valore nutrizionale aggiunto
Gel proteici	Gel proteici	Intensità migliore
Gelatina	Matrice proteica legata covalentemente, dolci	Riduzione di allergenicità, alimenti con un contenuto ridotto di calorie con migliore texture ed elasticità

Tabella 1. - Principali applicazioni della mTG (Modificata da Zhu et al., 1995)

La modificazione strutturale indotta dalla mTG potrebbe condurre ad un miglioramento della consistenza di particolari prodotti, proteggere la lisina da reazioni quali quella di Maillard, produrre proteine alimentari ad elevato valore nutrizionale attraverso la reticolazione di differenti proteine contenenti amminoacidi essenziali, modificare la solubilità o le proprietà emulsionanti di determinate proteine (Matheis & Whitaker, 1987; Kitabatake & Doi, 1993; Motoki & Seguro, 1994). La formazione di legami isopeptidici crociati, indotta dall'intervento dell'enzima, potrebbe inoltre essere utilizzata per potenziare alcune caratteristiche delle proteine quali la coesività e l'adesività, rendendole substrati idonei nei più disparati processi di lavorazione (Kang *et al.*, 1994). Nel settore agro-alimentare l'uso della mTG è proposto per modificare le proprietà funzionali delle proteine substrato di interesse alimentare. Ad esempio la mTG è aggiunta come additivo ai pezzi di carne, affinché questi non si disgreghino durante la cottura (Kutraishi *et al.*, 1997) ed è utilizzato per migliorare le proprietà reologiche, quali la consistenza e la compattezza di salami, di pasta di pesce e del tofu, il principale alimento della popolazione asiatica a base di soia (Zhu *et al.*, 1995; Kuraishi *et al.*, 2001). Molti sono i brevetti fino ad ora depositati per il possibile impiego della TG da *Streptoverticillium* nell'industria casearia, per la produzione di yogurt (Nonaka *et al.*, 1992; Patent Application France n° 8102463) e nell'industria ittica, per la produzione gelatine a base di pesce, e di surimi, la cui aggiunta ne migliora l'elasticità (Patent Application Japan JP 6261712, 1993; Sakamoto, 1994). Recentemente inoltre sono stati ottenuti formaggi con un contenuto maggiore di proteine del siero aggiungendo la mTG durante il processo di lavorazione (Cozzolino *et al.*, 2003). Lo sviluppo di questo tipo di prodotto risulta di estrema importanza dal momento che non solo si ottengono formaggi con un valore nutrizionale aggiunto ma in questo modo si riduce anche l'inquinamento ambientale dovuto all'eccessiva quantità di siero refluo.

Per ultimo si sottolinea il potenziale impiego di proteine modificate dalla mTG per la sintesi di film idrocolloidi a composizione mista da impiegare in diversi settori, da quello alimentare a quello agronomico. Infatti il crescente interesse dei consumatori sulle problematiche ambientali rende conto del notevole interesse della ricerca verso la sintesi di nuovi materiali polimerici che non soltanto possano soddisfare i bisogni dei consumatori, ma essere al tempo stesso economicamente sostenibili e capaci di ridurre, in maniera significativa, i rifiuti da imballaggio.

I film idrocolloidi sono costituiti da proteine, polisaccaridi o alginati (Donhowe & Fennema, 1994). e normalmente le interazioni che stabilizzano la struttura di tali film possono essere legami idrogeno, interazioni elettrostatiche e dipolo-dipolo, interazioni idrofobiche o legami covalenti come ponti disolfuro (Whitaker, 1977a; Damodaran and Kinsella, 1982). Queste interazioni, però, possono essere facilmente distrutte da cambiamenti di pH, aggiunta di sali o solventi e trattamenti al calore (Cheftel *et al.*, 1985). Per questo motivo i film che derivano da queste instabili strutture presentano discutibili proprietà barriera e meccaniche.

Per migliorare le proprietà di tali film sono state svolte numerose ricerche che avevano come obiettivo la realizzazione di strutture più stabili mediante la formazione di legami covalenti ad opera di agenti chimici o enzimatici (Whitaker, 1977b; Whitaker & Puigserver, 1982; Matheis & Whitaker, 1987; Feeney & Whitaker, 1988). Negli ultimi anni, l'uso di enzimi come strumento biotecnologico per stabilizzare la matrice polimerica di questi film è andato sempre più crescendo. L'utilizzo degli enzimi, infatti, comporta notevoli vantaggi dovuti essenzialmente a due proprietà intrinseche: la capacità di innalzare di diversi ordini di grandezza la velocità di specifiche reazioni (particolarmente significativa laddove si evidenzia che

la catalisi enzimatica avviene spesso in condizioni restrittive) e la specificità di substrato. In quest'ultimo caso, la necessità che il substrato possieda una precisa conformazione conferisce all'enzima un certo grado di selettività, non altrimenti ottenibile con i metodi chimici.

Differenti enzimi, avendo diversi livelli di specificità, possono, se usati correttamente, ridurre eventuali interferenze e minimizzare la quantità di prodotti indesiderati. Bisogna, però, considerare che proprio le caratteristiche molecolari, tipiche di ogni enzima, fanno sì che ognuno di essi operi in specifiche condizioni di pH, temperatura e forza ionica. Condizioni che, sebbene restrittive, vanno rispettate per non incorrere in problemi di denaturazione, inibizione irreversibile, degradazione enzimatica. Da non dimenticare, inoltre, il fattore costo fortemente condizionato dalla quantità di enzima richiesto per la bioconversione di un dato quantitativo di substrato.

Gli enzimi più utilizzati come agenti reticolanti per la realizzazione dei film sono rappresentati dalle lipossigenasi, la lisina ossidasi, la fenolo ossidasi, la perossidasi (Michon *et al.*, 1999) oltre alla mTG su cui è stato focalizzato lo studio riportato in questa tesi.

Tra i polisaccaridi comunemente utilizzati per la sintesi di questi tipi di film annoveriamo la cellulosa e i suoi derivati, l'amido e suoi derivati, gli alginati, le pectine (Kester & Fennema, 1986; Krochta and De Mulder-Johnston, 1997); inoltre recentemente si sta diffondendo l'uso di film idrocolloidi a base di purea di frutta (McHugh *et al.*, 1996; McHugh & Senesi, 2000). Come fonte proteica sono, invece, normalmente usate le proteine della soia, del grano, del riso, del mais e del siero del latte (Krochta *et al.*, 1988; Aydt *et al.*, 1991; Mahmoud & Savello, 1992; Park *et al.*, 1994; Shih, 1996).

Le pectine sono sempre state alla base dell'alimentazione dell'uomo, esse sono diffuse nelle matrici alimentari di tutto il mondo. Sono riconosciute dalla FAO/WHO come additivi alimentari senza alcun limite di accettabilità giornaliera (FAO, 1969). La funzionalità di tali molecole è determinata da un gran numero di fattori, incluso il grado di carbossilazione e il peso molecolare variabile tra 50.000 e 200.000 Dalton (Thakur *et al.*, 1997). Si distinguono per la loro capacità di prevenire la disidratazione degli alimenti con cui vengono a contatto e per le proprietà addensanti, strutturanti, emulsionanti e stabilizzanti (Thakur *et al.*, 1997). Le pectine, caratterizzano i primi strati della parete e della sostanza intercellulare (lamella mediana) che cementa le pareti di cellule contigue nelle dicotiledoni e, in misura minore, nelle monocotiledoni, mentre possono mancare completamente negli stati di parete che si formano successivamente (Waldron, *et al.*, 1997). Le pectine sono polimeri di acido α -D-galatturonico legati da legami 1 \rightarrow 4 parzialmente esterificati con metanolo (MacDougall *et al.* 1996). Esse si differenziano per il loro grado di esterificazione (fondamentale per le proprietà filmanti e solubilizzanti). Se il grado di esterificazione è superiore al 50% si parla di pectine "alto-metossile", se inferiore "basso-metossile". Le pectine alto-metossile richiedono una certa quantità di solidi solubili ed un pH compreso fra 2.8 e 3.7 per formare film; le pectine a basso-metossile, invece, richiedono la presenza di una certa quantità di calcio, mentre l'ambiente acido non influenza la loro capacità di gelificazione (Thakur *et al.*, 1997). Le caratteristiche presentate dalle pectine destano particolare interesse per un'applicazione dei film idrocolloidi a composizione mista da utilizzare in campo alimentare come film edibili. La crescente attenzione verso l'utilizzo di questi materiali è stata infatti richiamata dalle recenti scoperte sulla nocività di alcune pellicole a base di polimeri sintetici, in particolare quelli derivati dal cloro. Questi polimeri sono sottoposti ad un ciclo di lavorazione che risulta essere ad alto impatto sia dal punto di

vista ambientale che sanitario (Ding *et al.*, 1997; Mulder, 1998). In particolare, è stata chiaramente dimostrata la tossicità delle pellicole a base di polivinilcloruro (pvc) (Giri, 1995). Tali film, comunemente impiegati per conservare cibi a basse temperature, contengono quantità considerevoli di ftalati, additivi chimici che vengono normalmente usati per ammorbidire il pvc, di cui sono stati ben documentati gli effetti dannosi sul fegato e sui reni (Ardeberg, 1998; Ohlson *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2001). Questi problemi accrescono ulteriormente l'interesse scientifico verso i film edibili che risultano essere meno pericolosi sia per la salute che per l'ambiente.

Per quanto detto, è sembrato particolarmente interessante affrontare in questa tesi lo studio di film a composizione idrocolloidale mista, formati cioè da carboidrati e proteine. In un primo momento sono state scelte come sorgente glucidica macromolecole modello quali le pectine di mela, note per le loro proprietà filmanti (Thakur *et al.*, 1997) e come fonte proteica le proteine della soia (Mariniello *et al.*, 2003), modificate e non dalla mTG.

Successivamente inoltre le pectine di mela, di origine commerciale, sono state sostituite direttamente da omogenati di frutta e/o verdura provenienti dallo scarto di prodotti destinati sia al consumo fresco che alla trasformazione industriale in modo tale da trasformare tali "waste" ad alto impatto ambientale in materie prime per ulteriori processi di trasformazione biotecnologici. In particolare in questo progetto di tesi sono stati utilizzati scarti provenienti dal finocchio.

Il finocchio (dal latino feniculum, diminutivo di fenum, fieno) appartiene alla specie di piante della famiglia delle Ombrellifere (Piccaglia *et al.*, 2001). Il nome di finocchio viene dato in particolare ad alcune varietà del *Foeniculum vulgare*, specie collettiva originaria delle regioni mediterranee e della quale fanno parte razze selvatiche, bienni o perenni, e razze coltivate, annue. Le cultivar più importanti sono *sativum* (o finocchio domestico), coltivato per i semi fortemente aromatici e ricchi di oli essenziali, dai quali si estrae un olio che viene utilizzato anche in farmacopea, cedrato (*piperitum*) si coltiva generalmente per utilizzarne le infiorescenze come condimento specialmente nell'industria conserviera ed infine *dulce*, di cui si consumano le grosse guaine fogliari che costituiscono il grumolo (Piccaglia *et al.*, 2001). Questa ultima, utilizzata nel presente progetto, è la varietà ortense di gran lunga più importante dal punto di vista commerciale ed è quella che si suole indicare comunemente quando si parla di finocchio. Il finocchio è una pianta indigena del mediterraneo ed in Italia viene coltivata fin dai tempi antichi. L'Italia (la Campania è la regione dove se ne produce maggiormente) ne produce circa l'85 % della produzione mondiale ma una parte cospicua (~30%) di questa produzione è rappresentata da scarti.

Attualmente a causa dell'aumentato inquinamento ambientale, c'è una forte sensibilizzazione al riciclo dei rifiuti organici ed in particolare al riciclo degli scarti provenienti dal settore ortofrutticolo. Sono molti infatti gli esempi di utilizzo di *by-products* per estrazione di sostanze funzionali (Schieber *et al.*, 2001); tali sostanze sono ritenute molto utili non solo perchè possono rientrare a far parte di ulteriori processi di lavorazione, ma anche perchè contengono molecole essenziali note per avere effetti benefici sulla salute umana (Schieber *et al.*, 2001). Ricordiamo ad esempio che dai semi e dalle bucce degli agrumi (Bocco *et al.*, 1998), così come dalle bucce delle mele (Lu & Foo, 1997) si possono estrarre un gran numero di flavonoidi, aventi attività antiossidante. Anche dalla buccia dell'uva si possono estrarre importanti sostanze, come ad esempio etanolo, antociani ed oli essenziali (Mazza, 1995). Inoltre dagli scarti delle Brassicaceae, del carciofo e della cicoria è

possibile ottenere sia molecole dall'attività antitumorale che fibre, utilizzate per l'alimentazione umana e/o animale (Femenia *et al.*, 1998).

Pertanto alla luce di quanto è stato detto, parte dei film prodotti in questo progetto sperimentale sono stati ottenuti utilizzando come sorgente glucidica non solo gli omogenati grezzi provenienti dagli scarti del finocchio, ma, dopo averne determinato le proprietà filmanti, anche le pectine estratte da tali scarti. Inoltre come sorgenti proteiche oltre alle proteine presenti *in toto* nella farina estratta dai semi di soia, note per essere un substrato elettivo per la mTG (Babiker *et al.*, 1996; Mariniello *et al.*, 2003), è stata utilizzata anche la faseolina, precedentemente estratta dai semi del fagiolo comune (*Phaseolus vulgaris*). La faseolina e le proteine della famiglia delle lectine appartengono alle viciline (globuline 7S) e rappresentano la frazione principale delle proteine del seme nel fagiolo (Lawrence *et al.* 1994). In particolare la faseolina costituisce il 36-46 % delle proteine del seme del fagiolo comune. Sia le proteine della soia che la faseolina sono proteine globulari, e quindi capaci di formare complessi e coacervati con i polisaccaridi (Keim & Hinrichs, 2004; Famelart *et al.*, 2004; Trckova *et al.*, 2004). Tra l'altro la faseolina, così come proteine presenti nei semi di altri legumi (Moraes *et al.*, 2000) ha attività *anti-feeding* nei confronti di larve della specie "curculionide", ritenute molto dannose per l'agricoltura (Yunes *et al.* 1998). Questo aspetto desta particolare interesse alla luce di un utilizzo di tali film in campo agronomico.

I film così prodotti sono stati sottoposti a studi di caratterizzazione chimico-fisica e di attitudine tecnologica, studi che hanno confermato che la presenza di proteine modificate dalla mTG aumenta le proprietà reologiche dei film stessi creando un materiale con una reticolazione più omogenea e resistente.

MATERIALI E METODI

MATERIALI

I reattivi chimici utilizzati per il lavoro sperimentale di questa tesi sono stati acquistati presso le seguenti compagnie: Amersham Pharmacia (Svezia), Merck (Italia), Roche (Germania). La farina di semi di soia di tipo I e le pectine di mela USP sono state acquistate dalla SIGMA.

La transglutaminasi da *Streptovercillium mobaraens* è stata acquistata alla Prodotti Gianni S.p.A. Milano, Italy. L'acrilammide è stata acquistata alla Biorad.

I film Mater Bi[®], costituiti da amido e poliesteri biodegradabili, sono stati acquistati dalla Novamont Spa (Italia), mentre i campioni ad alta densità di polietilene (HDPE) derivano dai comuni sacchetti di plastica.

METODI

PREPARAZIONE DELLA TRANSGLUTAMINASI MICROBICA (mTG)

L'enzima è stato preparato dissolvendo la preparazione commerciale in acqua distillata in una concentrazione finale pari a 180 mg/ml. L'attività specifica della preparazione enzimatica è di 45 U/ml ed è stata determinata usando la seguente procedura: 10, 20, 40, 80 µg di enzima sono stati incubati in 100 µl di 125 mM di Tris-HCl, pH 7.5, in presenza di 200 µg di N,N-dimetilcaseina e 6.5 pmoli [³H] di spermidina, la cui attività specifica è 15.3 nCi / pmol, per 1 h a 37 °C.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI PROTEINE DA FARINA DI SEMI DI SOIA

5 g di farina erano sospesi in 50 ml di H₂O e centrifugati a 13000×g per 30 minuti ad una temperatura di 4 °C. Il surnatante veniva prelevato, e se ne determinava la concentrazione proteica.

PREPARAZIONE DELLE PECTINE DI MELA

8 g di liofilizzato di pectine di mela erano solubilizzati in H₂O in un volume finale di 500 ml a pH 4.5 per aggiunta di HCl 3 N. La soluzione era riscaldata a 70 °C e sottoposta in agitazione per 1 ora.

PREPARAZIONE DEGLI OMOGENATI DI FINOCCHIO

Gli scarti provenienti dal finocchio sono stati tagliati in cubetti di circa 1 cm³ e bolliti in acqua (500 ml di acqua per ogni 500 grammi di finocchi) per 30 minuti. Il materiale così ottenuto veniva trattato con una comune centrifuga da cucina (Centrika, Ariete) che separa, mediante setaccio di 200 µm, una parte fibrosa, ed una parte più fluida utilizzata per la preparazione dei film. La quantità da utilizzare per la preparazione dei film è stata determinata utilizzando il residuo secco degli omogenati ottenuti.

Per determinare il residuo secco 1 ml del campione veniva posto in una capsula di porcellana, precedentemente portata a peso costante (P_0), in una stufa a 100 °C per 1h. Trascorso tale tempo, la capsula veniva raffreddata in un incubatore per 15 min e quindi pesata (P_1). Il residuo secco (P_c) veniva calcolato secondo la formula:

$$P_c = P_1 - P_0$$

CARATTERIZZAZIONE DELLE PECTINE DA FINOCCHIO

Estrazione delle pectine

Le parti esterne del finocchio sono state tagliate in cubetti di circa 1 cm³. I cubetti ottenuti sono stati messi in azoto liquido e quindi ridotti in polvere sottilissima mediante il Freezer/Mill (Spex, Certiprep). La polvere ottenuta è stata risospesa in 5 litri di acqua portata a pH 1.5 con HCl 6 N. La soluzione è stata bollita per 2 ore, velocemente raffreddata in ghiaccio e portata a pH 4.5 con NaOH 2 N. Quindi la soluzione è stata centrifugata per 10 minuti a 10000×g.

Il surnatante è stato filtrato attraverso filtri GF/C (Millipore, Bedford, MA, USA), dializzato esaustivamente contro acqua distillata, e, quindi, liofilizzato.

Idrolisi delle pectine

L'idrolisi delle pectine estratte è stata così eseguita: sono stati aggiunti a 4 mg di campione 0.5 ml 2 M di acido trifluoroacetico (TFA). La soluzione è stata incubata a 120 °C per 2 ore, quindi il solvente è stato allontanato utilizzando vapori d'idrogeno ad una temperatura di 50 °C. 0.5 ml di toluene sono stati aggiunti ed evaporati per rimuovere i residui di TFA. Questa ultima procedura è stata ripetuta 2 volte.

Riduzione dei monosaccaridi

Effettuata l'idrolisi delle pectine, si è proseguiti alla riduzione degli zuccheri in alditolo acetato. 300 mg di sodio tetraidroborato sono stati sciolti in 2 ml di NH₃ 3 M. 200 µl di 2-deossiglucosio (1 mg/ml) sono stati aggiunti alla soluzione. Quindi sono stati aggiunti 300 µl di NH₃ 25% e 100 µl di NaBH₄ (in questa fase è stato importante accertare che il pH della soluzione fosse alcalino, onde evitare la decomposizione del NaBH₄). Dopo aver incubato a 30 °C per 1 ora, immediatamente i campioni sono stati posti in ghiaccio. Per eliminare il riducente in eccesso, sono stati aggiunti 100 µl di acido acetico glaciale.

I monosaccaridi così ridotti sono stati acetilati utilizzando 3 ml di anidride acetica. Come catalizzatore di questa reazione si sono utilizzati 450 µl di metimidazolo. Quindi si procedeva alla gas cromatografia (GC) degli zuccheri resi volatili dalla reazione di acetilazione (Henry *et al.*, 1983) (Selvendran *et al.*, 1979), utilizzando una colonna BP5 (SGE, Ringwood, Australia), di dimensioni 25 m × 0.32 mm.

Contenuto di acidi uronici e grado di esterificazione delle pectine

Il contenuto di acidi uronici è stato determinato mediante analisi colorimetrica utilizzando il metodo modificato di Blumenkrants & Asboe-Hansen (1973).

Il grado di metil esterificazione è stato determinato mediante analisi di spazio di testa dopo rilascio di metanolo con alcali (MacDougall *et al.*, 2001a). Il saggio è stato allestito in un volume finale di 2 ml contenente pectine, 1 μ mole di propanolo, usata come standard interno ed idrossido di sodio 1 N. La soluzione era incubata per 2 ore a temperatura ambiente quindi lo spazio di testa era analizzato mediante gas cromatografia utilizzando una colonna BP5 (SGE, Ringwood, Australia), di dimensioni 25 m \times 0.32 mm.

Viscosità delle pectine

La viscosità intrinseca delle pectine è stata determinata utilizzando un viscosimetro capillare Standard Ostwald.

I polisaccaridi sono stati dispersi in una soluzione di tampone acetato 50 mM pH 5.7, effettuando diluizioni da 0.3 a 1 g/L. Il viscosimetro era termostato ad una temperatura di 25 $^{\circ}$ C \pm 0.1 $^{\circ}$ C in un bagnetto ad acqua. La viscosità intrinseca $[\eta]$ era calcolata mediante estrapolazione della misura della viscosità specifica ad un valore di concentrazione zero.

ESTRAZIONE DELLA FASEOLINA DA *PHASEOLUS VULGARIS*

Per l'estrazione della faseolina dai semi del fagiolo comune (*Phaseolus vulgaris*) è stato utilizzato il protocollo modificato di Romero *et al.* (1975) e Sun & Hall (1975).

Prima di iniziare l'estrazione della faseolina, si procedeva alla rimozione dell'esosperma dai semi e i due cotiledoni erano separati con un bisturi. 5 g di cotiledoni (peso fresco) sono stati triturati in mortai di porcellana con fondo ruvido, fino ad ottenere una polvere uniforme. La polvere così ottenuta è stata risospesa in un volume di estrazione (0.5 M NaCl, 0.25 M acido ascorbico, pH 2.4) fino ad ottenere approssimativamente 0.2 g di cotiledoni per ml di tampone di estrazione. La soluzione ottenuta è stata incubata al buio in agitazione per 1 ora, quindi centrifugata a 17000 \times g per 20 minuti. Per ottenere la massima resa della proteina il passaggio precedente è stato ripetuto 2 volte. Dopo ogni centrifugazione, il surnatante è stato versato in tubi più grandi. Dopo la terza centrifugazione venivano aggiunti cinque volumi di acqua (che induce la precipitazione della faseolina) ad ogni tubo e si incubava a 4 $^{\circ}$ C per 30 minuti. Quindi la soluzione era centrifugata a 13000 \times g per 20 minuti. Il precipitato era poi risospeso in 100 ml di NaCl 0.5 M e liofilizzato.

La determinazione della concentrazione proteica è stata eseguita con il metodo Bradford (Bradford, 1976) utilizzando l'albumina di siero bovino come proteina standard.

SAGGIO DI POLIMERIZZAZIONE

Al fine di valutare la capacità dell'enzima di promuovere la formazione di polimeri, le proteine presenti nella farina estratta dai semi di soia (50 μ g) o la faseolina (20 μ g) estratta da *Phaseolus vulgaris* erano incubate in presenza di mTG a 37 $^{\circ}$ C per 2 h in

presenza di tampone Tris-HCl 125 mM, pH 7.5 in un volume finale di 200 μ l. Le quantità di enzima utilizzate consistevano in 0.1 μ g per le proteine della soia (rapporto soia:enzima pari a 100 :1) e 0.033 μ g per la faseolina (rapporto faseolina:enzima pari a 600:1). Le prove controllo erano preparate in assenza di enzima.

La reazione era bloccata con l'aggiunta di 29 μ l di tampone di Laemmli 8 \times (SDS 10 %, glicerolo 10 %, β -mercaptoetanololo 5 % e blu di bromofenolo 0.1 %).

Gli estratti proteici erano quindi bolliti per 5 minuti e le proteine erano separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 12% contenente SDS 0.1% (SDS-PAGE, Laemmli 1970). L'analisi elettroforetica era condotta per 120 minuti ad una differenza di potenziale costante di 80 V. Quindi si procedeva alla colorazione con Coomassie Blue Brilliant.

PREPARAZIONE DEI FILM

Preparazione dei film utilizzando pectine di mela di origine commerciale e proteine della soia

Una soluzione acquosa di proteine di soia (13 mg/ml) era portata a pH 9 utilizzando NaOH 2 N. Le pectine di mela erano dissolte in acqua ad una concentrazione di 16 mg/ml. Per ottenere film con un rapporto desiderato di ciascun componente, differenti volumi di proteine della soia erano miscelate alle pectine. Le soluzioni, dopo aggiunta di 4 μ g di enzima erano degassate sotto vuoto ed infine stratificate in piastre Petri di dimensioni di 60 \times 15 mm².

L'essiccamento veniva eseguito per 24 ore a temperatura ambiente sotto cappa chimica.

Al termine i film erano asportati dalle piastre.

Preparazione dei film utilizzando omogenati di finocchio e proteine della soia

25 ml di omogenato di finocchio, preparato come descritto precedentemente, corrispondenti a 3175 mg erano miscelati a 108 mg di proteine della soia in presenza ed in assenza di 1 mg di mTG. La soluzione ottenuta era quindi stratificata in piastre Petri di dimensioni di 60 \times 15 mm².

L'essiccamento veniva eseguito per 24 ore a temperatura ambiente sotto cappa chimica.

Preparazione dei film utilizzando pectine estratte da finocchio e faseolina

I film erano preparati disperdendo le pectine precedentemente liofilizzate in acqua ad una concentrazione di 8 mg/ml e miscelando con un magnete fin quando non si otteneva una soluzione limpida.

Per ottenere film con la desiderata quantità di ogni componente, differenti volumi delle soluzioni contenenti faseolina sono state miscelate alle pectine. La soluzione ottenuta era infine stratificata su una piastra Petri di dimensioni 60 \times 15 mm². L'essiccamento veniva eseguito per 24 ore a temperatura ambiente sotto cappa chimica.

MISURAZIONE DELLO SPESSORE DEI FILM

Lo spessore dei film veniva misurato con un micrometro (Metrocontrol Srl, Casoria (Na), Italia) modello H062 avente sensibilità di $\pm 2 \mu\text{m}$, effettuando le letture in 10 punti casuali e mediando i valori ottenuti.

Le misure sono state eseguite equilibrando i film al 100% di umidità relativa per 1 ora.

PERMEABILITÀ AL VAPORE ACQUEO

La permeabilità dei film è stata stimata con il metodo gravimetrico American Society for Testing Materials (ASTM E96) (1993) utilizzando le Fisher/Payne permeability cup (Carlo Erba, Italy). In ogni capsula sono stati introdotti 3 g di silica gel, sopra sono stati adagiati i campioni di film con diametro di 6 cm serrati da un anello mantenuto fermo da tre morsetti. La superficie dei film esposta alla trasmissione di vapore era di 10 cm^2 . Le capsule contenenti silica gel sono state pesate e poi adagate in un essiccatore contenente una soluzione satura di KCl che fornisce una attività dell'acqua a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ equivalente a 0.8434. L'essiccatore è stato depositato in un incubatore termostato Heareus a $25.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$. Le capsule sono state pesate ad intervalli di 24 h fino a quando non si raggiunge un incremento di peso costante.

L'ammontare della quantità di vapore acqueo trasmesso attraverso il film è stato stimato usando la porzione lineare del diagramma ottenuto dall'interpolazione dell'incremento di peso delle capsule in funzione del tempo.

La permeabilità al vapore acqueo è stata calcolata dall'equazione \square

$$\text{WVP} = X / (A \Delta p) \text{ dm/dt}$$

Dove dm/dt rappresentava la pendenza della retta, X è lo spessore del film, A è l'area del film esposta e Δp è la pressione di vapore imposta al film. Assumendo che la pressione di vapore all'interno della capsula, per la presenza di silica gel, sia zero, Δp diviene uguale alla pressione di vapore all'interno dell'essiccatore fissato dal prodotto dell'attività dell'acqua per la pressione di vapore P_0 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ($P_0 = 3.167 \text{ KPa}$).

PERMEABILITÀ ALL'OSSIGENO ED ALL'ANIDRIDE CARBONICA

La permeabilità dei film all'ossigeno ed all'anidride carbonica è stata esaminata ad una temperatura di $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e ad una umidità relativa pari a 0% utilizzando un metodo monometrico schematizzato in figura 4.

Il campione era posto in una cella alla cui estremità veniva applicata una differenza di pressione: la camera "A" (dalla parte superiore della cella a trasmissione di gas alla valvola "H") costituiva una zona ad alta pressione, mentre la camera "B" (dalla parte inferiore della cella a trasmissione di gas alla valvola "C") costituiva una zona a bassa pressione.

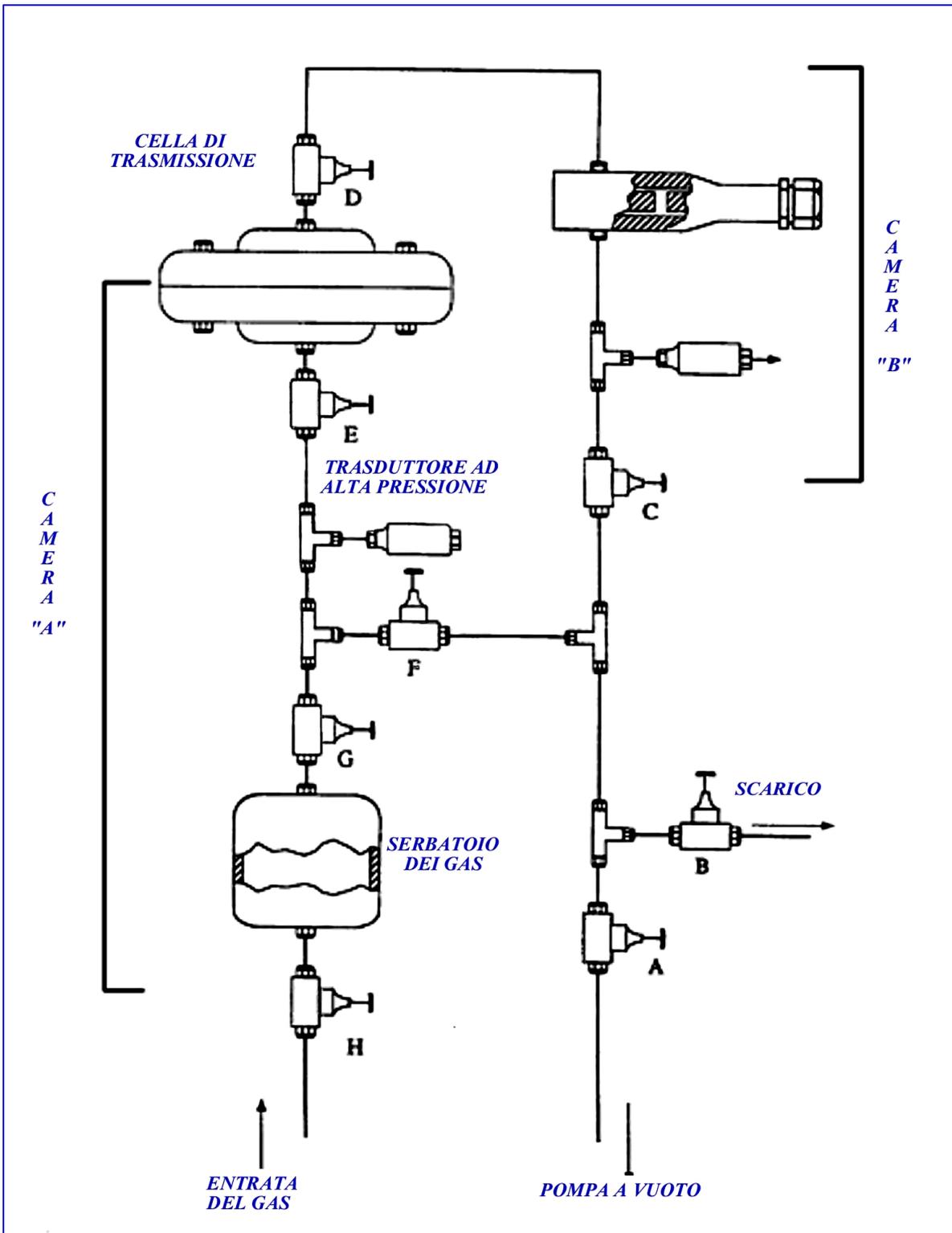


Fig. 4 - Schema del metodo monometrico usato per misurare la permeabilità dei film all'ossigeno ed all'anidride carbonica

Prima di ogni esperimento, lo strumento era equilibrato nel modo seguente: tutte le valvole si chiudevano ad eccezione della valvola "H", "B" ed "A". Si apriva lentamente la valvola "A" fin quando i trasduttori a bassa ed alta pressione segnavano un valore di 4 kPa. Quindi si chiudeva la valvola "A" e si apriva invece la valvola "H" fin quando la pressione della CO₂ e dell'O₂ raggiungeva 100 kPa. Questa procedura era ripetuta per 4 volte ogni venti minuti. Prima che la CO₂ e l'O₂ entrassero nel sistema, i due gas passavano attraverso una colonna contenente cloruro di calcio anidro in grado di disidratare i gas stessi. Quindi la pressione era riportata a 4 kPa, si chiudevano le valvole "C" ed "F" e si introducevano i gas nella camera "A" aprendo la valvola "H" fin quando la pressione non raggiungeva 100 kPa.

La trasmissione dei gas era determinata dalla seguente equazione:

$$J = (\text{slope}/A) (V_{bp}/RT)$$

Dove J rappresenta il flusso di trasmissione dei gas attraverso il film [moli/giorni m²], A l'area di trasmissione del gas [m²], R la costante universale dei gas [kPa cm³/moli °K], T la temperatura assoluta [°K], V_{bp} il volume di zona a bassa pressione (volume presente tra il film e la valvola "C") [cm³], slope rappresenta infine la pendenza della porzione lineare della curva rappresentativa della variazione di pressione nella zona a bassa pressione [kPa/giorno).

La permeabilità alla CO₂ ed all'O₂ era calcolata nel modo seguente:

$$P = V_m J X / (\Delta p)$$

Dove P ha una dimensione di [cm³/µm/m² giorno kPa], Δp (in kPa) è la differenza di pressione del gas attraverso il film che coincide con la pressione del gas in una zona di alta pressione, X è lo spessore del film espresso in µm e V_m è il volume molare della CO₂ e dell'O₂, utilizzando le condizioni STD (22263 e 22393 cm³/moli rispettivamente).

SOLUBILITÀ

La solubilità dei film era misurata sia a differenti pH che in differenti agenti denaturanti. La procedura era simile a quella descritta da Stuchell *et al.* (1994). 25 mg di film erano essiccati a 70 °C in un forno a cui veniva applicato un vuoto pari a 50 Torr per 24 h e quindi pesati per determinare il peso secco iniziale del film. Ciascun film era quindi incubato a 25 °C per 24 h in un tubo (150 × 15 mm) contenente 0.1 M di tampone citrato (pH 3.0), 0.1 M di tampone acetato (pH 4.0), 0.1 M di tampone fosfato (pH 6.0) o 0.1 M di tampone Tris-HCl (pH 8.0).

Per studiare la solubilità dei film in diversi agenti denaturanti, i film erano incubati in 10 mL di SDS 10%, β-mercaptoetanololo 10% o 6.6 M di urea. Alla fine dell'incubazione, i campioni erano posti su filtri di carta Whatman. Il materiale non dissolto, preso dal filtro con 10 mL di acqua distillata, era nuovamente seccato a 70 °C in un forno avente un vuoto di 50 Torr per 24 h e pesato.

Quindi la percentuale di materia solubile era calcolata come segue

$$\text{Materia solubile (\%)} = \frac{(\text{peso secco iniziale} - \text{peso secco finale})}{\text{peso secco iniziale}} \times 100$$

PROPRIETÀ MECCANICHE

Qualsiasi sia l'applicazione è di estrema importanza studiare le proprietà meccaniche dei film, che evidenziano l'elasticità e la resistenza dei film stessi. Le proprietà meccaniche studiate sono state: carico a rottura, allungamento a rottura e modulo elastico. Per quanto riguarda il carico a rottura e l'allungamento a rottura i film sono stati preconditionati al 100 % di umidità relativa e quindi tagliati con bisturi in strisce di 9 cm di lunghezza ed 1 cm di larghezza. La parte terminale di ciascuna di queste strisce è stata montata tra due morsetti di carta vetrata, agenti da attenuatori nell'eventuale rottura del film durante il montaggio tra i morsetti metallici dell'Instron. La distanza iniziale tra i 2 morsetti metallici era di 90 mm, mentre la velocità di spostamento era di 10 mm min^{-1} . Le prove di trazione sono state eseguite utilizzando un Dinamometro Instron 4202 a funzionamento elettromeccanico con cella di rilevamento del carico da 1 kN ed adottando l'ASTM standard method D 882-95 (ASTM, 1995). L'acquisizione e l'elaborazione dei dati è stata eseguita utilizzando il software Instron serie IX.

Per quanto riguarda il modulo elastico, i film erano tagliati con il bisturi in strisce di 1 cm di lunghezza e 0.4 cm di larghezza e condizionati per 24 h in soluzioni aventi differente pressione osmotica. Quindi i film erano rimossi da queste soluzioni e incollati su supporti metallici utilizzando una colla di cianocrilato (Cyanolit 223-F, Eurobond Adhesived Ltd., Sittingbourne Kent). I supporti metallici erano quindi montati sull'Instron. Il modulo elastico dei film è stato esaminato in estensione uniassiale in funzione della deformazione ad una velocità di 0.02 mm s^{-1} e calcolato utilizzando il software Instron serie IX.

SWELLING

Dopo aver asportato i film dalle piastre Petri, i film stessi erano equilibrati a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ in una stufa la cui U.R. era controllata utilizzando P_2O_5 . Dischi di film erano tagliati con un punzone e bisettati con un rasoio. La lunghezza del diametro dei dischetti ottenuti era misurata con un travelling microscope (PTI Liss, Hampshire, England). I film erano pre-equilibrati in una soluzione di polietilene glicole (PEG) 3 MPa + 1M NaCl. Soluzioni di diverse concentrazioni di PEG 20000 erano preparati allo scopo di provocare un *range* di pressione osmotica da 0 a 20 MPa (Parsegian, V. A. <http://dir/nichd.nih.gov/Lpsb/docs/osmdata/osmdata.html>). Per investigare l'effetto del pH sullo *swelling*, erano preparati soluzioni di PEG 0.4 MPa + 20 mM NaCl e portate al pH richiesto con 0.1 M di HCl. Per investigare invece l'effetto della forza ionica sullo *swelling*, i film erano immersi in soluzioni aventi pressione osmotica costante pari a 0.4 MPa ma differenti concentrazioni di NaCl (da 0 M ad 0.1 M). Misure preliminari sul cambiamento in lunghezza del diametro e dello spessore hanno confermato che lo *swelling* osservato era rapido ed isotropico.

SAGGIO DI PROTEOLISI DELLA FASEOLINA

Allo scopo di valutare l'attività *anti-feeding* della faseolina in condizioni native, denaturate e polimerizzate dalla mTG, è stato effettuato un saggio di proteolisi *in vitro* seguendo il protocollo raccomandato da Sathe & Sze-tao (1997). La

denaturazione della faseolina si otteneva bollendo la proteina a 100 °C per 30 min (Dyer *et al.*, 1992).

La faseolina (2 mg ml⁻¹) è stata incubata per 30 min ad una temperatura di 37 °C in presenza di tripsina (rapporto faseolina:tripsina pari a 100:1) in un tampone Tris-HCl 0.05 M pH 8.1 contenente 0.02 M di CaCl₂ in un volume finale di 500 µl. La prova controllo era condotta in assenza di tripsina. La reazione era bloccata aggiungendo 0.2 ml di TCA 60 %. I campioni erano immediatamente raffreddati in ghiaccio per 30 min, centrifugati per 5 min a 10000×g e quindi si procedeva alla lettura dell'assorbanza del surnatante ad una lunghezza d'onda di 280 nm.

Una unità enzimatica è stata definita come µg di enzima capace di provocare un aumento di assorbanza di 0.001 nelle condizioni di saggio.

RISULTATI

FILM IDROCOLLOIDI A COMPOSIZIONE MISTA CONTENENTI MACROMOLECOLE MODELLO: PECTINE DI MELA DI ORIGINE COMMERCIALE E PROTEINE DELLA SOIA

SOLUBILITÀ

La solubilità all'acqua dei film preparati con pectine di mela di origine commerciale e proteine della soia (PSF) modificate e non dalla mTG è stata determinata dopo 24 h di incubazione sia a diversi valori di pH (Fig. 5) sia in presenza di agenti denaturanti (Fig. 6).

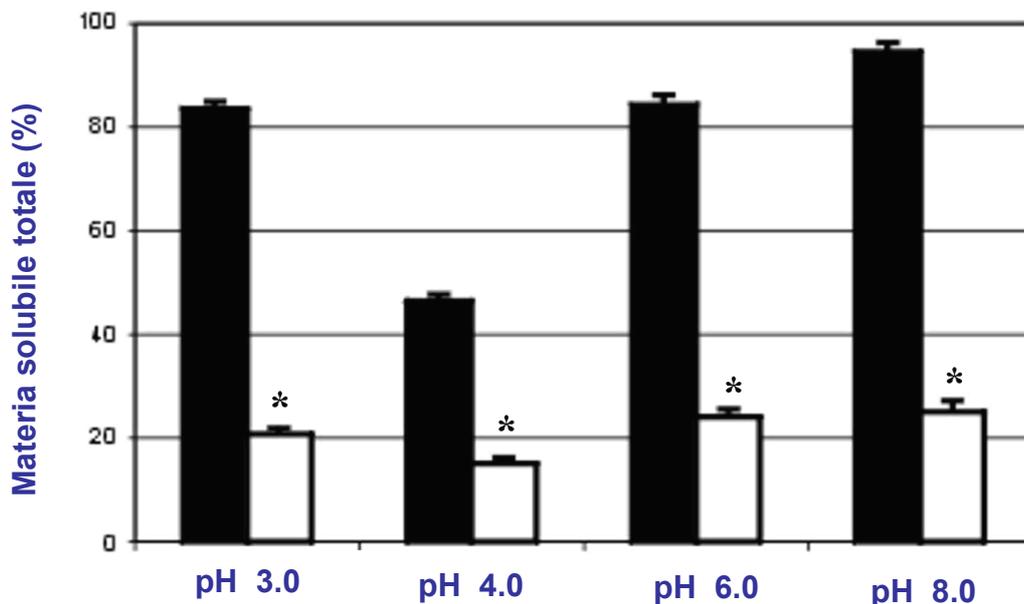


Fig. 5 - Solubilità dei film a differenti pH

La solubilità, espressa come % di materia solubile totale, è stata misurata dopo aver incubato per 24 h a 25 °C, i film costituiti da pectine di mela e proteine della soia modificate (□) e non (■) dalla mTG, in tampone citrato (pH 3), tampone acetato (pH 4.0), tampone fosfato (pH 6.0) e tampone Tris-HCl (pH 8.0).

I risultati sono espressi come media di 10 repliche \pm la deviazione standard.

* $p < 0.01$ vs film ottenuti in assenza di mTG.

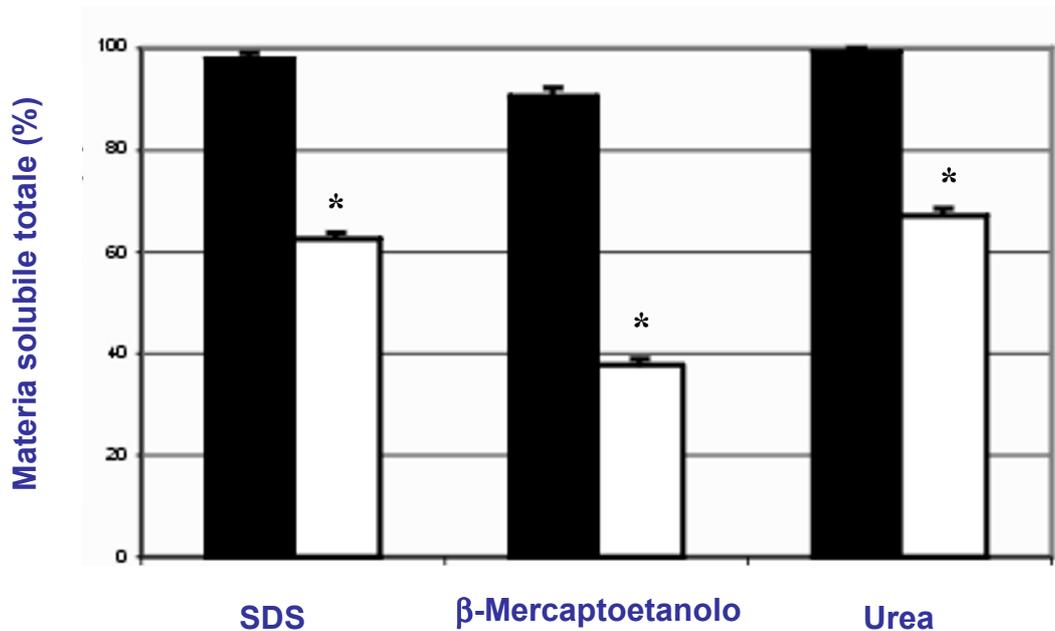


Fig. 6 - Solubilità dei film in agenti denaturanti

La solubilità, espressa come % di materia solubile totale, è stata misurata dopo aver incubato per 24 h a 25 °C i film, costituiti dalle pectine di mela e dalle proteine della soia modificate (□) e non (■) dalla mTG, in SDS, β-mercaptoetanol ed urea.

I risultati sono espressi come media di 10 repliche ± la deviazione standard.

* $p < 0.01$ vs film ottenuti in assenza di mTG.

Per quanto riguarda la solubilità a diversi pH, i film PSF preparati in presenza di mTG si mostravano meno solubili rispetto ai film in cui non è presente la mTG e ciò può essere attribuito alla formazione di legami isopeptidici intermolecolari prodotti dall'enzima nelle proteine della soia (Mariniello *et al.* 2003). Una significativa riduzione di solubilità si osservava a pH 4 nei film PSF ottenuti in assenza di mTG (Fig. 5) (Di Pierro *et al.*, in corso di stampa). La solubilità dei film ottenuti con l'agente reticolante enzimatico risultava più bassa rispetto ai film in cui non è presente la mTG anche in differenti agenti denaturanti quali l'SDS e l'urea e risultava ancora più bassa quando i film erano incubati in presenza del β-mercaptoetanol (Fig.6). In accordo con i risultati riportati da Yildirim e Hettiarachchy (1997), la solubilità più bassa mostrata dai film quando incubati in presenza di β-mercaptoetanol suggerisce che il contributo dei legami disolfuro all'integrità del film è meno significativo rispetto alle interazioni idrofobiche ed ai legami idrogeno.

Tutti questi film, inoltre, sia in presenza che in assenza di mTG risultavano più solubili rispetto a noti prodotti commerciali, quali l'HDPE ed il Mater-Bi[®], che invece si mostravano completamente insolubili in acqua, sia se incubati a diversi valori di pH sia in presenza di diversi agenti denaturanti (dati non mostrati).

PERMEABILITÀ

Allo scopo di investigare l'effetto della mTG nell'influenzare le proprietà barriera dei film, sono stati effettuati esperimenti volti allo studio della permeabilità alla CO₂, all'O₂ ed al vapore acqueo. Sono stati analizzati sia film composti da pectine di mela e proteine della soia, sia l'HDPE ed il Mater Bi[®].

I risultati mostrati in Tabella 2 dimostrano che i film preparati con proteine modificate dalla mTG offrono una barriera all'acqua, all'O₂ ed alla CO₂ maggiore che i film preparati in assenza di mTG (Di Pierro *et al.*, in corso di stampa); la permeabilità all'O₂ ed alla CO₂ dei film in cui è presente l'agente reticolante enzimatico è addirittura più bassa di 10 volte rispetto ai film in cui è assente l'enzima. Inoltre un risultato molto interessante è rappresentato dal fatto che i film in cui le proteine della soia sono state modificate dalla mTG mostrano una barriera all'ossigeno e all'anidride carbonica addirittura maggiore rispetto ai commerciali film di polietilene, ovvero all'HDPE ed al Mater Bi[®].

Questi dati dimostrano che i legami crociati mediati dalla mTG riducono significativamente lo spazio libero all'interno dei film influenzando quindi le loro proprietà barriera.

Film	Spessore (μm)	Permeabilità ($\text{cm}^3 \mu\text{m m}^{-2} \text{day}^{-1} \text{kPa}^{-1}$)		
		Ossigeno	Anidride carbonica	Vapore acqueo
HDPE	11,2 \pm 0.3	60.1 \pm 12.4	117.4 \pm 11.3	13.5 \pm 1.0
Mater-Bi [®]	12,8 \pm 0.6	721.5 \pm 24.0	1354.6 \pm 8.4	1961.4 \pm 12.3
PSF	79.3 \pm 2.3	449.8 \pm 23.6	854.3 \pm 14.4	549.5 \pm 13.8.
PSF + mTG	94.8 \pm 3.3	38.5 \pm 4.2 ^{a, b, c}	74.6 \pm 6.1 ^{a, b, c}	316.3 \pm 22.46 ^{a, b, c}

Tabella 2 - Proprietà barriera dei film

La permeabilità all'ossigeno, all'anidride carbonica ed al vapore acqueo è stata misurata sui film costituiti da pectine di mela e proteine della soia in assenza (PSF) ed in presenza di mTG (PSF + mTG) e su film di origine commerciale, ovvero l'HDPE ed il Mater-Bi[®].

I risultati sono espressi come medie di dieci repliche \pm la deviazione standard

^a "PSF + mTG" vs "HDPE" ($p < 0.01$);

^b "PSF + mTG" vs "Mater-Bi[®]" ($p < 0.01$);

^c "PSF + mTG" vs PSF ($p < 0.01$).

FILM IDROCOLLOIDI A COMPOSIZIONE MISTA UTILIZZANDO OMOGENATI GREZZI DI FINOCCHIO E PROTEINE DELLA SOIA

Allo scopo di utilizzare la mTG come strumento biotecnologico per modificare le proteine della soia di film idrocolloidi la cui componente glucidica era rappresentata da omogenati grezzi di finocchio sono stati effettuati, antecedentemente alla preparazione dei film, saggi *in vitro* in cui la farina estratta da semi di soia era incubata in presenza dell'agente reticolante.

Mariniello *et al.* hanno dimostrato che la mTG ha la capacità di polimerizzare le specie proteiche presenti *in toto* nella farina estratta da semi di soia. Infatti essi osservavano, mediante saggi di polimerizzazione seguiti da SDS-PAGE che, aumentando la quantità di enzima utilizzato, le diverse specie proteiche presenti nella farina venivano polimerizzate con la conseguente formazione di polimeri ad alto peso molecolare incapaci di penetrare nello stacking gel (Mariniello *et al.*, 2003). Inoltre l'aggiunta di pectine alla miscela di saggio non influenzava la reazione di polimerizzazione delle proteine stesse.

Per valutare l'influenza della componente glucidica sulla polimerizzazione delle proteine presenti nella farina di soia, queste ultime sono state incubate con la mTG in presenza ed in assenza di omogenati grezzi di finocchio. La reazione di polimerizzazione è stata allestita utilizzando le stesse condizioni in cui avviene il casting, ovvero incubando le prove per 12 ore ad una temperatura di 37°C sotto cappa chimica. Dopo saggi preliminari per stabilire rapporti ottimali fra la componente glucidica e la componente proteica, le quantità da utilizzare sono state stabilite in 3 g di omogenato di finocchio ed in 0.1 g di proteine modificate dalla mTG (omogenati:proteine 30:1). Prove controllo sono state allestite utilizzando proteine non modificate enzimaticamente. Attraverso questi saggi di polimerizzazione seguiti da analisi di SDS-PAGE si è verificato che in presenza di tali omogenati, così come in presenza delle pectine di mela (Mariniello *et al.*, 2003), le proteine della soia conservano la capacità ad agire come substrati della mTG. È possibile notare che diverse specie proteiche sono coinvolte nel processo di polimerizzazione (Fig. 7, Pannello A) sia in assenza (canale 3) sia in presenza (canale 4) di omogenati di finocchio. In particolare, confrontando il canale 1A, (che rappresenta la prova controllo incubata in assenza di enzima), con i canali 3A e 4A si nota la scomparsa delle bande aventi peso molecolare di ~ 75 KDa (corrispondenti alla subunità α ed α^1 della beta-conglicina), della banda avente peso molecolare leggermente inferiore a 50 KDa (corrispondente alla subunità β della beta-conglicina) e della banda compresa fra gli standard di peso molecolare 37 e 25 KDa (che corrisponde al monomero della proteina vacuolare di soia). La scomparsa di queste bande proteiche porta alla formazione di polimeri ad alto peso molecolare incapaci di penetrare lo stacking gel. Tuttavia è da sottolineare che la formazione di polimeri ad alto peso molecolare si osserva anche quando la miscela di saggio è incubata in presenza di estratti grezzi di finocchio indipendentemente dalla presenza dell'enzima (canale 2A), suggerendo che, nelle condizioni utilizzate, il finocchio potrebbe indurre una reticolazione delle proteine presenti nella farina di soia. Questo risultato, di difficile interpretazione, potrebbe essere giustificato dal descritto alto grado di interazione fra le proteine della farina di soia e la cellulosa (Fischer *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2002). Infatti studi di estrazione di proteine e carboidrati da preparati di soia hanno sottolineato lo stretto grado di associazione fra queste due classi di biomolecole tale da influenzare la suscettibilità della componente proteica all'azione di specifiche endo-proteasi (tripsina, pepsina, chimotripsina e papaina), sebbene sia

nota la capacità della quasi totalità delle proteine della soia di fungere da substrato per questi enzimi.

Stabilita l'efficacia della mTG a catalizzare la formazione di legami isopeptidici crociati fra le proteine della soia, si è passati alla produzione di film idrocolloidali a composizione mista usando omogenati grezzi di finocchio e proteine della soia modificate e non dalla mTG (rapporto omogenati: proteine pari a 30:1). Allo scopo di verificare che la polimerizzazione delle proteine avviene anche durante il casting, frammenti di film sono stati solubilizzati in tampone di Laemmli ed analizzati mediante SDS-PAGE.

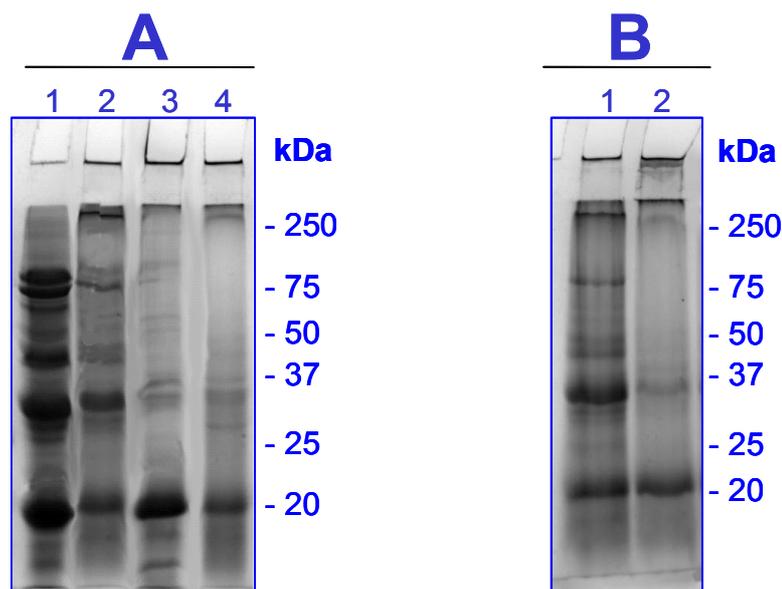


Fig. 7 – Analisi mediante elettroforesi delle proteine della farina di soia polimerizzate dalla mTG in presenza di finocchio

PANNELLO A

SDS PAGE (12%) di 50 µg di farina di soia incubata in presenza di 0.5 µg di mTG in assenza (**canale 3**) ed in presenza (**canale 4**) di 1.5 mg di omogenati di finocchio. Come controlli sono stati allestiti saggi in assenza di mTG senza (**canale 1**) e con (**canale 2**) 1.5 mg di finocchio.

PANNELLO B

Profili elettroforetici di campioni di film costituiti da omogenati di finocchio e farina di soia (30:1) ed allestiti in assenza (**canale 1**) ed in presenza (**canale 2**) di mTG.

20 mg di ciascun film sono stati solubilizzati in 250 µl di tampone di Laemmli e centrifugati a 13000×g. 20 µl del supernatante sono stati sottoposti ad SDS-PAGE (12 %).

La Fig. 7 pannello B mostra il profilo elettroforetico di campioni di film la cui componente proteica è stata incubata in assenza (canale 1) ed in presenza di mTG (canale 2). Come si può osservare, i risultati ottenuti sono del tutto sovrapponibili a

quelli riportati nel pannello A. Infatti l'agente enzimatico induce la modificazione di diverse specie proteiche presenti nella farina di semi di soia, ovvero sono coinvolte nella formazione di polimeri ad alto peso molecolare le subunità α e β della beta-conglicinina aventi pesi molecolari rispettivamente pari a ~ 75 KDa e ~ 50 KDa. Inoltre il decremento della banda di peso molecolare compreso tra 37 e 25 KDa, corrispondente al monomero della proteina vacuolare, lascia supporre un coinvolgimento, seppure di entità minore, di questa specie proteica.

STUDIO DELLE PROPRIETÀ MECCANICHE

L'utilizzo adeguato dei film, sia in capo agrario che nel settore alimentare, è fortemente condizionato dalle proprietà barriera e dalla solubilità in diversi ambienti, ma sicuramente non sono da sottovalutare le caratteristiche fisico-strutturali che permettono il mantenimento dell'integrità della matrice polimerica durante le varie fasi di manipolazione, imballaggio e trasporto (Debeaufort *et al.*, 1998). Per tale motivo, sui film oggetto di questo studio, sono state eseguite prove di trazione utilizzando un metodo di analisi standard per film plastici sottili, come suggerito dall'ASTM.

I campioni da sottoporre alle prove di trazione sono stati condizionati per 1h al 100 % di umidità e successivamente sono stati tagliati in strisce di 9 cm di lunghezza e di 1 cm di larghezza. A partire dalle curve sforzo-deformazione sono state determinate alcune proprietà, quali il carico e l'allungamento a rottura. In particolare il carico a rottura rappresenta lo sforzo di trazione massimo che il film può sostenere prima che la struttura ceda mentre l'allungamento a rottura è un indice della flessibilità/elasticità del campione, ovvero la percentuale di deformazione del film stesso.

Le prove meccaniche sono state eseguite sui campioni costituiti da omogenati grezzi di finocchio e da campioni in cui oltre agli omogenati di finocchio erano state aggiunte le proteine della soia modificate e non dall'enzima. I dati di queste prove sono riportati in Tabella 3.

Come si osserva, tali prove hanno dimostrato che i film ottenuti con gli omogenati di finocchio con e senza le proteine della soia (modificate e non dalla mTG) presentano una % di elasticità pari a ~ 12 . Tale elasticità è molto simile a quella dimostrata dai film in cui la componente carboidratica era rappresentata dalle pectine di mela di origine commerciale (Mariniello *et al.*, 2003). Per quanto riguarda la resistenza alla trazione, è da notare che non c'è una differenza significativa tra i film in cui la matrice polimerica è rappresentata solo dagli omogenati di finocchio (45.3 MPa) ed i film in cui sono presenti anche le proteine della soia non modificate dall'enzima (48.37 MPa). Ma tale parametro raddoppia (86.7 MPa) nel momento in cui le proteine sono modificate dalla mTG, dimostrando che l'enzima ha una significativa influenza sulla strutturazione della matrice dei film creando un materiale con una reticolazione più omogenea e resistente.

Inoltre è interessante notare che, come riportato in Tabella 3, un'ulteriore differenza tra i film risiede nello spessore che è stato valutato pari a 110 μm nei film costituiti solo da omogenati di finocchio, 155 μm e 163 μm rispettivamente nei film formati da omogenati di finocchio e proteine non modificate e modificate dalla mTG.

TIPO DI FILM	Carico a Rottura (MPa)	Allungamento a rottura (%)	Spessore (μm)
Omogenati di finocchio	45.3 \pm 1.5	12.6 \pm 0.9	110 \pm 11
Omogenati di finocchio + soia	48.37 \pm 3.6	11.8 \pm 0.9	155 \pm 17
Omogenati di finocchio+soia+mTG	86.7 \pm 2.7	13.26 \pm 0.8	163 \pm 9

Tabella 3 - Proprietà meccaniche dei film

Il carico a rottura e l'allungamento a rottura sono stati eseguiti sui campioni costituiti da omogenati grezzi di finocchio (3175 mg) e da campioni in cui oltre agli omogenati erano aggiunte le proteine (108 mg) della soia modificate e non dalla mTG (1 mg). Ciascun campione era stato condizionato per 1 h al 100 % di U.R., tagliato in strisce di 9 cm di lunghezza ed 1 cm di larghezza ed analizzato all'Instron.

CARATTERIZZAZIONE DELLE PECTINE ESTRATTE DA FINOCCHIO

L'estrazione delle pectine, eseguita utilizzando il metodo modificato di Levigne *et al.* (2002), ha condotto ad una resa pari a 22 mg g⁻¹ di peso fresco di finocchio. La viscosità intrinseca, calcolata mediante l'utilizzo del viscosimetro capillare Standard Ostwald, è risultata essere 254 ml g⁻¹ (Fig. 8) indicando che le pectine di finocchio presentano una massa molecolare tipica dei polisaccaridi ad alto peso molecolare (Ryden *et al.*, 2000).

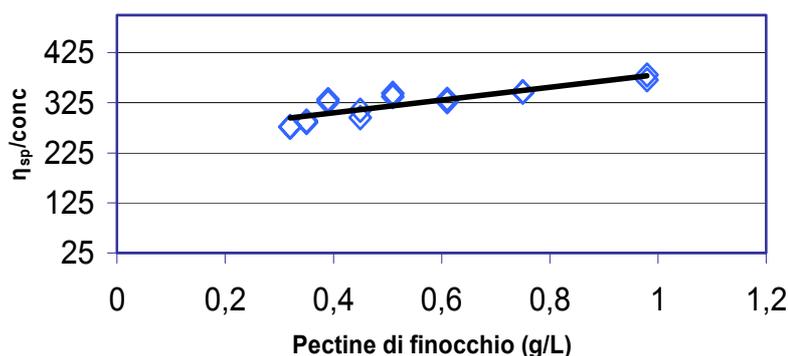


Fig. 8 - Viscosità intrinseca delle pectine di finocchio

I polisaccaridi sono stati dispersi in una soluzione di tampone acetato 50 mM pH 5.7, effettuando diluizioni da 0.3 a 1 g/L. La viscosità intrinseca $[\eta]$ era calcolata mediante estrapolazione della misura della viscosità specifica ad un valore di concentrazione zero.

Dal momento che la catena lineare delle pectine è costituita da monomeri di acido α -D-galatturonico (il cui gruppo carbossilico può essere o meno esterificato con metanolo) uniti da legami α -(1→4) (MacDougall *et al.*, 1996), sono stati effettuati esperimenti volti a determinare il contenuto di acidi uronici nelle pectine estratte. La concentrazione degli acidi uronici, che è stata determinata attraverso il metodo colorimetrico di Blumenkranz (Blumenkranz and Asboe-Hansen, 1973), utilizzando l'acido galatturonico come standard, risulta essere $400 \mu\text{g mg}^{-1}$ di pectine.

Uno dei parametri caratterizzanti le pectine è sicuramente il loro grado di esterificazione. Tale parametro è fondamentale in quanto determinante delle proprietà filmanti e solubilizzanti delle pectine medesime (Thakur *et al.*, 1997). Le pectine estratte dal finocchio risultavano avere un grado di metossilazione pari al 48%, valore che colloca le pectine di questa specie al limite tra pectine ad alto metossile e pectine a basso metossile.

Per verificare se le pectine di finocchio, presentassero monosaccaridi neutri, che costituiscono generalmente le "hairy regions", ovvero le catene ramificate di pectine presenti in diverse specie vegetali (Peugnet *et al.*, 2001), i polisaccaridi sono stati idrolizzati mediante TFA 2 M ad una temperatura di $120 \text{ }^\circ\text{C}$ ed i monosaccaridi ottenuti convertiti in alditolo acetato ed analizzati mediante GC (Henry *et al.*, 1983; Selvendran *et al.*, 1979). L'analisi cromatografica ha rivelato anche nelle pectine del finocchio la presenza di monosaccaridi neutri rappresentati principalmente da rhamnosio, presente ad una concentrazione di $15.6 \mu\text{g g}^{-1}$, arabinosio presente ad una concentrazione di $13.6 \mu\text{g g}^{-1}$ e galattosio, presente ad una concentrazione di $44 \mu\text{g g}^{-1}$ (Giosafatto *et al.*, Extraction and characterization of polysaccharides from fennel, manoscritto in preparazione).

Le caratteristiche descritte delle pectine estratte dal finocchio sono state riassunte in Tabella 4.

Resa (mg g^{-1})	Viscosità intrinseca $[\eta]$ (ml g^{-1})	Contenuto di acidi uronici ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	Grado di metossilazione (%)	Ramnosio* ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	Arabinosio* ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	Galattosio* ($\mu\text{g mg}^{-1}$)
22	254	400	48	15.6	13.6	44

* monosaccaridi neutri

Tabella 4 - Caratteristiche delle pectine estratte dal finocchio

PROPRIETÀ DEI FILM OTTENUTI CON PECTINE ESTRATTE DAL FINOCCHIO E FASEOLINA ESTRATTA DA *PHASEOLUS VULGARIS*

Dopo aver estratto e caratterizzato le pectine del finocchio, il passo successivo è stato quello di produrre film idrocolloidi a composizione mista utilizzando come componente carboidratica tali polisaccaridi e come componente proteica la faseolina, proteina di riserva dei semi del fagiolo comune.

Prove preliminari sono state eseguite al fine di stabilire le quantità ottimali dei componenti proteici e glucidici. In particolare è stata mantenuta costante la quantità di pectine (6 mg cm^{-2}) e variata la quantità di proteine (1.5 mg cm^{-2} , 2 mg cm^{-2} , 3 mg cm^{-2}), ottenendo un rapporto proteine:pectine rispettivamente pari a 1: 4, 1: 3 ed 1: 2. La miscela così preparata è stata essiccata a temperatura ambiente sotto cappa chimica per 24 h. La Fig. 9 riporta la fotografia del film costituito da pectine di finocchio. L'aspetto macroscopico dei film ottenuti con le pectine del finocchio con e senza la componente proteica non appare dissimile. Entrambi i tipi di film si presentano trasparenti, manipolabili, con una struttura compatta e dotati di un buon grado di plasticità.



Fig. 9 - Film ottenuto con pectine estratte dal finocchio

Le pectine estratte dal finocchio sono state disciolte in acqua (6 mg cm^{-2}) e stratificate su una piastra Petri di dimensioni $60 \times 15 \text{ mm}^2$.

I film ottenuti sono stati sottoposti a misurazione dello spessore ed i risultati sono riportati in Tabella 5. Si può notare che lo spessore aumenta in modo direttamente proporzionale alla quantità di faseolina utilizzata assumendo valori compresi tra $33.5 \mu\text{m}$ e $62.8 \mu\text{m}$.

Per valutare differenze non visibili macroscopicamente e relative alla struttura reticolare dei film, i film ottenuti con le pectine di finocchio con e senza la faseolina sono stati sottoposti a studi riguardanti la capacità di idratazione. Per definire questa capacità dei polimeri si ricorre all'uso della parola inglese "swelling", che letteralmente significa "rigonfiamento" ed è definito come la misura della quantità di fluido imbibita e trattenuta da un polimero (Peppas *et al.*, 2000).

Pectine estratte da finocchio (mg cm^{-2})	Faseolina (mg cm^{-2})	Spessore (μM)
6	--	33.5 ± 3.6
6	1.5	58.4 ± 2.2
6	2	60.0 ± 3.2
6	3	62.8 ± 7.2

Tabella 5 - Spessore dei film ottenuti con le pectine estratte da finocchio in assenza ed in presenza di diverse quantità di faseolina.

Gli esperimenti di *swelling* sono stati condotti in funzione della forza ionica, della pressione osmotica e del pH ad una temperatura di 20 °C. I valori di *swelling* sono stati calcolati dal rapporto V/V_0 , dove V rappresenta il volume finale del film dopo esposizione a stress di tipo ionico, osmotico e di pH e V_0 è il suo volume iniziale. Lo *swelling* in funzione della forza ionica è stato effettuato immergendo i film in soluzioni di differenti concentrazioni di NaCl ed a una pressione osmotica costante pari a 0.4 MPa, che permetteva di mantenere i film integri. Tali studi sono riportati in Fig. 10 che mostra lo *swelling* dei film preparati con e senza la faseolina in funzione della forza ionica.

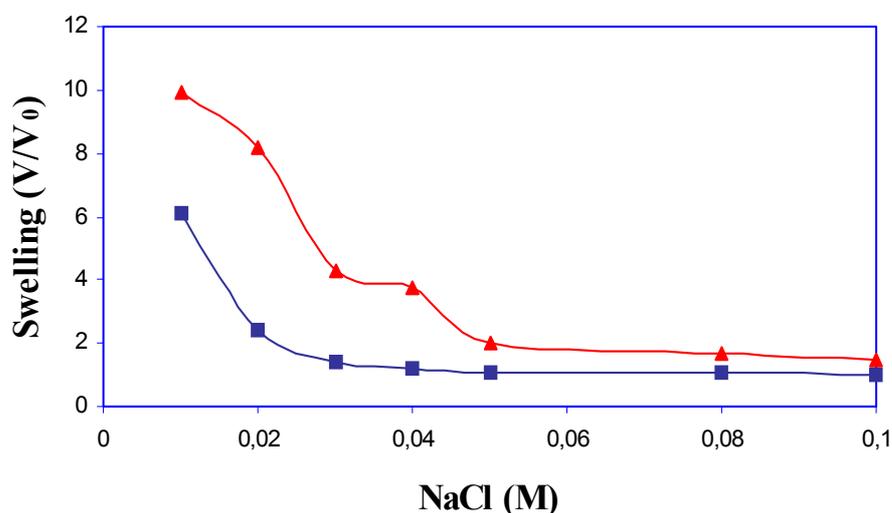


Fig. 10 - Swelling dei film in funzione della forza ionica

Relazione tra la forza ionica e lo *swelling* dei film ottenuti con pectine di finocchio in assenza (—▲) ed in presenza (—■) di faseolina. I film erano esposti ad una pressione osmotica costante di 0.4 MPa.

Come si può vedere dal grafico al di sotto di una concentrazione 0.04 M di NaCl c'è un significativo rigonfiamento di entrambi i tipi di film, infatti ad una concentrazione di 0.02 M il volume finale aumenta di ~ 6-7 volte rispetto al volume iniziale per quanto riguarda i film preparati solo con le pectine e di ~ 3 volte per quanto riguarda i film in cui oltre alla sorgente glucidica è stata aggiunta la faseolina come sorgente proteica. Lo *swelling* in funzione di una forza ionica maggiore è notevolmente ridotto, infatti ad una concentrazione di NaCl pari a 0.1 M c'è un incremento del volume dei film di solo 1-2 volte. Immergendo i film in una soluzione priva di sali, quindi con forza ionica pari a zero, ma avente pressione osmotica pari a 0.4 MPa si osserva il dissolvimento del film, fenomeno che non accade quando il film è immerso in una soluzione avente forza ionica nulla ma una pressione osmotica corrispondente a 5.0 MPa (dati non mostrati).

Gli esperimenti di *swelling* in funzione della pressione osmotica sono stati effettuati immergendo i film in soluzioni aventi differenti pressioni osmotiche ed una concentrazione di NaCl costante pari ad 1 M. A tal fine sono state preparate soluzioni di diverse concentrazioni di PEG 20000, in modo tale da stabilire un *range* di pressione osmotica da 0 a 20 MPa. La conversione dei valori di concentrazione di PEG ai valori di pressione osmotica è stata ottenuta utilizzando il metodo descritto da Parsegian *et al.* (1986). Nella Fig. 11 è mostrata la relazione esistente tra la pressione osmotica e lo *swelling* dei film. In particolare si può notare che riducendo la pressione osmotica a valori inferiori di 1.0 MPa si assiste ad un aumento del volume dei film. Infatti in corrispondenza di tale pressione osmotica lo *swelling* dei film preparati solo con le pectine di finocchio raggiunge valori di 2.8 V/V₀, mentre lo *swelling* dei film preparati con pectine di finocchio in presenza di faseolina presenta valori di 2.5 V/V₀. Riducendo ulteriormente i valori di pressione osmotica al di sotto di 0.5 MPa si ottiene il dissolvimento di entrambi i tipi di film.

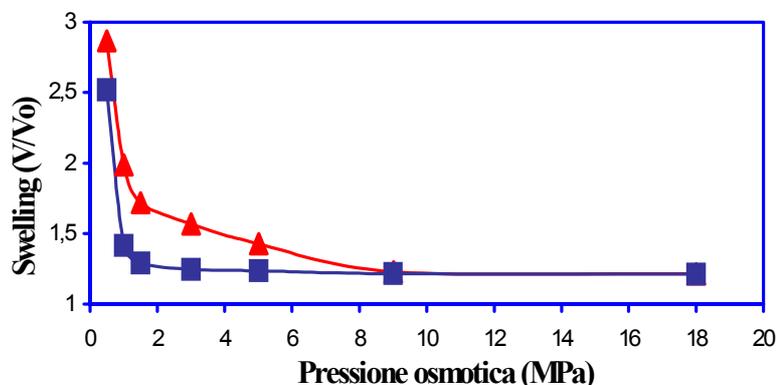


Fig. 11 - Swelling dei film in funzione della pressione osmotica

Relazione tra la pressione osmotica e lo *swelling* dei film ottenuti con pectine di finocchio in assenza (—▲—) ed in presenza di faseolina (—■—). I film erano trattati ad una concentrazione di NaCl costante pari ad 1 M.

Uno dei fattori determinante lo *swelling* è inoltre il pH, in quanto un aumento degli ioni [H⁺], riducendo la dissociazione dei gruppi ionizzabili delle pectine, riduce la carica netta complessiva presente sul polimero e di conseguenza affievolisce l'effetto Donnan, provocando una diminuzione del rigonfiamento dei polielettroliti (MacDougall *et al.*, 2001a; Brannon & Peppas, 1991). La dipendenza dello *swelling*

dal pH è mostrata in Fig. 12. E' stato scelto un *range* di pH compreso tra 2 e 9. Come atteso, la riduzione dello *swelling* è direttamente proporzionale all'abbassamento del pH. Infatti lo *swelling* dei film costituiti soltanto dalle pectine raggiunge valori pari a 4 v/v_0 e pari a 9 v/v_0 rispettivamente a pH 2 e pH 9, mentre lo *swelling* dei film in cui alle pectine è stata aggiunta la faseolina, considerando gli stessi valori di pH, presenta rispettivamente valori di 2 V/V_0 e di 5.5 V/V_0 .

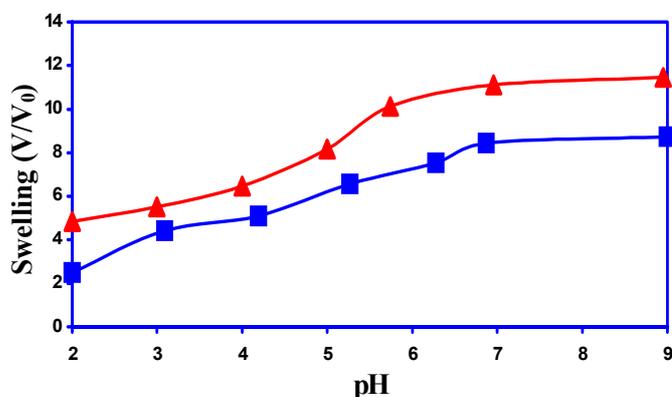


Fig. 12 - Swelling dei film in funzione del pH

Effetto del pH sullo *swelling* dei film ottenuto con pectine di finocchio in assenza (—▲—) ed in presenza (—■—) di faseolina.

I film erano trattati ad una pressione osmotica costante di 0.4 MPa.

Sui film trattati in differenti soluzioni di pressione osmotica e aventi i valori di *swelling* sopra riportati (Fig. 11) sono stati effettuati anche studi riguardanti il modulo elastico. Il modulo elastico è stato calcolato dalla tangente alla curva carico-spostamento nella sua porzione lineare. Come è atteso, il modulo elastico è inversamente proporzionale allo *swelling*, infatti con l'aumentare dell'idratazione del film diminuisce il modulo elastico (Fig. 13). Inoltre la Fig. 13 mostra che il modulo elastico non cambia significativamente tra i film in assenza ed in presenza della faseolina in corrispondenza di qualsiasi valore di *swelling* dei film medesimi.

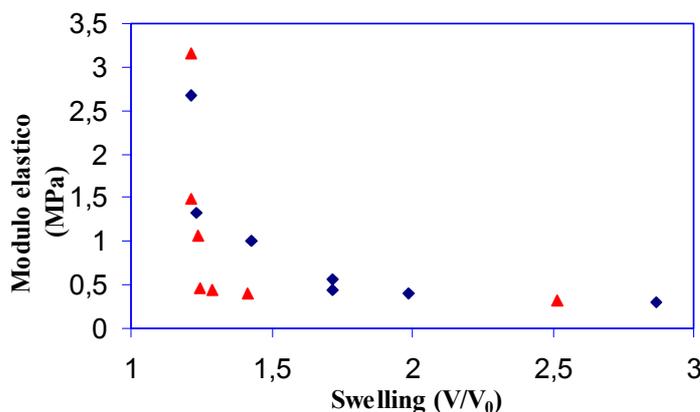


Fig. 13 – Modulo elastico in funzione dello swelling

Il modulo elastico è stato confrontato con lo *swelling* dei film costituiti da pectine di finocchio in assenza (—▲—) ed in presenza (—■—) di faseolina.

FASEOLINA COME SUBSTRATO DELLA mTG

Dal momento che la faseolina ha un'alta identità di sequenza con le proteine della soia ed in particolare con le subunità α e β della beta-conglicina, è stato condotto un saggio di polimerizzazione con successiva SDS-PAGE al fine di valutare se questa proteina fosse substrato della mTG. Il saggio di polimerizzazione è stato eseguito utilizzando 20 μg di faseolina e 0.033 μg di mTG (ottenendo un rapporto substrato : enzima pari a 600:1) in assenza ed in presenza di omogenati di finocchio. Dalla Fig. 14, è possibile notare che la faseolina è substrato della mTG e che la modificazione della proteina da parte dell'enzima avviene anche in presenza di omogenati di finocchio. Infatti in presenza di mTG sia in assenza (canale 3) che in presenza (canale 4) di omogenati di finocchio c'è una riduzione della banda di peso molecolare di ~ 50 KDa corrispondente alla faseolina, in confronto alle prove controllo in cui la proteina è stata incubata in assenza di enzima senza (canale 1) e con (canale 2) 0.6 mg di finocchio. La riduzione di questa banda è accompagnata dalla concomitante formazione di polimeri ad alto peso molecolare ed in particolare si formano polimeri di peso molecolare pari a 100 KDa e di peso molecolare uguale e/o superiore a 250 KDa (canale 3 e 4).

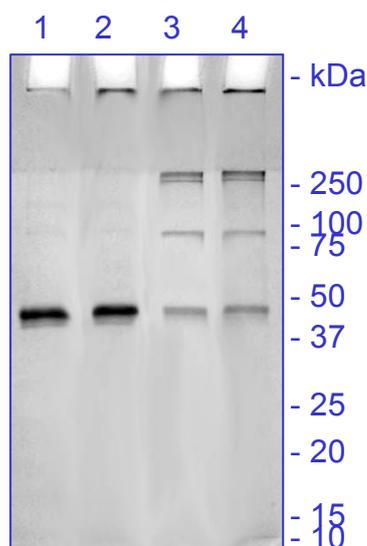


Fig. 14 - Analisi mediante elettroforesi della faseolina polimerizzata dalla mTG in presenza di finocchio

SDS PAGE (12 %) della faseolina (20 μg) incubata in presenza di 0.033 μg di mTG in assenza (**canale 3**) ed in presenza (**canale 4**) di omogenati di finocchio. Come controlli sono stati allestiti saggi in assenza di mTG senza (canale 1) e con 0.6 mg di finocchio (**canale 2**).

SAGGIO DI PROTEOLISI DELLA FASEOLINA

In letteratura è noto che la faseolina in condizioni native è resistente all'idrolisi da parte di diversi enzimi digestivi, quali la tripsina, la chimotripsina e la pepsina (Deshpande and Nielsen, 1987), caratteristica che conferisce a questa proteina un'attività *anti-feeding*. Infatti esperimenti *in vivo* hanno dimostrato che la proteina inibisce la crescita di molte larve dannose all'agricoltura (Yunes *et al.* 1998), (Moraes *et al.* 2000).

Al fine di stabilire l'attività anti-nutrizionale di questa proteina anche quando era denaturata al calore o quando era modificata dalla mTG è stato effettuato un saggio di proteolisi *in vitro*. La denaturazione al calore avveniva bollendo la faseolina a 100°C per 30 min mentre la modificazione da parte della mTG avveniva allestendo il saggio di polimerizzazione della mTG come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Come enzima digestivo è stato scelto la tripsina che ha la capacità di proteolizzare le proteine a livello del piccolo intestino.

Dopo aver incubato la faseolina con la tripsina (rapporto faseolina enzima pari a 100 :1) per 30 min. a 37 °C e precipitato le proteine in TCA (12 %) si procedeva alla misura del tasso di proteolisi mediante la lettura dell'assorbanza del surnatante ad una lunghezza d'onda di 280 nm. La misura del tasso di proteolisi si basava sull'aumento di assorbanza (ΔA_{280}) dovuto alla presenza di amminoacidi (non precipitabili con il TCA) liberati nella soluzione di saggio a seguito dell'azione idrolitica della tripsina (Sathe and Sze-tao, 1997).

In Tabella 6 è mostrato il tasso di proteolisi, inteso come digeribilità, della faseolina in confronto con la β -caseina, utilizzata come substrato controllo. Il tasso di proteolisi era calcolato dividendo i valori di assorbanza per i mg di enzima utilizzati. Per convenzione si considerava un aumento di assorbanza di 0.001 uguale ad 1 (ΔA_{280} di 0.001=1).

Faseolina nativa	Faseolina modificata dalla mTG	Faseolina denaturata
427±11	318±17	2239±38

Tabella 6 – Resistenza della faseolina modificata dalla mTG all'azione della tripsina

Il tasso di proteolisi è stato misurato sulla faseolina in condizioni native, modificata dalla mTG e denaturata al calore.

Dopo aver incubato la faseolina con la tripsina (rapporto substrato enzima pari a 100:1), le proteine nella miscela di saggio erano precipitate in TCA 12 %. Quindi si procedeva alla lettura del surnatante ad una lunghezza d'onda di 280 nm. Il tasso di proteolisi era calcolato dividendo i valori di assorbanza per i mg di enzima utilizzati. Per convenzione si considerava un aumento di assorbanza di 0.001 uguale ad 1 (ΔA_{280} di 0.001=1).

Come controllo veniva utilizzata la β -caseina, nota di possedere siti di taglio per la tripsina e il cui tasso di digeribilità era pari a 5950 ± 45.

I dati ottenuti indicano che, sebbene la β -caseina sia il substrato meglio idrolizzato dalla tripsina (avendo un tasso di proteolisi pari a 5950), la faseolina in condizioni native ha una capacità di essere digerita dalla tripsina molto bassa, presentando un tasso di proteolisi uguale a 427 ± 11 . E' molto interessante notare inoltre che la scarsa digeribilità della faseolina viene ulteriormente ridotta quando la faseolina è modificata dalla mTG, presentando un valore di 318 ± 17 . Come è atteso, la denaturazione al calore, facendo diminuire le interazioni idrofobiche all'interno della struttura proteica (Sathe and Sze-tao, 1997), rende la faseolina maggiormente esposta al taglio proteolitico da parte della tripsina. Non a caso la digeribilità della proteina in queste condizioni aumenta di gran lunga, raggiungendo un valore di 2239 ± 39 .

DISCUSSIONE

L'interesse crescente per la mTG nel settore industriale è legato senza alcun dubbio alla capacità che l'enzima ha di modificare le proprietà funzionali di proteine substrato di diversa natura. Gli studi effettuati nel corso del ciclo di dottorato hanno confermato questa caratteristica. Infatti gli obiettivi del progetto sperimentale ambivano all'utilizzo della mTG come strumento biotecnologico per polimerizzare la componente proteica di film idrocolloidi a composizione mista. A tal scopo mediante la metodica del casting, utilizzando un protocollo disponibile nei laboratori dove è stato svolto il presente progetto (Porta *et al.*, 2000), sono stati prodotti film formati da differenti combinazioni carboidrati-proteine.

In un primo momento pectine di mela e proteine della soia (modificate e non dalla mTG) sono state prescelte come molecole modello per ottenere film manipolabili e trasparenti. Successivamente le pectine di mela, di origine commerciale, sono state sostituite da omogenati grezzi di frutta e/o verdura provenienti dallo scarto di prodotti destinati sia al consumo fresco che alla trasformazione industriale. In particolare, dopo averne verificato le capacità filmanti, sono stati utilizzati omogenati provenienti dal finocchio (*Foeniculum vulgare*) di cui, come è ben noto si producono notevoli scarti in Campania soprattutto durante la stagione estiva, in modo tale da trasformare tali "wastes" ad alto impatto ambientale in materie prime per ulteriori processi di trasformazione biotecnologici. Questi omogenati hanno dimostrato avere notevoli capacità filmanti dal momento che si sono ottenuti film con un elevato grado di manipolabilità.

Recentemente Mariniello *et al.* (2003) avevano dimostrato, mediante analisi microstrutturali su film costituiti da pectine di mela di origine commerciale e proteine della soia, che la superficie dei film ottenuti con l'ausilio dell'enzima appariva più omogenea e liscia rispetto ai film ottenuti senza la mTG, la cui superficie appariva invece frastagliata e poco compatta. Inoltre le prove meccaniche avevano stabilito che la reticolazione della matrice polimerica ad opera dell'enzima provocava un aumento della resistenza dei film e ne riduceva la flessibilità. In questo studio abbiamo completato la caratterizzazione di questi film, dimostrando che l'agente reticolante influenza positivamente i film, sia dal punto di vista della solubilità a diversi pH ed in agenti denaturanti che dal punto di vista della permeabilità al vapore acqueo, alla CO₂ ed all'O₂. Gli studi di solubilità hanno dimostrato infatti che i film condotti in presenza di mTG presentano una minore solubilità rispetto ai film in cui invece è assente l'enzima sia a diversi pH (pH 3, pH 4, pH 6, pH 8) (Fig. 5) sia in presenza di differenti agenti denaturanti (urea, SDS, β -mercaptoetanol) (Fig. 6) (Di Pierro *et al.*, in corso di stampa). Questo risultato è spiegato dal fatto che l'intervento della mTG nella strutturazione del film è determinante, in quanto le proteine della soia enzimaticamente modificate apportano un ulteriore contributo alla stabilizzazione della struttura polimerica. È interessante notare che una scarsa solubilità dei film costituiti dalle pectine di mela e da proteine della soia non modificate dalla mTG si ottiene a pH 4. Questo dato è in accordo con il modello di interazione proteine-pectine proposto da Takada e Nelson (1983) che sottolineano l'importanza del pKa delle pectine e del pl delle proteine per stabilire la formazione del complesso elettrostatico. Dal momento che il pl delle proteine della soia è 4.5 ed il pKa delle pectine è compreso tra 3.5 e 5, il gruppo amminico delle proteine ed il gruppo carbossilico delle pectine interagiscono elettrostaticamente a pH 4,

stabilizzando così la matrice del film e riducendo perciò la sua solubilità. Risultati simili sono stati ottenuti da Mahmoud e Savello (1993) e da Yildirim e Hettiarachchy (1997) che hanno condotto esperimenti di solubilità in differenti agenti denaturanti su film idrocolloidi contenenti le proteine del grano e le proteine 11S della soia. Anche gli studi di permeabilità hanno rivelato l'importanza della mTG nella strutturazione della matrice polimerica. Infatti come si evince dai risultati riportati in Tabella 2, i film preparati con proteine modificate dalla mTG offrono una barriera all'acqua, all'ossigeno ed all'anidride carbonica maggiore che i film preparati in assenza di mTG (Di Pierro *et al.*, in corso di stampa) ed è ipotizzabile pensare che ciò sia dovuto al fatto che l'agente reticolante enzimatico riduca in maniera significativa lo spazio libero all'interno dei film influenzando quindi le proprietà barriera dei film stessi. Infatti è noto che tra i fattori che possono influenzare le proprietà barriera al vapore acqueo, all'anidride carbonica ed all'ossigeno sono da elencare il grado di polimerizzazione tra le molecole di cui i film sono costituiti, la polarità e la densità di tali molecole, come pure un alto livello di impacchettamento dei polimeri (Miller and Krochta, 1997). Tutti questi fattori influenzano il volume libero che rappresenta la misura dello spazio interstiziale tra le molecole che risulta collegato in modo direttamente proporzionale alle proprietà barriera di un materiale (Miller and Krochta, 1997). Interessante notare inoltre che le proprietà barriera di questi film sono stati confrontati anche con le proprietà barriera di pellicole di uso comune, come il Mater Bi[®] e l'HDPE. I risultati ottenuti hanno evidenziato che i film in cui è presente l'agente reticolante enzimatico offrono in maniera significativa una permeabilità all'ossigeno ed all'anidride carbonica maggiore dei comuni sacchetti di plastica.

Prove meccaniche condotte sui film la cui sorgente glucidica era rappresentata da omogenati grezzi di finocchio hanno confermato l'influenza della mTG nel migliorare la resistenza dei film. In particolare le prove meccaniche effettuate sono state il carico a rottura, che è lo sforzo di trazione massimo che può sostenere il film prima che la struttura ceda, e l'allungamento a rottura che corrisponde al cambiamento percentuale di lunghezza del campione ed è un indice dell'elasticità del campione stesso. Tali prove hanno evidenziato che non c'è una differenza significativa in termini di elasticità tra i film ottenuti con gli omogenati di finocchio con e senza le proteine della soia (modificate e non dalla mTG) (Tabella 3). Per quanto riguarda la resistenza alla trazione invece, è da notare che i film in cui la matrice polimerica è rappresentata solo dagli omogenati di finocchio presentano una resistenza simile ai film in cui sono presenti anche le proteine della soia non modificate dall'enzima. Ma, in accordo con i risultati riportati da diversi autori (Mariniello *et al.*, 2003; Mahmoud & Savello, 1993; Motoki *et al.*, 1987) tale parametro aumenta nel momento in cui le proteine sono modificate dalla mTG, dimostrando che l'enzima crea un materiale con una reticolazione più omogenea e resistente.

Per identificare le basi molecolari responsabili delle capacità filmanti del finocchio, sono stati condotti esperimenti volti all'estrazione ed alla caratterizzazione delle pectine che costituiscono tale ortaggio. Tali pectine sono state analizzate (attraverso l'utilizzo di tecniche analitiche, quali la gas-cromatografia, e spettrofotometriche) dal punto di vista del contenuto di acidi uronici, di monosaccaridi neutri e del grado di esterificazione. Questi polisaccaridi hanno dimostrato avere una struttura tipica delle pectine presenti nelle pareti cellulari vegetali (Schols *et al.*, 1994a; Schols *et al.*, 1994b): come si evince dalla tabella 4 oltre all'acido galatturonico che costituisce il monomero di cui è formata la catena lineare delle pectine, c'è anche nelle pectine di finocchio una minima presenza di monosaccaridi neutri che, come descritto in letteratura (Schols *et al.*, 1994a; Schols *et al.*, 1994b), potrebbero costituire le "hairy

regions”, ovvero le regioni ramificate delle pectine. Infatti oltre che per il contenuto di acidi uronici e per il grado di metossilazione, le pectine si differenziano anche in base alla struttura delle regioni ramificate che, poiché non presentano capacità gelificanti, spesso costituiscono un problema per un uso commerciale delle pectine stesse (Peugnet *et al.*, 2001). Tali regioni sono costituite essenzialmente da catene di zuccheri neutri (quali ramnosio, galattosio, arabinosio, xilosio e fucosio) uniti generalmente da legami α -1 \rightarrow 4), legate alla catena principale delle pectine mediante legami α -1 \rightarrow 2) (Peugnet *et al.*, 2001).

Quindi è stata calcolata la viscosità intrinseca delle pectine estratte che è risultata essere di 254 ml g⁻¹ indicando che le pectine di finocchio presentano una massa molecolare tipica dei polisaccaridi ad alto peso molecolare (Ryden *et al.*, 2000). Un parametro fondamentale e direttamente correlato alle capacità solubilizzanti e filmanti delle pectine è sicuramente il loro contenuto in metil-estere altrimenti detto grado di esterificazione (Thakur *et al.*, 1997). Infatti in base al loro grado di esterificazione, esse si differenziano in pectine “alto metossile” se il loro contenuto in metil-estere è superiore al 50 %, e pectine “basso metossile” se il contenuto in metil-estere è inferiore al 50 %. Le pectine di finocchio hanno un grado di metossilazione del 48 %, il che indica che possono essere considerati dal punto di vista della loro carica netta polielettroliti deboli (Ryden *et al.*, 2000) che non necessitano di un ambiente particolarmente acido per gelificare (Thakur *et al.*, 1997).

Dopo aver estratto e caratterizzato le pectine di finocchio, il passo successivo è stato quello di produrre film idrocolloidi a composizione mista la cui componente glucidica fosse rappresentata da pectine estratte da tale ortaggio. La componente proteica di questi film era rappresentata dalla faseolina che in quanto proteina globulare ha la capacità di complessarsi con i carboidrati e quindi contribuire positivamente alla strutturazione di una matrice polimerica (Keim & Hinrichs, 2004; Famelart *et al.*, 2004; Trckova *et al.*, 2004). La faseolina e le proteine della famiglia delle lectine appartengono alle viciline (globuline 7S) e rappresentano la frazione principale delle proteine del seme nel fagiolo comune (Lawrence *et al.* 1994). In particolare la faseolina costituisce il 36-46% delle proteine totali del seme (Lawrence *et al.* 1994). Questa proteina ha un'alta identità di sequenza con le proteine della soia ed in particolare con le subunità α e β della beta-conglicinina.

Allo scopo di valutare se questa proteina fosse, come le proteine della soia, substrato della mTG, la faseolina è stata incubata in presenza dell'enzima ed in presenza o assenza di pectine estratte dal finocchio. L'analisi SDS-PAGE (Fig. 14) ha dimostrato che la faseolina costituisce un ottimo substrato per l'enzima microbico sebbene si utilizzi un rapporto substrato:enzima pari a 600:1. Inoltre la faseolina continua a fungere quale substrato per la mTG anche in presenza di omogenati di finocchio. Infatti, come si vede dall'analisi SDS-PAGE, sia in assenza che in presenza di tali omogenati, si ha una riduzione della banda di ~ 50 KDa corrispondente alla faseolina e la concomitante formazione di polimeri di peso molecolare uguale e/o superiore a 250 KDa. La modificazione TG-dipendente è stata dimostrata per diverse proteine globulari di numerosi legumi, quali l'avenacina (Siu *et al.*, 2002) proteina presente nell'*Avena sativa*, utilizzato come substrato della mTG e la pisatina, proteina di riserva del *Pisum sativum* (Larrè *et al.*, 1993) utilizzata come substrato della TG tissutale.

Dal punto di vista macroscopico non è stata evidenziata una differenza sostanziale tra i film formati unicamente dalle pectine estratte da finocchio e i film in cui alla sorgente glucidica era aggiunta la faseolina. Entrambi i tipi di film, infatti, si presentano trasparenti, manipolabili, con una struttura compatta e dotati di un buon

grado di plasticità. Per valutare differenze non visibili macroscopicamente e relative alla struttura reticolare dei film, i film ottenuti sia in presenza che in assenza della faseolina sono stati sottoposti a studi riguardanti la capacità di rigonfiamento, ovvero sono stati sottoposti a studi di *swelling*. Lo *swelling* che è definito come la quantità di fluido imbibita e trattenuta da un polimero (Peppas *et al.*, 2000) dipende da diversi fattori, tra cui l'affinità del polimero per l'acqua, il grado di reticolazione all'interno del polimero e dall'effetto "Donnan" (Parsegian *et al.*, 2000). L'effetto Donnan tiene conto della pressione esercitata dal polimero ed è inversamente proporzionale alla concentrazione salina esterna al polimero e dalla carica netta complessiva del polimero stesso (Parsegian *et al.*, 2000). Infatti i risultati ottenuti hanno evidenziato che nella condizione in cui la concentrazione salina all'esterno del polimero è più bassa rispetto alla concentrazione salina interna si assiste ad un rigonfiamento del film dovuto all'eccessiva pressione esercitata dal polielettrolita (Fig. 10). Lo stesso fenomeno accade nel caso in cui la pressione osmotica esterna è minore di quella interna, che riflette un aumento del volume del film (Fig. 11). I risultati ottenuti sono in accordo con i dati ottenuti da Ryden (2000) e da MacDougall (2001a) che hanno studiato rispettivamente le proprietà di rigonfiamento delle pectine estratte dal lupino e delle pectine estratte dal pomodoro. Lo *swelling* dei film è stato studiato anche in relazione al pH. I dati ottenuti hanno dimostrato che i film si rigonfiano con il diminuire del pH (Fig. 12). Questo risultato è spiegato dal fatto che una diminuzione del pH provoca una riduzione della carica netta all'interno del polimero contribuendo ad aumentare la pressione esercitata dal film. Per lo stesso motivo un aumento di pH ha come conseguenza un maggiore assorbimento di acqua all'interno del polimero e quindi una maggiore idratazione dello stesso (MacDougall *et al.*, 2001a; Brannon & Peppas, 1991).

I valori di *swelling* risultano più bassi nei film in cui c'è l'aggiunta della faseolina (Fig. 10, Fig. 11, Fig. 12). Infatti questa proteina interagendo, in maniera non covalente, con il network polisaccaridico, rappresentato dalle pectine, riduce la carica effettiva presente sulle pectine stesse provocando una riduzione dell'effetto Donnan e come conseguenza una riduzione dello *swelling* dei film (MacDougall *et al.* 2001b).

Alla capacità di questa proteina nel rendere più compatta la matrice polisaccaridica, si aggiunge il fatto che la faseolina, come molte proteine vegetali globulari ha una capacità *anti-feeding* nei confronti di molti insetti dannosi all'agricoltura. (Yunes *et al.* 1998; Moraes *et al.* 2000) dal momento che in condizioni native è resistente all'idrolisi da parte di diversi enzimi digestivi, quali la tripsina, la chimotripsina e la pepsina (Deshpande & Nielsen, 1987). Questa caratteristica desta particolare interesse alla luce di un'applicazione futura di questi film in campo agronomico. Sathe e Sze-tao (1997) hanno dimostrato inoltre che, quando la proteina è denaturata al calore la sua attività *anti-feeding* è notevolmente ridotta. Infatti, in queste condizioni, diminuendo le interazioni idrofobiche responsabili della stabilità proteica, la proteina assumeva una conformazione che la rendeva suscettibile al taglio proteolitico da parte della tripsina (Sathe & Sze-tao, 1997). Nel tentativo di indagare se la modificazione, indotta dalla mTG, della faseolina ne modificasse le proprietà biologiche, ovvero la proprietà *anti-feeding*, si è studiata la suscettibilità della faseolina stessa, enzimaticamente modificata, all'azione della tripsina. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la modificazione ad opera dell'agente reticolante enzimatico riduce ulteriormente la digestione della proteina da parte della tripsina diminuendo quindi l'attività nutrizionale della faseolina stessa (Tabella 6).

Da quanto esposto, i risultati discussi dimostrano che, per le caratteristiche che presentano, il campo di applicazione dei film proposti può spaziare da quello

alimentare (fungere da barriera selettiva con l'ambiente esterno, veicolare additivi, impedire contatti fisici con altro materiale) a quello farmaceutico (rilasciare farmaci in maniera mirata) e a quello agronomico. Per esempio le migliorate caratteristiche in termini di solubilità e di permeabilità dei film costituiti dalle pectine di mela e dalle proteine della soia in presenza della mTG permettono un'applicazione dei film medesimi nel settore alimentare in qualità di film edibili. Infatti per molti prodotti l'uso di film edibili è richiesto per ottenere un effetto barriera per ritardare la superficiale disidratazione di cibi freschi o congelati. In altri casi, invece, i film edibili possono proteggere l'alimento alla luce e/o ai raggi UV e risultare quindi utili a ritardare le reazioni radicaliche. Un effetto barriera ai gas, in particolare all'ossigeno, consente, per esempio, di poter migliorare il controllo della maturazione dei frutti e di ridurre significativamente l'ossidazione di cibi sensibili all'ossigeno, quali possono essere quelli particolarmente ricchi in acidi grassi polinsaturi (Debeaufort *et al.*, 1998).

Inoltre l'influenza della forza ionica, della pressione osmotica e del pH sul rigonfiamento/restringimento dei polielettroliti, dimostrato dai film costituiti da pectine di finocchio e dalla faseolina, è di fondamentale importanza e permette un'ampia applicazione di questi polimeri nel settore farmaceutico, per la produzione di "intelligent polyelectrolytes", che possano rilasciare farmaci in maniera sito-specifica in risposta a particolari stimoli (Bromberg, 2003). Dal momento che per questo tipo di applicazione si sfrutta la capacità di *swelling* dei film, in questo caso i film possono essere definiti "hydrogel". Per hydrogel si intende una matrice polimerica tridimensionale e idrofilica in grado di imbibirsi di acqua o di fluidi biologici (Peppas & Mikos, 1986; Brannon-Peppas, 1990). Sono numerosi gli esempi di hydrogel prodotti per un rilascio controllato di farmaci nella bocca, nello stomaco, nell'intestino tenue e nel colon (Peppas *et al.*, 2000). Tra questi ricordiamo quelli formati da carboidrati, quali alginati, cellulosa e chitosano (Peppas *et al.*, 2000) utilizzati per il rilascio di farmaci quali l'insulina (Lowman *et al.*, 1999) e l'acetone triamcinolone (Patent Application, US N° 4226848) che è un principio attivo utilizzato per il trattamento dell'afte.

Per gli stessi motivi, infine, si è molto confortati nel proporre l'utilizzo dei film studiati in questo progetto sperimentale, anche nel settore agronomico in qualità di bioplastiche da usare come teli per la pacciamatura dal momento che è noto che le pellicole a base di polietilene, normalmente usate per questa pratica, sono di notevole impatto ambientale. Oltre a ridurre l'inquinamento ambientale, questi teli avrebbero infatti altri importanti e numerosi vantaggi tra cui il possibile rilascio controllato e mirato di fitofarmaci nel terreno. Inoltre, come è stato detto precedentemente, la presenza della faseolina conferirebbe a questi teli proprietà repellenti e fagoderrenti nei confronti di insetti dannosi all'agricoltura dandone un valore aggiunto. Naturalmente in un prossimo futuro ci si propone completare la caratterizzazione di questi film e di studiarli dal punto di vista della biodegradabilità, della solubilità e della permeabilità (in particolare alla CO₂) in condizioni simulanti le condizioni del terreno, ambiente di elezione per tutte le applicazioni destinate all'agricoltura.

BIBLIOGRAFIA

- Aeschlimann, D. and Paulsson, M., 1994. Transglutaminases: Protein crosslinking enzymes in tissues and body fluid. Thromb. and Haemost. 71 (4): 402-415.
- Aeschlimann, D., and Thomazy, V. (2000). Protein cross-linking in assembly and remodelling extracellular matrices: the role of transglutaminases. Connect. Tissue Res. 41: 1-27.
- Aeschlimann, D., Mosher, D., Paulsson, M. (1996). Tissue transglutaminase and Factor XIII in cartilage and bone remodelling. Semin. Thromb. Haemost. 22: 437-444.
- Akimov, S.S., Krylov, D., Fleischman, L.F. and Belkin, A.M. (2000). Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. J. Cell Biol. 148: 825-838.
- Ambrus, A., Banyai, I., Weiss, M.S., Hilgenfeld, R., Keresztessy, Z., Musbek, L. and Fesus, L. (2001). Ca²⁺ binding of transglutaminase: a ⁴³Ca NMR study combined with surface polarity analysis. J. Biomol. Struct. Dyn. 19: 59-74.
- Amendola, A., Gougon, M.L., Poccia, F. (1996). Induction of "tissue" transglutaminase in HIV pathogenesis: Evidence for High rate of apoptosis of CD4 + T lymphocytes accessory cells in lymphoid tissues. Proc Natl. Acad. Sci. Usa. 93:11057-11062.
- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. and Motoki, M. (1989). Purification and characteristics of a novel Transglutaminase derived from microorganism. Agric. Biol. Chem., 53: 2613-2617.
- Ardeberg, M. (1998). Personality, disease and mortality among PVC workers: a longitudinal study. Pers. Individ. Diff. 25: 495-503.
- ASTM. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting (1995). In *Annual Book of ASTM Standards*; American Society for Testing and Materials: Philadelphia, 159-167.
- Aydt, T. P., Weller, C. L. and Testin, R. F. (1991). Mechanical properties of edible corn and wheat protein films. Trans. of ASAE. 34: 207-211.
- Bailey P., Richardson N.K., Pocalyko D.J., Schilling K.M. (1996). Covalent bonding of active agents to skin, hair or nails. US Patent: US5490980.
- Birckbichler, P.J. and Patterson, M.K. (1978). Cellular transglutaminase, growth, and transformation. Ann. N.Y. Acad. Sci. 354.

- Birckbichler, P.J., Orr, G.R., Conway, E. and Patterson, J.M.K. (1977). Transglutaminase activity in normal and transformed cells. Cancer Res. 37: 1340-1344.
- Birckbichler, P.J., Orr, G.R., Patterson, Jr, M.K. Conway, E. and Carter, H.A. (1981). Increase in proliferative markers after inhibition of transglutaminase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 5005-5008.
- Blackwell P.J., Hill P.G., Holmes, G.T.K.T. (2002). Autoantibodies to Human Tissue Transglutaminase: Superior predictors of Coeliac Disease. Scand J. Gastroenterol 11: 1282-1285.
- Blumenkranz, N. and Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. Anal. Biochem. 54: 484-9.
- Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H. and Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. J. Agric. Food Chem. 46: 2123-2129.
- Boothe, R.L., Folk, J.E. (1969). A reversible, calcium-dependent, copper-catalyzed inactivation of guinea pig liver transglutaminase. J.Biol. Chem. 244: 399-405.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem.,72: 248.
- Brannon, L. and Peppas, N.A. (1991). Equilibrium swelling behaviour of pH-sensitive hydrogels. Chem. Eng. Sci. 46: 715-722.
- Brannon-Peppas (1990). Preparation and characterization of crosslinked hydrophilic networks, in: Brannon-Peppas, R.S. Herland (Eds.), Adsorbent Polymers Technology; Elsevier, Amsterdam, pp. 45-66.
- Bromberg, L. (2003). Intelligent polyelectrolytes and gels in oral drug delivery. Curr Pharm Biotechnol. 4(5):339-49.
- Chakravarty, R., Rice, R.H. (1989). Acylation of keratynocyte transglutaminase by palmitic and myristic acids in the membrane anchorage region. J. Biol. Chem. 264:625-629.
- Cheftel, J. C., Cuq, J. and Lorient, D. (1985). Amino acids, peptides, and proteins. In Food Chemistry, 2nd ed. O. R. Fennema (Ed.).. Marcel Dekker, Inc., New York.pp. 245-369.
- Chung, S.I. (1972). Comparative studies on tissue transglutaminase and Factor XIII. Ann . N.Y. Acad. Sci. 240-255.

- Chung, S.I., Lewis, M.S. and Folk, J.E. (1974). Relationships of the catalytic properties of human plasma platelet transglutaminase (activated blood coagulation Factor XIII) to their subunit structure. J Biol. Chem. 249, 940-950.
- Clarke, D.D., Mycek, M.J., Neidle, A. and Waelsch, H. 1959: The incorporation of amines into protein. Arch. Biochem. Biophys. 79:338-354.
- Collighan, R., Cortez, J., Griffin, M. (2002). The biotechnological applications of transglutaminases. Minerva Biotec. 14: 143-148.
- Cook, R.D. and Holbrook, J.J. (1974). The calcium-induced dissociation of human plasma clotting Factor XIII. Biochem. J. 141, 79-84.
- Cozzolino, A., Di Pierro, P., Mariniello, L., Sorrentino, A., Masi, P., Porta, R. (2003). Incorporation of whey proteins into cheese curd by using transglutaminase. Biotechnol. Appl. Biochem. 38: 289-295.
- Damodaran, S. and Kinsella, J. E. (1982). Effects of ions protein conformation and functionality. In Food Protein Deterioration: Mechanisms and Functionality, J. P. Cherry (Ed.). Am. Chem. Soc. Symposium Series 206, ACS, Washigton, DC.pp 327-357.
- Darro, F., Cuhen, P., Vianna, A. (1998). Growth inhibition of Human *in vitro* and mouse *in vitro* and *in vivo* mammary tumour models by retinoids in comparison with tamoxifen and the RU-486 anti-iprogestagen . Breast Cancer Res Treat. 51: 39-55.
- de Barros Soares L.H., Assmann, F. and. Zàchia Ayub, M.A. (2003). Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. Biotechnol. Appl. Biochem. 37: 295-299.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.A., Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 38(4): 299-313.
- Deshapande, S.S., and Nielsen, S.S. (1987). *In vitro* enzymatic hydrolysis of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* L. J. Food Sci., 52: 1326-1331.
- Di Pierro, P., Mariniello, L., Giosafatto, C.V.L., Masi, P. and Porta, R. Solubility and Permeability Properties of Edible Pectin-Soy Flour Films Obtained in the Absence or Presence of Transglutaminase. Food Biotech. In corso di stampa.
- Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E.O. and Schuppan, D. (1997). Nature Med. 3(7), 797-801.
- Ding W., Liang J. and Anderson L.L. (1997). Thermal and catalytic degradation of high density polyethylene and commingled post-consumer plastic waste. Fuel Proces. Technol. 51: 47-62.

- Donhowe, I.G., Fennema, O.R., (1994). Edible films and coatings: Characteristics, formation, definitions, and testing methods. In: Krochta, J.M., Baldwin, E.A., Nisperos Carriero, M.(Eds.), Edible coatings and films to improve food quality. Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PY, USA, pp1-24.
- Doyle, J.J., Schuler, M.A., Godette, W.D., Zenger, V., Beachy, R.N., and Slightom, J.L. (1986). The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. J. Biol. Chem. 261: 9228-9238.
- Dyer, J.M., Nelson, J.W., Murai, N. (1992). Biophysical analysis of phaseolin denaturation induced by urea, guanidinium chloride, pH and temperature. J. Protein Chem. 11 (3): 281-288.
- Esposito, C., Mancuso, F., Calignano, A., Di Pierro, P., Pucci, P., and Porta, R.(1995). Neurokinin receptors could be differentiated by their capacity to respond to the transglutaminase- synthesized gamma-(glutamil⁵)spermine derivative of substance P. J.Neurochem. 65: 420-425.
- Famelart, M.H., Tomazewski, J., Piot, M., Pozzenec, S. (2004). Comprehensive study of acid gelation of heated milk with model protein system. J. Dairy Sci. 14:313-321.
- FAO. (1969). Nutrition Meetings, Rep. Ser. No. 46A, 133.
- Feeney, R. E. and Whitaker, J. R. (1988). Importance of cross-linking reactions in proteins. In Advances Cereal Sci. Technol. Volume IX,Y. Pomeranz (ED.), 21-46. American Association of Cereal Chemists, ST. Paul, MN.
- Femenia, A., Robertson, J.A., Waldron, K.W. and Selvedran, R.R. (1998). Cauliflower (*Brassica oleracea* L), globe artichoke (*Cynara scolymus*) and chicory witloof (*Cichorium intubus*) processing by-products as sources of dietary fibre. J. Sci. Food Agr. 77: 511-518.
- Fesus, L., Madi, A., Balajthy, Z., Nemes, Z. and Szondy, Z. (1996). Transglutaminase induction by various cell death and apoptosis pathways. Experientia. 52: 942-949.
- Fesus, L., Thomazy, V. and Falus, A. (1987). Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. FEBS Lett. 224: 104-108.
- Fischer, M., Gruppen, H., Piersmam S.R., Kofod, L.V., Schols, H.A. and Voragen, A.G.J. (2002). Aggregation of peptides during hydrolysis as a cause of reduced enzymatic extractability of soybean meal proteins. J. Agric. Food Chem. 50: 4512-4519.
- Fischer, M., Kofod, L.V., Schols, H.A., Piersma, S.R., Gruppen, H. and Voragen, A.G.J. (2001). Enzymatic extractability of soybean meal proteins and

carbohydrates: heat and humidity effects. J. Agric. Food Chem. 49: 4463-4469.

- Folk, J.E. (1983). Mechanism and basis for specificity of transglutaminase-catalyzed ϵ -(γ -glutamyl) lysine bond formation. Adv. Enzymol. 54: 1-56.
- Folk, J.E. and Finlayson, J.S. (1977) The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine cross-link and the catalytic role of the transglutaminases. Adv. Prot. Chem. 31:1-133.
- Folk, J.E., and Chung, S.I. (1973). Molecular and catalytic properties of transglutaminases. Adv. Enzymol. 38: 109-112.
- Gentile, V., Thomazy, V., Piacentini, M., Fesus, L. and Davies, P.J. (1992). Expression of tissue transglutaminase in Balb-C 3T3 fibroblast: effects on cellular morphology and adhesion. J. Cell Biol. 119: 463-474.
- Gerber, U., Jucknische, U., Putzien, S., Fuchbauer, H.L. (1994). A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. Biochem. J. 299: 825-829.
- Giri A.K. (1995). Genetic toxicology of vinyl chloride- a review. Mutation Res. 339: 1-14.
- Greenberg, C.S., Birckbichler, P.J. and Rice, R.H. (1991). Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. FASEB J. 5: 3071-3077.
- Griffin, M., Casadio, R. and Bergamini, C.M. (2002). Transglutaminase: Nature's biological glues. Biochem. J. 368: 377-396.
- Groenen, P.J.T.A., Smulders, R., Peters, R., Grootjans, J.J., Van Den Ijssel, P., Bloemendel, H., De Jang, W.(1994). The amine-donor substrate specificity of tissue-type transglutaminase influence of amino acid residues flanking the amine-donor lysine residue. Eur. J. Biochem. 220: 795-799.
- Henry, R.J., Blakeney, A.B., Harris, P.J., Stone, B.A. (1983). Detection of neutral and aminosugars from glycoproteins and polysaccharides as their alditol acetates. J. Chromatogr. 18: 256: 419-427.
- Hill S. S., Shaw B. R., Wu A.H.B. (2001). The clinical effects of plasticizers, antioxidants, and other contaminants in medical polyvinylchloride tubing during respiratory and non-respiratory exposure. Clinica Chimica Acta. 304: 1-8.
- Huber, M., Rettler, I., Bernasconi, K., Frenk, E., Lavrijsen, S.P., Ponc, M., Bon, A., Lautenschlager, S., Schorderet, D.F., Hohl, D. (1995). Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. Science. 267: 525-528.

- Joseph, D., Lanier, T.C., and Hamman, D.D. (1994). Temperature and pH Effect Transglutaminases-catalyzed “setting” of crude fish Actomyosin. J. Food Sci. 59(5): 1018-1023.
- Kanaji, T., Ozaki, H., Takao, T., Kawajiri, H., Ide, H., Motoki, M. and Shimonishi, Y. (1993). Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium sp.* strain s-8112. J. Biol. Chem. 268: 11565-11572.
- Kang, I.J., Matsumura, Y., Ikura, K., Motoki, M., Sakamoto, M., Mori, T. (1994). Gelation and gel properties of soybean glycinin in a transglutaminase-catalyzed system. J. Agric. Food Chem. 42: 59-165.
- Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H. and Suzuki, E. (2002). Crystal Structure of Microbial Transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. J. Biol. Chem. 277: 44252-44260.
- Keim, S., Hinrichs, J. (2004). Influence of stabilizing bonds on the texture properties of high-pressure-induced whey proteins gels. J. Dairy Sci. 14:355-363.
- Kester, J. J., and Fennema, O. (1986). Edible films and coatings: a review. Food Technol. 40 (12): 47-59.
- Kitabatake, N. and Doi, E. (1993). Improvement of protein gel by physical and enzymatic treatment. Food Rev. Intern. 9: 445-471.
- Krochta, J. M. and De Mulder–Johnston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. Food Technol. 51 (2): 61-74.
- Krochta, J. M. Pavlath, A. V. and Goodman, N. (1988). Edible films from casein-lipid emulsion for lightly- processed fruits and vegetables. In Engineering and Food. V.2. Preservation Process and Related Techniques, H. Schubert and W.E.L. Spiess (ed.). Elsevier Appl. Sci. Publ. Co., London, England. pp. 349-361.
- Kuncio, G., Tsyganskaya, M., Zhu, L., Liu, S.L., Nagy, L., Thomazy, V., Davies, P.J.A. and Zern, M.A. (1998). TNF- α modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. Am J Physiol. 274: 1-5.
- Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazaki, K., Susa, Y., Kuhara, C., Soeda, T. (1997). Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. J. Food Sci. 62: 488-490.
- Kuraishi, C., Yamazaki, K., and Susa, Y. (2001). Transglutaminase: its utilization in the food industry. Food Rev. Int. 17: 221-246.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head -of Bacteriophage T₄. Nature, 227: 680-985.

- Larrè, C., Chiarello, M., Dudek, S., Chenu, M., and Gueguen, J. (1993). Action of Transglutaminase on the constitutive polypeptides of Pea legumin. J. Agric. Food Chem., 41: 1816-1820.
- Lawrence, M.C., Izard, T., Beuchat, M., Blagrove, R.J. and Colman, P.M. (1994). Structure of Phaseolin at 2.2 Å Resolution. J. Mol. Biol., 238:748-776.
- Lawrence, M.C., Izard, T., Beuchat, M., Blagrove, R.J. and Colman, P.M. (1994). Structure of Phaseolin at 2.2 Å Resolution. J. Mol. Biol. 238: 748-776.
- Lesort, M., Tucholski, J., Miller, M.L. and Johnson, G.V. (2000). Tissue transglutaminase: a possible role in neurodegenerative diseases. Prog. Neurobiol. 61: 439-463.
- Levigne, S., Ralet M.C., Thibault, J.F. (2002). Characterization of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. Carbohydr. Polym. 49: 145-153.
- Levitzki, A., Willingham, M. and Pastan, I. (1980). Evidence for participation of transglutaminase in receptor-mediated endocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 706-710.
- Lewis, S.D., Janus, T.J., Lorand, L., and Shafer, J.A. (1985). Regulation of formation of Factor XIII by its fibrin substrates. Biochemistry. 24: 6772-6777.
- Lowman, A.M., Morishita, M., Kajita, M., Nagai, T., Peppas, N.A. (1999). Oral delivery of insulin using pH-responsive complexation gels. J. Pharm. Sci. 88: 933-937.
- Lu, S., Davies, P.A. (1997). Regulation of the expression of the tissue transglutaminase gene by methylation. Proc Natl Acad Sci USA. 94: 4692-4697.
- Lu. Y., and Foo, L.Y. (1997). Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. Food Chem. 59: 187-194.
- MacDougall A.J., Brett, G.M., Morris, V., Rigby, N.M., Ridout, M.J., Ring, S.G. (2001b). The effect of peptide-pectin interactions on the gelation behaviour of a plant cell wall pectin. Carbohydr. Res. 335: 115-126.
- MacDougall A.J., Needs, P.W., Rigby, N.M., Ring, S.G. (1996). Calcium gelation of pectic polysaccharides isolated from unripe tomato fruit. Carbohydr. Res. 923:235-249.
- MacDougall, A.J., Rigby, N.M., Ryden, P., Tibbits, C.W. and Ring, S. (2001a). Swelling behaviour of the tomato cell wall network. Biomacromolecules, 2: 450-455.

- Mahmoud, R., Savello, P.A. (1993). Solubility and hydrolyzability of films produced by transglutaminase catalytic cross-linking of whey protein. J. Dairy Sci. 76: 29-35.
- Mancuso, F., Calignano, A., Sorrentino, L., Esposito, C., Di Pierro, P. and Porta, R.(1994). Transglutaminase-catalyzed synthesis and pharmacological profile of 1,3-diaminopropane and spermine derivatives of substance P. In Polyamines: Biomedical and Clinical Aspects, (Caldarera C.M., Clò C., Moruzzi M.S., eds.), Clueb Ed., Bologna, pp.225-231.
- Mariniello, L., Di Pierro, P., Esposito, C., Sorrentino, A., Masi, P., Porta, R. (2003). Preparation and mechanical properties of edible pectin-soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. J. Biotech. 102: 191-198.
- Matheis, G. and Whitaker, J. R. (1987). A review: enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods. J. Food Biochem. 11: 309-327.
- Mazza, G. (1995). Anthocyanins in grapes and grape products. Crit. Rev. Food Science Nut. 35: 341-371.
- McHugh, T.H, Huksoll, C.C., Krochta, J.M. (1996). Permeability properties of fruit puree edible films. J. Food Sci. 61(1): 88-91.
- McHugh, T.H., Senesi, E. (2000). Apple wraps: a novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh cut apples. J. Food Sci. 65(3): 480-485.
- Melino, G., Piacentini, M. (1998). Tissue transglutaminase in cell death: a downstream or a multifunctional upstream effect? Febs Lett. 430: 59-63.
- Metafora, S., Peluso, G., Ravagnani, G., Gentile, V., Fusco, A., and Porta, R. (1987). Factors modulating immunocompatibility of spermatozoa: role of transglutaminase and SV-IV, one of the major protein secreted from the rat seminal vesicle epithelium. In: Morphological Basis of Human Reproductive Function (Spera G. and de Kretser D. M., eds.), Plenum Press, New York and London, pp. 187-196.
- Michon, T.; Wang, W.; Ferrasson, E.; Guéguen, J. (1999). Wheat prolamine cross-linking through dityrosine formation catalyzed by peroxidases: improvement in the modification of poorly accessible substrate by "indirect" catalysis. Biotechnol. Bioeng. 63, 449-458.
- Mikkola, H. and Palotie, A. (1996). Gene defects in congenital Factor XIII deficiency. Sem. Thromb. Haemos. 22: 393-398.
- Miller, K.S., Krochta, J.M. (1997). Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. Trends Food Sci. Technol., 8: 228-237.

- Moreas, R.A., Sales, M.P., Pinto M.S.P., Silva, L.B., Oliveira, A.E.A., Machado, O.L.T., Fernandes, K.V.S. and Xavier-Filho, J. (2000). Lima bean (*Phaseolus lunatus*) seed coat phaseolin is detrimental to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). Braz. J. Med. Biol. Res. 33: 191-198.
- Motoki, M. and Seguro, K. (1994). Trends in Japanese soy protein research. Inform. 5: 308-313.
- Motoki, M., Aso, H., Seguo, K., Nio, N. (1987). α_{s1} -Casein film prepared using transglutaminase. Agric. Biol. Chem. 51: 993-996.
- Motoki, M., Seguro, K., Nio, N., and Takinami, K. (1986). Glutamine-specific Deamidation of α_{s1} -casein by transglutaminases. Agric. Biol. Chem. 48(5): 3025-3030.
- Mulder K. F. (1998). Sustainable Consumption and Production of Plastics? Technol. Forecasting Soc. Change. 58: 105-124.
- Murthy, S.N., Valasco, P.T., Lorand, L. (1998a). Properties of purified lens transglutaminase and regulation of its transamidase/crosslinking. Exp Eye Res. 67: 273-281.
- Murthy, S.N., Wilson, J.H., Lukas, T.J., Kurrer, J., Lorand, L. (1998b) Cross-linking sites of the human tau protein, probed by reactions with human Transglutaminase. J. Neurochem. 71: 2607-26014.
- Muszbek, L., Yee, V.C., Hevessy, Z. (1999). Blood coagulation Factor XIII: structure and function. Thromb Res. 94: 271-305.
- Nakaoka, H., Perez, D.M., Jin Baek K., Das T., Husain A., Risono K., Im M.J., Graham R.M. (1994). A GTP-binding Protein with Transglutaminase Activity and Receptor signaling Function. Science 264: 1593-1596.
- Ng, J.D., Ko, T.P. and McPherson, A. (1993). Cloning, expression and crystallization of jack bean (*Canavalia ensiformis*) canavalin. Plant Physiol. 101: 713-728.
- Nielsen, P.M. (1995). Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. Food Biotechnol. 9(3): 119-156.
- Nio, N., Motoki, M., and Takinami, K. (1986)a. Gelation Mechanism of Protein Solution by Transglutaminase. Agric. Biol. Chem. 50(4): 851.854.
- Nio, N., Motoki, M., and Takinami, K. (1986)b. Gelation of Protein Emulsion by Transglutaminase. Agric. Biol. Chem. 50(6): 1409-1412.
- Noguchi K., Ishikawa K., Yokoyama, K., Ohtsuka, T., Nio, N., and Suzuki, E. (2001). Crystal Structure of Red Sea Bream Transglutaminase. J. Biol. Chem., 276 (15): 12055-12059.

- Nonaka, M., Sakamoto, H., Toiguchi, S., Kawajiri, H., Soeda, T., and Motoki, M. (1992). Sodium caseinate and skim milk gels formed by incubation with microbial transglutaminases. J. Food Sci. 57(5): 1214-1218.
- Nonaka, M., Tanaka, H., Okiyama, A., Motoki, M., Ando, H., Umeda, K., Matsuura, A. (1989). Polymerization of several proteins by Ca²⁺-independent transglutaminase. J. Food Sci. 57: 1214-1218.
- Ohlson C-G., Hardell L. (2000). Testicular cancer and occupational exposures with a focus on xenoestrogens in polyvinyl chloride plastics. Chemosphere. 40: 1277-1282.
- Osman A.A., Richter T., Stern M., Conrad K., Henker J., Brandsch C., Zimmer K.P., Mothes T. (2002). Production of recombinant human tissue transglutaminase using the baculovirus expression system, and its application for serological diagnosis of coeliac disease. Gastroenterol. Hepatol. 14: 1217-1223.
- Park, H. J., Chinnam, M. S. and Shewfelt, R. L. (1994). Edible corn-zein film coatings to extend storage life of tomatoes. J. Food Proc. Preserv. 18: 317-331.
- Parsegian, V.A., Rand, R.P., and Rau, D.C. (2000). Osmotic stress, crowding, preferential hydration and binding: A comparison of perspectives. PNAS. 97: 3987-3992.
- Parsegian, V.A., Rand, R.P., Fuller, N.L., Rau, D.C. (1986). Osmotic stress for the direct measurement of intermolecular forces. Methods Enzymol., 127: 400-416.
- Parsegian, V.A. <http://dir/nichd.nih.gov/Lpsb/docs/osmdata/osmdata.html>.
- Pasternack, R., Dorsch, S., Otterbach, J.T., Robenek, I.R., Wolf, S. and Fuchsbauer, H.L. (1998). Bacterial pro-transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. Purification, characterization and sequence of the zymogen. Eur. J. Biochem., 257: 570-576.
- Patent Application France n 8102463.
- Patent Application Japan JP 2086741. (1988).
- Patent Application Japan JP 4091750. (1990).
- Patent Application Japan JP 58149645. (1982).
- Patent Application Japan JP 61172807. (1985).
- Patent Application Japan JP 6261712 (1993).
- Patent Application U.S. 4226848 (1980).

- Patent Application WO 94/13839. (1992).
- Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H. (2000). Hydrogel in pharmaceutical formulations. *European J. Pharm. Biopharm.*, 50: 27-46.
- Peppas, N.A., Mikos A.G. (1986). Preparation methods and structure of hydrogel, in: N. A. Peppas (Ed.), *Hydrogel in medicine and pharmacy, Vol.1*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-27.
- Peugnet, I., Goubet, F., Bruyant, M.P., Thoiron, B., Morvan, C., Schols, H., Voragen, A.G.J. (2001). Solubilization of rhamnogalacturonan I galactosyltransferase from membranes of a flax cell suspension. *Planta*. 213: 435-445.
- Piacentini, M., Coalizzi, V., (1999). Tissue transglutaminase: Apoptosis versus autoimmunity. *Immunol Today* 20: 130-131.
- Piccaglia R. and Marotti M. (2001). Characterization of some italyan type of wild fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *J. Agric. Food Chem.* 49: 239-244.
- Porta, R., Esposito, C., Di Pierro, P., Mariniello, L. (2000). Brevetto Inv. Ind. Depositato. (RM 20001000015).
- Puszkin, E.G., Raghuraman, V. Catalytic properties of a calmodulin-regulated transglutaminase from human platelet and chicken gizzard (1995). *J. Biol. Chem.* 260: 16012-16020.
- Romero, J.S., Sun, R., McLeester, F., Bliss, F. and Hall, T. (1975). Heritable variation in a polypeptide subunit of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.*, 56: 776-779.
- Ryden P, MacDougall, A.J., Tibbits, C.W., Ring, S.G. (2000). Hydration of Pectic Polysaccharides. *Biopolymers*. 54: 398-405.
- Sakamoto, J. (1994). The application of Microbial Transglutaminase in Food Processing. *Food Ingredients Europe* .Abstract of session 5.
- Sathe,S.K. and Sze-tao, K.W.C. (1997). Effects of sodium chloride, phytate and tannin on *in vitro* proteolysis of phaseolin. *Food Chem.* 59:253-259.
- Schieber, A., Stintizing, F.C. and Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments. *Trends Food Sci. Tech.* 12: 401-413.
- Schmitt J. (2003). Recombinant autoantigens for diagnosis and therapy of autoimmune diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57: 261-268.
- Schols, H.A. and Voragen, A.G.J. (1994a). Occurrence of pectic hairy region in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase. *J. Carbohydr. Res.* 256: 83-95.

- Schols, H.A., Voragen, A.G.J., Colquhoun, I.J. (1994b). Isolation and characterization of rhamnogalacturonan oligomers, liberated during degradation of pectic hairy regions by rhamnogalacturonase. Carbohydr. Res. 256: 97:111.
- Schwartz, M.L., Pizzo, S.V., Hill, R.L., and McKee, P.A. (1973). Human Factor XIII from plasma and platelets. J.Biol.Chem., 248: 1395-1407.
- Selvendran, R.R., March, J.F., Ring, S.G. (1979). Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. Anal. Biochem., 96: 282-292.
- Sener, A., Dunlop, M.E., Gomis, R., Mathias, P.C., Malaisse-Lagae, F. and Malaisse, W.J. (1985). Role of transglutaminase in insulin release. Study with glycine and sarcosine methylesters. Endocrinology (Baltimore). 117: 237-242.
- Shih, F.F. (1996). Edible films from rice protein concentrate and pullan. Cereal Chem. 73: 406-409.
- Singh, R.N., Mehta, K. purification and characterization of a novel transglutaminase from filarial nematode *Brugia Malayi*. Eur. J. Biochem. 225: 625-634.
- Siu, N.C., Ma, C.Y., and Mine, Y. (2002). Physicochemical and structural properties of oat globulin polymers formed by a Microbial Transglutaminase. J. Agric. Food Chem. 50: 2660-2665.
- Sollid, L.M., Molberg, O., McAdam, S., Lundin, K.E.A. (1997). Autoantibodies in celiac disease: Tissue transglutaminase-guilt by association? Gut 41, 851-852.
- Sorrentino A., Schillberg S., Fischer R., Rao R., Porta R., and Mariniello L. (2004). Recombinant human tissue transglutaminase produced into tobacco suspension cell cultures is active and recognizes autoantibodies in the serum of coeliac patients. Int. J. Biochem. and Cell Biol. In corso di stampa.
- Sun, S. and Hall, T. (1975). Solubility characteristics of globulins from *Phaseolus* seeds in regard to their isolation and characterization. J. Agric. Food Chem. 23: 1984-1989.
- Suzuki, S., Izawa, Y., Kobayashi, Eto, Y., Yamanaka, S., Kubota, K., Yokozeki, K. (2000). Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. Biosci. Biotechnol.Biochem. 64(11): 2344-2351.
- Takada, N. and Nelson, P.E. (1983). Pectin-protein interaction in tomato products. J. Food Sci. 48: 1408-1411.
- Thakur, B.R., Singh, R.K., Handa, A. (1997). Chemistry and uses of pectins- a review. Crit. Rev. Food Sci. 37: 47-73.

- Trckova, J., Stetina, J., Kansky', J. (2004). Influence of protein concentration on rheological properties of carrageenan gels in milk. J. Dairy Sci. 14:337-343.
- Tufano, M.A., Porta, R., Farzati, B., Di Pierro, P., Rossano, F., Catalanotti, P., Baroni, A., and Metafora, S. (1996). Rat seminal vesicle protein SV-IV and its transglutaminase-synthesized polyaminated derivative SPD₂-SV-IV induce cytokine release from human resting lymphocytes and monocytes *in vitro*. Cell. Immunol. 168: 148-157.
- Utz, P.J, Anderson, P. (1998). Post-translational protein modification, apoptosis, and the bypass of tolerance to autoantigens. Arthistis Rheum. 41 (7): 1152-60.
- Villalobos, E., Santos, M., Talavera, D., Rodriguez-Falcòn, Tornè J.M (2004). Molecular cloning and characterization of a maize transglutaminase complementary DNA. Gene. 336: 93-104.
- Waldron, K.W., Smith, A.C., Parr A.J., Ng, A. and Parker, M.L. (1997). New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. Trends Food Sci. Technol. 81: 213-221.
- Washizu, K., Ando, K., Koikeda, S., Hirose, S., Matura, A., Takaji, H., Motoki, M. and Takeuchi, K. (1994). Molecular cloning of the gene for the microbial transglutaminase from *Streptovercillium* and its expression in *Streptomyces lividans*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 82-87.
- Watson, M.D., Lambert, N., Delauney, A., Croy, R.R.D., Gatehouse, J.A., Wrigh, D. and Bouler, D. (1988). Isolation and expression of a pea vicilin cDNA in the yeast *Saccaromices cerevisie*. Biochem. J. 251: 857-864.
- Whitaker, J. R. (1977a). Denaturation and renaturation of proteins. In Food Proteins, J. R. Whitaker and S. R. Tannenbaum, (Ed.). AVI Publ. Co., Westport, CT. pp. 14-49.
- Whitaker, J. R. (1977b). Enzymatic modification of proteins applicable to foods. In Food Proteins: Improvements Through Chemical and Enzymatic Modification, R. E. Feeney and J. R. Whitaker (ED.). Am. Chem. Soc. Series 160, ACS, Washington, DC pp. 95-155.
- Whitaker, J. R., and Puigserver, A. J. (1982). Fundamentals and applications of enzymatic modifications of proteins: An overwie. In Modification of Proteins. Food, Nutritional and Pharmacological Agents, R. E. Feeney and J. R. Whitaker (ED.). Am. Chem. Soc. Series 182, ACS, Washington, DC pp. 57-87.
- Winkler J, McDevitt J.P. World Patent: WO9960200. (1999).
- Yasueda, H., Kumazawa, Y., Motoki, M. (1994). Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). Biosci. Biotechnol. Biochem. 58 (11): 2041-2045.

- Yildirim, M., Hettiarachchy, N.S. (1997). Biopolymers produced by cross-linking soybean 11S globulin with whey proteins using transglutaminase. J. Food Sci. 62: 270-275.
- Yokoyama, K., Nio, N., Kikuchi, Y.(2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64: 447-454.
- Yunes A.N.A., de Antrade, M.T., Sales, M.P., Morais, R.A., Fernandes, K., V.S., Gomes, V.M. and Xavier-Filho, J. (1998). Legume Seed Vicilins (7S Storage Proteins) Interfere with the Development of the Cowpea Weevil (*Callosobruchus maculatus* (F)). J. Sci. Food Agric. 6:111-116.
- Zhang, J., Masui, Y. Role of amphibian egg transglutaminase in the development of secondary cytotstatic Factor *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 47: 302-311.
- Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J., and Bol, J. (1995). Microbial transglutaminase – a review of its production and application in food processing. Appl. Microbiol. Biotechnol. G44: 277-282.

APPENDICE A

ELENCO PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSO

Pubblicazioni

Di Pierro P., Mariniello L., **Giosafatto C.V.L.**, Masi P., and Porta R.
Solubility and permeability of edible pectin-soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. *Food Biotechnology*, in press

Comunicazioni a congresso

C.V.L. Giosafatto, L.Mariniello, S.Ring

Film forming properties of fennel polysaccharides .

Total Food 2004. Exploiting Co-Products-Minimising Waste. *Norwich Research Park, Norwich, UK, 25-28 Aprile 2004.*

Giosafatto C.V.L., Ring S, Porta R, Di Pierro P. and Mariniello L.

Preparation and characterization of cell wall pectins- based films.

X Cell Wall Meeting. Hilton Sorrento Palace Hotel, Sorrento, 29 Agosto-3 settembre 2004.

P. Di Pierro, L. Mariniello, **C.V.L. Giosafatto**, R. Villalonga and R. Porta

Transglutaminase decreases water vapor permeability and solubility of different hydrocolloid edible films.

5th international congress on chemistry and chemical engineering. International Conference Center, de La Habana, 18-22 Ottobre 2004.

COPIA DEL MANOSCRITTO IN CORSO DI STAMPA

Solubility and Permeability Properties of Edible Pectin-Soy Flour Films Obtained in the Absence or Presence of Transglutaminase

Di Pierro P.^{1,†}, Mariniello L.^{1,2,†}, Giosafatto C.V.L.², Masi P.¹ and Porta R.¹

¹ Department of Food Science, University of Naples “Federico II”, Parco Gussone, 80055 Portici, Naples, Italy

² School of Biotechnological Sciences, University of Naples “Federico II”, Portici, Naples, Italy

† These authors contributed equally to this work

Key words: Edible films, pectin, permeability, soy flour, transglutaminase.

Author for correspondence: Porta Raffaele, Department of Food Science, University of Naples “Federico II”, Parco Gussone, 80055 Portici – Naples, Italy (Tel.:+39-81-7754867; Fax: +39-81-7755116; E-mail: portaraf@unina.it)

ABSTRACT

The permeability characteristics and water-solubility of edible pectin-soy flour films obtained in the absence or presence of the enzyme transglutaminase were investigated and compared with those possessed by both the commonly used high density polyethylene film and

the biodegradable Mater-Bi® film. The soy protein transglutaminase-catalyzed crosslinking was found to determine a marked decrease in the solubility of the pectin-soy flour films both at different pH and in different denaturing conditions with respect to the films obtained in the absence of the enzyme, even though their solubility remains higher than that of the commercially available polyethylene and Mater-Bi® films. Transglutaminase treatment was also shown to significantly increase pectin-soy flour film barrier properties to oxygen, carbon dioxide and water vapour. In particular, the films obtained in the presence of the enzyme exhibited a permeability to oxygen and carbon dioxide even lower than that possessed by polyethylene films. Our results suggest a possible use of the transglutaminase polymerized pectin-soy flour films as wrapping of food products requiring a packaging allowing low gas exchange with the environment. Furthermore, the application of these films as coatings to conventional oral dosage forms could provide a viable means of delivering drugs to the colon.

INTRODUCTION

The increasing consumer demand for ready-to-eat foods having high quality and long shelf-life characteristics, requires the availability of preserved products that keep their natural and fresh appearance as long as possible and, at the same time, are safe to eat. Packaging is important for both food physical protection and the right physico-chemical conditions that are essential to obtain a satisfactory shelf-life. Thus, a proper choice of a packaging material endowed with appropriate gas and water vapour barrier properties is crucial to prevent product deterioration due to both chemical and microbiological factors, and to maintain the hygiene status despite frequent handling. The production of films with selective gas permeability is potentially of great interest for controlling gas exchanges during food storage. As it is well known, gas permeability of the film depends on several factors. Besides the chemical-physical characteristics of the gas and the environmental conditions such as temperature and relative

humidity (Gontard, et al., 1996), the composition of the material by which the film is made is extremely important. Recently, the use of edible films as packaging material has been proposed as an alternative to the chemically synthesized, biodegradable or non-degradable polymeric films and, among these, several films constituted by polysaccharides and/or proteins have been extensively studied (Guilbert, 1986; Aydt et al., 1991; Cuq et al., 1995). Some of these investigations have demonstrated that the mechanical and the barrier properties to carbon dioxide of protein-based films are better than those possessed by the polysaccharide-based films (Aydt et al., 1991; Cuq et al., 1995), whereas the latter show a more effective barrier to oxygen (Nisperos-Carriedo, 1994). It is well known that in both kinds of films electrostatic, dipole-dipole and hydrophobic interactions, as well as covalent and hydrogen bonds, are responsible for the structure of the film and, consequently for its properties. In particular, it has been established that a high degree of crosslinks decreases film permeability and solubility (Rogers, 1985). In the case of protein films, crosslinking can be accomplished either chemically or enzymatically (Fenney and Whitaker 1988). For example, proteins can be crosslinked via glutaraldehyde, but, due to its high toxicity typical of many chemical agents, its use is not recommended for preparing films for biomedical and food applications. For this reasons, edible film protein crosslinking by enzymatic tools is receiving more considerable attention lately. Many reports refer to the use of peroxidase, which has been reported to reduce both tensile strength and extensibility of films derived from thermally denatured soy or gluten (Michon et al., 1999). Another enzyme, named transglutaminase (TGase, E.C. 2.3.2.13), has also been studied to obtain films derived from different proteins of food origins, such as α_{s1} -casein (Motoki et al., 1987), whey proteins (Mahmoud and Savello, 1993; Yildirim and Hettiarachchy, 1997), 11S globulin (Yildirim and Hettiarachchy, 1997) and egg white protein (Lim et al., 1998). TGase catalyzes the introduction of ϵ -(γ -glutamyl)-lysine crosslinks into proteins. In the reaction, which causes release of ammonia, the enzyme promotes the acyl transfer of the γ -carboxamide group of glutamine into the ϵ -amino group of lysine (Folk, 1980).

Recently we reported (Mariniello et al., 2003) that the treatment with TGase improved tensile strength and extensibility of a film constituted by pectin and soy flour proteins. In this paper, we describe the experiments carried out to determine the solubility in water under different experimental conditions, as well as the barrier properties to oxygen, carbon dioxide and water vapour, of pectin-soy flour (PSF) based films obtained in the absence or presence of the enzyme.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Streptoverticillium Ca²⁺-independent TGase was obtained from Ajinomoto Co. (Japan). The enzyme was prepared by dissolving the commercial preparation in distilled water. The specific activity of the enzyme preparation was 45 U/mL as determined using the following procedure: 10, 20, 40, 80 µg of enzyme were incubated in 100 µL of 125 mM Tris-HCl, pH 8.0, in the presence of 200 µg of N, N-dimethylated casein (Sigma) and 6.5 pmoles [³H] spermidine (specific activity 15.3 nCi/pmol) (Amersham) for 1h at 37°C. One unit of TGase was defined as µg of enzyme able to incorporate 0.8 pmoles of [³H] spermidine into N,N-dimethylated casein under the described conditions. Defatted soy flour (type I), pectin USP from apple and all other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Mater-Bi® film, made of starch and biodegradable polyesters as poly-ε-caprolactone, was purchased by Novamont Spa (Novara, Italy), whereas high density polyethylene (HDPE) films were derived from common plastic bags.

Film-Making Procedure

Defatted soy flour, into which all soy seed proteins occur, was dissolved (13 mg/mL) into distilled water brought to pH 9.0 by NaOH addition. Pectin were dissolved in distilled water at a

concentration of 16 mg/mL. To obtain films with the desired ratio of each component, 4.3 mL of soy flour solution and 7 mL of pectin solution were gently mixed and HCl was added to the solution until a pH value of 4.0 was obtained. The final solution was de-aerated under vacuum before film casting to prevent pinhole formation and then transferred into polystyrene Petri dishes (60 mm x 15 mm) to be dried at 50°C overnight under air circulation. The obtained films were peeled from the Petri dishes and stored at 20°C in a desiccator (50% RH). TGase polymerized PSF films were obtained by adding 1.5 U of the enzyme to the final solution of pectin and soy flour, ensuring that the enzyme was evenly dispersed throughout the aqueous phase within 1 min.

Film thickness was measured using a micrometer model HO62 with sensitivity of $\pm 2 \mu\text{m}$ (Metrocontrol Srl, Casoria (Na), Italy). Film strips were placed between the jaws of the micrometer and the gap reduced until the first indication of contact. Mean thickness (μm) of films were determined from the average of measurements at 10 locations.

Film Solubility

Film solubility was tested both in water solutions that were buffered and contained denaturing agents. The procedure was similar to that described by Stuchell et al. (1994). Small pieces of films (20-25 mg) were dried at 70°C and 50 Torr in a vacuum oven for 24 h and then weighed in the nearest 0.0001g to determine the initial dry weight of the film. Each film piece was incubated at 25°C for 24 h in a screw-top tube (150 x 15 mm) with 10 mL of 0.1 M citrate (pH 3.0), acetate (pH 4.0), phosphate (pH 6.0) or Tris-HCl (pH 8.0) buffer solution. In different experiments, the film pieces were incubated under the same conditions in 10 mL of 10% SDS, 10% β -mercaptoethanol or 6.6 M urea. At the end of the incubation the samples were poured onto Whatman #1 qualitative filter paper. The non-dissolved material, taken off by the filter with

10 mL of distilled water, was dried at 70 °C and 50 Torr in a vacuum oven for 24 h and then weighed. The percentage of soluble matter was calculated as follows:

$$\text{Soluble matter (\%)} = (\text{initial dry weight} - \text{final dry weight}) \times 100 / \text{initial dry weight}$$

Film Water Vapour Permeability

Film water vapour permeability (WVP) was evaluated by a gravimetric test according with ASTM E96 (1993) by means of a Fisher/Payne permeability cup (Carlo Erba, Italy). Briefly, 3 g of silica gel were introduced in each cup and a disk of film sample with a diameter of about 6 cm was placed on the top of the cup and sealed by means of a ring kept in place by three tight clamps. The film area exposed to vapour transmission was 10 cm². The cups containing silica gel were weighed and then placed in a desiccator containing a saturated KCl solution which provided a constant water activity at 25°C of 0.8434. The desiccator was stored in a Heareus thermostated incubator at 25.0 ± 0.1 °C. Each 24 h the cups were weighed until a constant increase in weight was achieved. Water vapour transmission rate through the film was estimated by the linear portion of the diagram obtained by plotting weight increment of the cup as a function of time. It was assumed that steady-state was reached once the regression analysis made by using the last four data points resulted in $r^2 \geq 0.998$.

WVP was calculated from the equation:

$$\text{WVP} = X / (A \Delta p) \, dm/dt$$

where dm/dt is the slope of the cup weight vs time once steady-state was reached, X is the film thickness, A the film exposed area and Δp the water vapour pressure across the film. By assuming that the vapour pressure inside the cup, due to the presence of silica gel, can be taken

equal to zero, Δp becomes equal to vapour pressure inside the desiccator given by the product of the water activity and the vapour pressure (P_0) at 25 °C ($P_0 = 3,167$ kPa).

Film Gas Permeability

Film permeability to oxygen and carbon dioxide was examined at 30°C and 0% relative humidity by using a modified manometric method by means of the equipment schematized in Figure 1. The film sample was set in the gas transmission cell across which a differential pressure was established. The chamber "A" from the upper part of the gas transmission cell to the valve "H" was a high pressure zone, whereas the chamber "B" from the lower part of the gas transmission cell to the valve "C" was a low pressure zone.

Before each test, the equipment was equilibrated in the following way. All the valves were opened except the valves "H", "B" and "A". The valve "A" was opened to reduce the internal pressure from 100 kPa to 4 kPa in both high and low pressure zones. Then, valve "A" was closed and the valve "H" was opened until the pressure of gas (CO_2 or O_2) reached to 100 kPa. This procedure was repeated four times every twenty minutes. Both CO_2 and O_2 gases were dried by passing through a gas-drying column containing anhydrous calcium chloride before entering the system. Then, the pressure was brought back to 4 kPa, the valves "C" and "F" were closed and the gas was introduced in the chamber "A" by opening the valve "H" until the pressure reached 100 kPa. Due to the high volume of the gas reservoir occurring in the chamber "A" the upstream pressure during the test was assumed constant. The gas transmission rate through the film was determined by measuring the variation of the pressure in the chamber "B" by means of a low-pressure transducer whose sensitivity was quite high because of the low volume of the downstream chamber. It was assumed that the steady-state condition was reached once the regression analysis, made by using the last five data points, resulted in the order of $r^2 \geq 0.998$.

The gas transmission rate was determined according to the equation:

$$J = (\text{slope}/A) (V_{bp}/RT)$$

Where J was the gas transmission rate through the film [moles/day m^2], A the area of gas transmission [m^2], R the gas universal constant [$\text{kPa cm}^3/\text{moles } ^\circ\text{K}$], T the absolute temperature [$^\circ\text{K}$], V_{bp} the volume of the low pressure zone (volume between the film and the valve “C”) [cm^3], slope the slope of the linear portion of the curve representative of the pressure variation in the low pressure zone [kPa/day].

Gas permeability through the film samples P was calculated as follows:

$$P = V_m J X / (\Delta p)$$

where P has a dimension of [$\text{cm}^3 \mu\text{m}/\text{m}^2 \text{ day kPa}$], Δp (in kPa) is the gas differential pressure across the film which coincides with the gas pressure in the high pressure zone, X is the thickness of the film (in μm) and V_m is the molar volume of carbon dioxide and oxygen at STD conditions (22263 and 22393 cm^3/moles respectively).

Statistical Analysis

Pharmacologic Calculation System 4.2 (PCS) was used for all the statistical evaluations. The data were analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) and means were compared using the Newman-Keuls Test to determine the significant effect of the TGase-mediated crosslinking on the permeability and solubility properties. Differences between means were considered to be significant at $p < 0.05$.

RESULTS

The water solubility of edible PSF films, prepared in the presence or absence of TGase, was investigated after 24 h incubation both at different values of pH (Fig. 2) and in the presence of different denaturing agents (Fig. 3). Solubility studies were conducted also with HDPE and Mater-Bi® films which resulted completely insoluble in water following the two treatments tested (data not shown). A significantly lower solubility of PSF films obtained in the absence of TGase was observed at pH 4 (Fig. 2). This result is in agreement with the model of pectin–protein interaction proposed by Takada and Nelson (1983) which refers to the importance of pectin pKa and protein pI to establish the formation of electrostatic complex. Since soy protein pI is 4.5 and pKa of pectin is 3.55÷4.10, electrostatic interactions occur at pH 4.0 between the carboxyl group of pectin and ammonia groups of the polypeptide chain, thus stabilizing the network of the film and reducing its solubility.

Conversely, PSF films prepared in the presence of TGase showed a significant decrease in solubility ($p < 0.01$) compared to uncrosslinked controls following 24h incubation at the different pH (Fig. 2), certainly because of the presence of intermolecular soy protein isopeptide bonds produced by the enzyme (Mariniello et al., 2003). The solubility of the PSF films obtained in the presence of TGase resulted lower than that of the controls also following treatment with SDS and urea, and much lower after incubation in the presence of β -mercaptoethanol (Fig. 3). Similar findings were obtained by Mahmoud and Savello (1993) with TGase-polymerized whey protein films, and by Yildirim and Hettiarachchy (1997) with films containing whey proteins and soybean 11S globulin crosslinked by the enzyme. The lower solubility in β -mercaptoethanol suggests that, in agreement with Yildirim and Hettiarachchy (1997), the contribution of disulphide bonds to the film integrity is less important than both hydrophobic interactions and hydrogen bonds.

To investigate whether soy protein crosslinks produced by TGase also influence the barrier properties of PSF films, permeability to oxygen, carbon dioxide and water vapour was examined and compared to that exhibited not only by uncrosslinked PSF, but also by HDPE and Mater-Bi® films. It is well known that many factors affect the film barrier properties besides the intermolecular crosslinking. Among these the polarity and the density of the molecules constituting the film, as well as the high level of chain-to chain packing, are the most important. In fact, these factors determine the film free volume that is a measure of the interstitial space among the different molecules (Miller and Krochta 1997). The results reported in Table 1 demonstrate that the film permeability to oxygen and carbon dioxide were strongly influenced by the TGase-produced soy protein crosslinks, since the PSF films obtained in the presence of the enzyme showed a significant decrease in permeability to both gases compared to control PSF films ($p < 0.01$). In particular, we found extremely interesting that the edible PSF films obtained in the presence of TGase showed a reduced permeability to both oxygen and carbon dioxide when compared to HDPE films ($p < 0.01$). In the same manner, permeability to water vapour was founded to be influenced by TGase-mediated crosslinks, even though a modest decrease was observed. Therefore, it is reasonable to hypothesize that TGase-mediated soy protein crosslinking markedly reduces the free volume inside the PSF film thus influencing its barrier properties.

DISCUSSION

Petrochemical based plastics (polyesters, polyolefines, polyamides, etc.) have been so far extensively used as packaging materials mostly because of their availability in large amounts at low cost. Although they possess favourable mechanical and permeability properties they are totally non-biodegradable leading, thus, to a dramatic environmental pollution. As a consequence, the use of synthetic plastics in any form or shape should be more and more

restricted and, therefore, their gradual replacement with biodegradable and edible materials, especially derived from natural resources, appears not only desirable but also predictable.

There has been considerable research on development of biological films for various packaging or coating applications (Tharanathan 2003), but few have been applied commercially due to the non-competitive costs and limitations in their performance and physicochemical properties. However, among the bioplastics originated from naturally occurring biopolymers the polysaccharide/protein/lipid mixtures are very promising (Tharanathan and Saroja 2001) since they can give rise to different kinds of biodegradable and edible wraps with different characteristics so that their formulations can be tailor-made to suit to the needs of a specific commodity.

The results reported in the present paper describe the solubility and the permeability properties to water vapour, oxygen and carbon dioxide of an edible film constituted by pectin and soy flour proteins enzymatically crosslinked by TGase. Pectin, a complex anionic polysaccharide composed by alpha-1,4 linked D-galacturonic acid residues wherein the uronic acid carboxyls are either fully or partially methyl esterified, is known to produce excellent films with potential commercial uses as water soluble pouches for detergents and different medical delivery systems and devices. On the other hand, proteinaceous hydrocolloids of plant (Meixueir et al., 2000) or animal (Kaya and Kaya 2000) origin are sometimes utilized in coating formulations to supplement the nutritional value of the wrapped food. Since the degree of cohesion depends on polymer structure which determines the mechanical and the barrier properties of the resulting coating, film formation normally involves inter- and intramolecular associations of the polymer chains which form a semi-rigid three-dimensional network that entraps and immobilizes the solvent. For these reasons we thought to produce an hydrocolloid PSF film in which the occurring proteins were crosslinked by TGase, an enzyme able to produce isopeptide bonds among the soy polypeptide chains. In this way TGase appears a very promising film-forming agent which could be potentially an useful tool in biodegradable/edible packaging

of certain foods, to extend their shelf-life, and in providing drug coatings to produce conventional oral dosage forms.

In a recent investigation (Mariniello et al., 2003) we demonstrated by microstructural analyses that the PSF film obtained in the presence of TGase has a smoother surface and higher homogeneity in comparison with the PSF film obtained in the absence of enzyme, whereas studies on its mechanical properties indicated that the enzyme was able to increase film strength and to reduce its flexibility. In the present work we completed the general characterization of such a film by demonstrating that TGase-produced soy protein crosslinks decreased the water solubility and the permeability to water vapour, oxygen and carbon dioxide of PSF film. Hydrocolloids, being hydrophilic, are known to be poor moisture barriers, a property often partially compensated by lipid addition. Therefore, the major limitations of hydrocolloids in packaging, compared to the synthetic polymers, remain their relatively lower water resistance. Data reported in this study point out that TGase-treatment of our hydrocolloid films improves water resistance which is comparable to the one exhibited from synthetic films. In fact, both the reduced water vapour transmission and the decreased total soluble matter recovered after film incubation at different pH values, or in the presence of various denaturing agents, make the TGase-crosslinked PSF film quite different from the biodegradable ones so far proposed. This difference was still more evident after analysis of the barrier properties toward oxygen and carbon dioxide which resulted stronger also than those exhibited by the widely commercially used polyethylene film. Hence, to our knowledge, this is the first time that an hydrocolloid film is reported to be endowed with permeability features in the same order of magnitude of synthetic film ones. Although our data are in line with previously reported results demonstrating that a high level of crosslinks provokes a decrease in polymer permeability (Guilbert 1986), conversely, more recently Yildirim and Hettiarachchy (1997) demonstrated that the permeability to water vapour increases in biopolymers obtained with proteins modified by TGase as a consequence of the larger size of the pores generated in the film by the enzyme-produced

crosslinks. This discrepancy with our findings could be explained taking into account the concurrent presence in the film of pectin molecules which, entrapped in the protein network, might consistently reduce the size of the pores generated by TGase.

In conclusion, the results reported in the present paper suggest a possible use of the PSF films obtained in the presence of TGase as edible wraps for food packaging. In particular, because of their barrier properties they would find application to prevent quality changes in products, like meat pieces or high-moisture low sugar cakes, that require to be enveloped by films with low permeability to oxygen and carbon dioxide and moderate permeability to water vapour. Furthermore, since the use of natural hydrophilic polymers as drug carriers is receiving a growing attention especially from the viewpoint of environmental pollution and safety, TGase-crosslinked PSF films might be also considered as potential pharmaceutical coatings for a controlled release of drugs and/or macromolecules such vaccines and peptides (Bodmeier 1989). In certain circumstances, different rates of delivery as the dosage form traverses the gastrointestinal tract may be advantageous (Lemmer 1991). In fact, colonic drug delivery has important implications in a number of key therapeutic areas, including the topical treatment of colonic disorders such as irritable bowel syndrome, Crohn's disease, ulcerative colitis and carcinomas (Siew et al., 2000). The low solubility at different pH values, together with their predictable degradation when exposed to bacterial pectinolytic enzymes at the colon level (Ashford et al., 1993; Ofori-Kwakye and Fell 2001), could provide the TGase-crosslinked PSF film even as a potential coating for colonic drug delivery.

REFERENCES

- Ashford, M.; Fell, J.T.; Attwood, D.; Sharma, H.; Woodhead, P. An evaluation of pectin as a carrier for drug targeting to the colon. *J. Controlled Release* **1993**, *26*, 213-220.
- ASTM. Standard Test Method for Water Vapour Transmission of Materials. Designation: E96-93, **1993**, pp. 701-708.
- Aydt, T.P.; Weller, C.L.; and Testin, R.F. Mechanical and barrier properties of edible corn and wheat protein films. *Trans ASAE* **1991**, *34*, 207-211.
- Bodmeier, R.; Chen, H.; and Paeratakul, O. A novel approach to the oral delivery of micro- or nanoparticles. *Pharm. Res.* **1989**, *6*, 413-417.
- Cuq, B.; Aymard, C.; Cuq, J.L.; Guilbert, S. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: Formulation and functional properties. *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 1369-1374.
- Fenney, R.E.; and Whitaker, J.R. Importance of cross-linking reactions in proteins. *In Advances in Cereal Science and Technology*; Pomeranz, Y., Ed.; American Association of Cereal Chemists: St. Paul, 1988; Vol. 11, 21-46.
- Folk, J.E. Transglutaminases. *Ann. Rev. Biochem.* **1980**, *49*, 517-531.
- Gontard, N.; Thibault, R.; Cuq, B.; and Guilbert, S. Influence of relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. *J. Agric. Food. Chem.* **1996**, *44*, 1064-1069.
- Guilbert, S. Technology and application of edible protective film. *In Food Packaging and Preservation*, Matathlouthi, M. Ed.; Elsevier Science Publishers: London, 1986; 371.
- Kaya, S.; and Kaya, A. Microwave drying effects on properties of whey protein isolate edible films. *J. Food. Eng.* **2000**, *43*, 91-96.
- Lemmer, B. Circadian rhythms and drug delivery. *J. Controlled Release* **1991**, *16*, 63-74.
- Lim, L.; Mine, Y.; Tung, M.A. Transglutaminase cross-linked egg white protein films: tensile properties and oxygen permeability. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4022-4029.

Mahmoud, R.; Savello, P.A. Solubility and hydrolyzability of films produced by transglutaminase catalytic cross-linking of whey protein. *J. Dairy Sci.* **1993**, *76*, 29-35.

Mariniello, L.; Di Pierro, P.; Esposito, C.; Sorrentino, A.; Masi, P.; and Porta, R. Preparation and mechanical properties of edible pectin–soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. *J. Biotech.* **2003**, *102*, 191-198.

Meixueir, F.A.; vanGarcia, C.; and Silvestre, F. Biodegradable films from isolate of sunflower (*Helianthus Annus*) proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3032-3036.

Michon, T.; Wang, W.; Ferrasson, E.; Guéguen, J. Wheat prolamine cross-linking through dityrosine formation catalyzed by peroxidases: improvement in the modification of poorly accessible substrate by "indirect" catalysis. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *63*, 449-458.

Miller, K.S.; Krochta, J.M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **1997**, *8*, 228-237.

Motoki, M.; Aso, H.; Seguro, K.; Nio, N. α_{s1} -casein film prepared using transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 993-996.

Nisperos-Carriedo, M.O. Edible coating and films based on polysaccharides. *In Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, Krochta, J.M., Baldwin, E.A., Nisperos-Carriero, M., Eds; Technomic Publishing Company, Inc: Lancaster, 1994; 305-335.

Ofori-Kwakye, K.; and Fell, J.T. Biphasic drug release: the permeability of films containing pectin, chitosan and HPMC. *Int. J. Pharm.* **2001**, *226*, 139-145.

Rogers, C.E. Permeation of gases and vapours in polymers. *In Polymer Permeability*, Comyn, J., Ed; Elsevier Applied Science Publishers: London, 1985; 11-73.

Siew, L.F.; Basit, A.W.; Newton, J.M. The properties of amylose-ethylcellulose films cast from organic-based solvents as potential coatings for colonic drug delivery. *Eur. J. Phar. Sci.* **2000**, *11*, 133-139.

Spiess, W.E.L.; Wolf, W. Critical evaluation of methods to determine moisture sorption isotherms. *In Water activity: Theory and applications in food*, Rockland, L.B., Beuchat, L.R., Eds; Academic Press.: New York, 1987; 215–233.

Stuchell, Y.M.; Krochta, J.M. Enzymatic treatment and thermal effects on edible soy protein films. *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 1332-1337.

Takada, N.; and Nelson, P.E. Pectin-protein interaction in tomato products. *J. Food Sci.* **1983**, *48*, 1408-1411.

Tharanathan, R.N.; and Saroja, N. Hydrocolloid-based packaging films—alternate to synthetic plastics. *J. Sci Ind. Res.* **2001**, *60*, 547-559.

Tharanathan, R.N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Sci. and Technol.* **2003**, *14*, 71-78.

Yildirim, M.; Hettiarachchy, N.S. Biopolymers produced by cross-linking soybean 11S globulin with whey proteins using transglutaminase. *J. Food Sci.* **1997**, *62*, 270-275.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Scheme of the manometric equipment used to determine the permeability of the films to Oxygen and Carbon dioxide. Further details are reported in the text

FIG. 2. Total soluble matter (% dry weight) recovered after 24 h incubation at different pH of PSF films obtained in the absence (■) or presence (□) of TGase.

The results are expressed as means of ten replicates \pm standard error. * PSF with TGase film vs PSF without TGase film significant at $p < 0.01$. Further experimental details are given in the text.

FIG. 3. Total soluble matter (% dry weight) recovered after 24 h incubation in different denaturing agents of PSF films obtained in the absence (■) or presence (□) of TGase.

The results are expressed as means of ten replicates \pm standard error. * PSF with TGase film vs PSF without TGase film significant at $p < 0.01$. Further experimental details are given in the text.

Table 1

Barrier properties of the tested films

Film	Thickness (μm)	Permeability ($\text{cm}^3 \mu\text{m m}^{-2} \text{day}^{-1} \text{kPa}^{-1}$)		
		Oxygen	Carbon dioxide	Water vapour
HDPE	11,2 \pm 0.3	60.1 \pm 12.4	117.4 \pm 11.3	13.5 \pm 1.0
Mater-BI®	12,8 \pm 0.6	721.5 \pm 24.0	1354.6 \pm 8.4	1961.4 \pm 12.3
PSF	79.3 \pm 2.3	449.8 \pm 23.6	854.3 \pm 14.4	549.5 \pm 13.8.
PSF + TGase	94.8 \pm 3.3	38.5 \pm 4.2 ^{a, b, c}	74.6 \pm 6.1 ^{a, b, c}	316.3 \pm 22.46 ^{a, b, c}

The results are expressed as means of ten replicates \pm standard deviation.

^a “PSF + TGase” vs “HDPE” significant at ($p < 0.01$);

^b “PSF + TGase” vs “Mater-BI®” ($p < 0.01$);

^c “PSF + TGase” vs PSF ($p < 0.01$). Experimental details are given in the text.

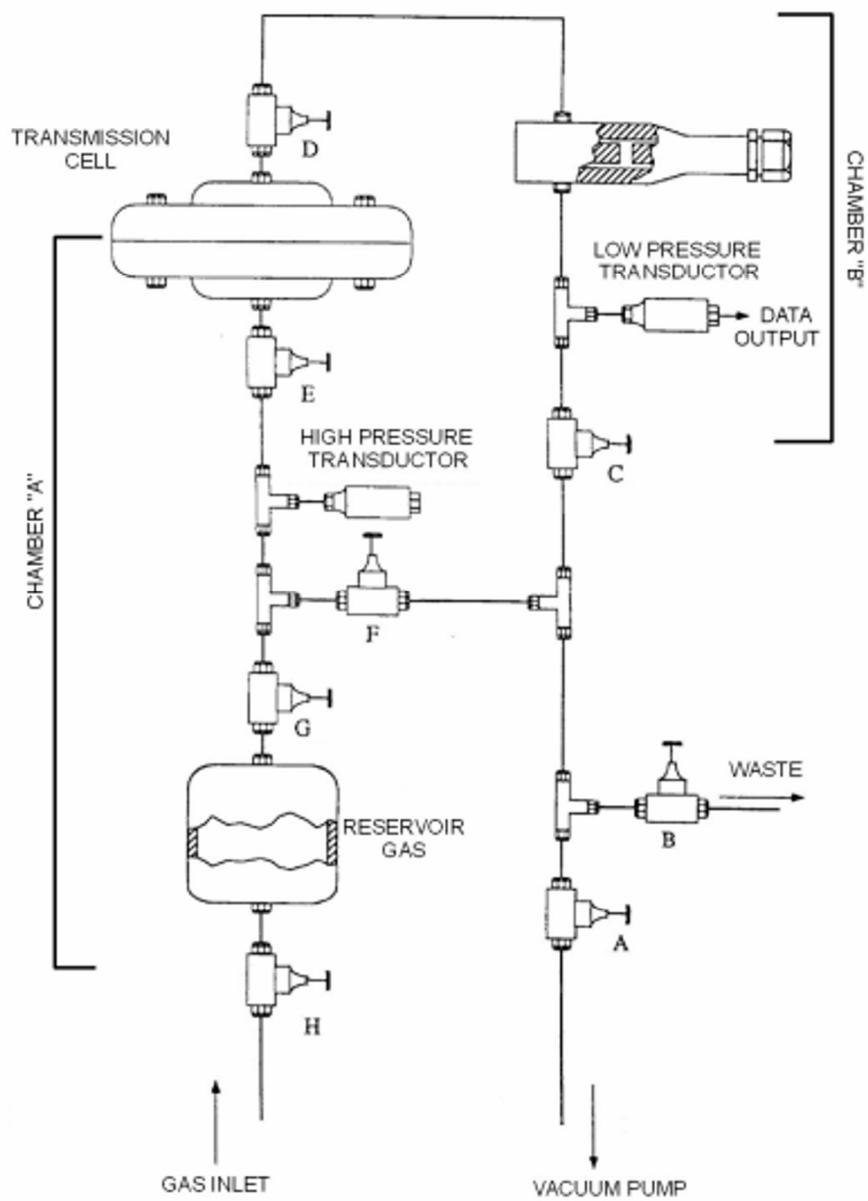


Figure 1

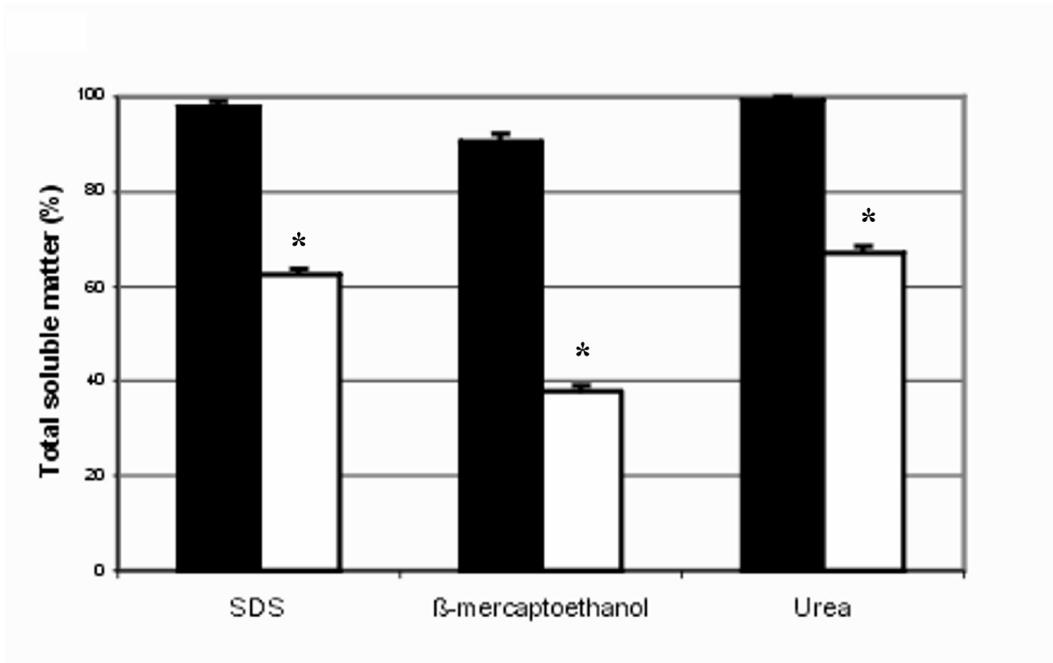


Figure 2

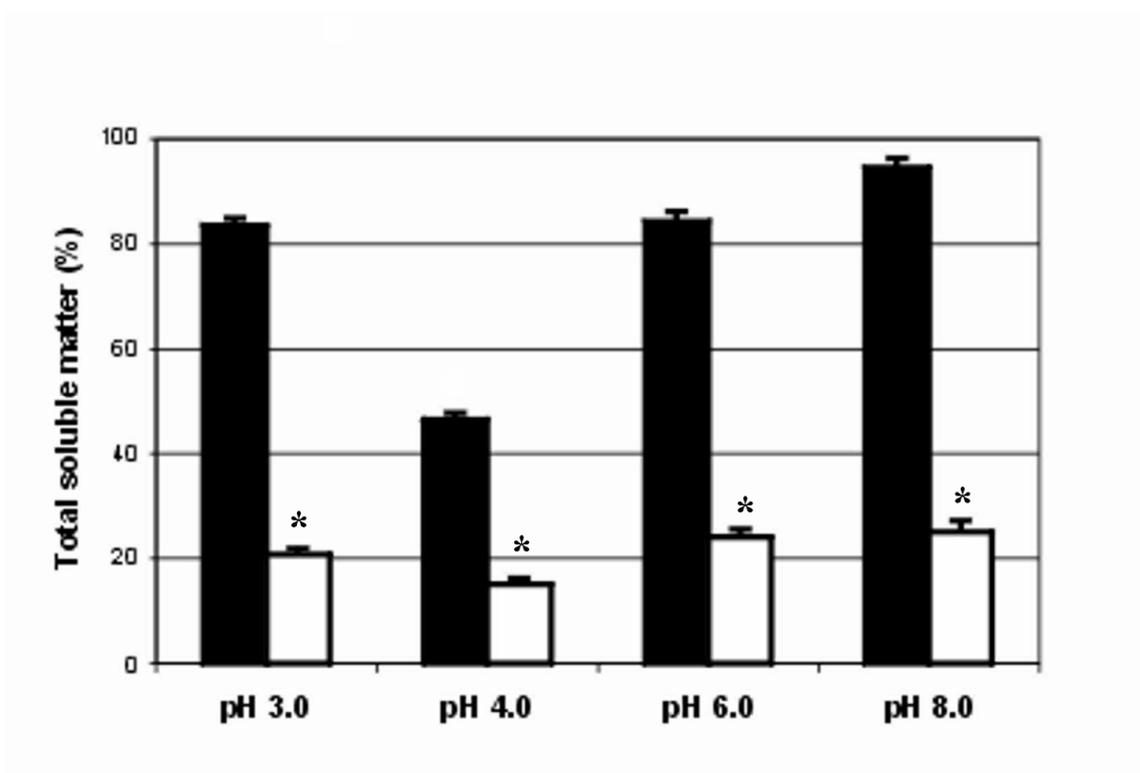


Figure 3