

Analisi comparativa degli Enzimi di *Inonotus obliquus* (Chaga), *Auricularia auricula* e di *Poria cocos*

Professor Amin Karmali,

Centro di Ricerca di Ingegneria chimica e Biotecnologia

Dipartimento di Ingegneria Chimica dell'Istituto Superiore di Ingegneria di Lisbona (ISEL),

Istituto Politecnico di Lisbona, Portogallo

- akarmali@deq.isel.pt

Introduzione

L'infiammazione è una risposta immunitaria fisiologica a traumi, infezioni, lesioni tissutali, o stimoli nocivi. Durante tale processo, le cellule flogistiche attivate, come le neutrofili, eosinofili, fagociti mononucleati e i macrofagi, incrementano la secrezione di ossido nitrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2) e di citochine.

Tre le funzioni principali delle cellule macrofagiche nel processo infiammatorio: presentazione dell'antigene, fagocitosi, immunomodulazione attraverso la produzione di diverse citochine e fattori di crescita. Di conseguenze il loro ruolo è cruciale nell'iniziare, conservare e risolvere l'infiammazione⁽¹⁾.

Si ha stress ossidativo quando l'equilibrio si sbilancia a favore delle specie ossigeno-reattive (ROS) risultato dell'esaurimento degli agenti anti-ossidanti. Questa iperproduzione di ROS può causare danno ossidativo alle biomolecole (lipidi, proteine, DNA) e potrebbe essere la causa di malattie croniche come arteriosclerosi, cancro, diabete, artrite reumatoide, infiammazioni croniche, infarto, dell'invecchiamento e di altre malattie degenerative negli esseri umani. Il danno ossidativo è impedito da un sistema difensivo che include antiossidanti, enzimatici e non. Gli antiossidanti, come il superossido dismutasi, il catalasi, e il glutazione perossidasi⁽²⁾, sono ampiamente usati come indicatori di stress ossidativo. Per diversi millenni i funghi hanno fatto parte della nostra alimentazione: sono una fonte molto ricca di enzimi, metaboliti secondari, vitamine, minerali, proteine, polisaccaridi, hanno un alto contenuto di fibre e pochi grassi. Contengono diverse molecole bioattive, come i terpenoidi, gli steroidi, i fenoli, i nucleotidi, i derivati di glicoproteine, peptidi, e polisaccaridi legati e non legati alla proteina. Di conseguenza, sono stati considerati fonte potenziale di attività antiossidante e anti-infiammatoria⁽³⁾.

Come già trattato nel volume IV di questa stessa Rivista, da più di un secolo è noto che alcuni enzimi possono essere usati sia per prevenire sia per trattare alcune condizioni cliniche gravi.

La biomassa dei funghi ha fatto rilevare un'importante attività enzimatica di miglioramento del sistema immunitario. Tali enzimi sono divisi nelle seguenti attività:

a) Enzimi che prevengono lo stress ossidativo:

Superossido dismutasi

b) Enzimi che prevengono la crescita cellulare:

Proteasi, glucoamilasi

c) Enzimi che favoriscono la disintossicazione:

Perossidasi, Citocromo P-450

Obiettivi

Il presente studio intende studiare sia i livelli di enzimi e di diversi metaboliti secondari coinvolti nella coagulazione sia gli agenti anti-ossidanti presenti nella biomassa dell'*Inonotus obliquus* (Chaga), dell'*Auricularia auricula* e del *Poria cocos* in presenza e in assenza di enzimi proteolitici.

Sono stati studiati i seguenti parametri antiossidanti: perossidasi, glucoamilasi, glucosio 2 ossidasi superossido dismutasi, citocromo P-450, citocromo P-450 redattasi, catalasi, proteasi, glutazione

perossidasi, livelli di glutazione e metaboliti secondari in tutte le frazioni di funghi⁽¹⁾

Commenti

I dati ottenuti hanno rivelato che tutti i prodotti dei funghi testati contengono significativi livelli di diversi enzimi differenti e metaboliti secondari, inclusi gli inibitori della trombina.

La simulazione del tratto gastro-intestinale è stata condotta in presenza e in assenza di pepsina e di tripsina, rivelando che la presenza di queste proteasi non riduceva i livelli di diversi enzimi e di metaboliti secondari in modo significativo. Per quanto concerne i metaboliti secondari, tutti i prodotti dei funghi testati mostravano un alto livello di inibitori della trombina. I risultati ora ottenuti suggeriscono che questi funghi sono una fonte ricca di agenti anti-ossidanti, in grado di proteggere l'organismo dagli effetti dannosi del ROS.

Conclusioni

I dati presentati in questo studio provano che i prodotti dei funghi testati sono una ricca fonte di enzimi e di metaboliti secondari, inclusi gli agenti antiossidanti che inattivano i ROS.

Inoltre, gli immunonutrienti dei miceli e dei primordi (giovani corpi fruttiferi) presenti nella biomassa dell'*Inonotus obliquus* (Chaga), dell'*Auricularia auricula* e del *Poria cocos* sono resistenti agli enzimi proteolitici (vale a dire, la simulazione del tratto digestivo) essendo in una biomassa e non in un estratto cellulare.

1. Debnath, T., Park, S.R., Kim, D.H., Jo, J.E., Ou Lim, B. Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Activities of *Inonotus obliquus* and Germinated Brown Rice Extracts, *Molecules* 2013, 18, 9293-9304

2. Song, F-Q, Liu, Y., Kong, X-S, Chang, W, Song, G. MINI-REVIEW

Progress on Understanding the Anticancer Mechanisms of Medicinal Mushroom: *Inonotus Obliquus*, *Asian Pacific J Cancer Prev*, 2013, 14, 1571-1578.

3. Silva S, Martins S, Karmali A, Rosa E. Production, purification and characterization of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* with antitumour activity by *J Sci Food Agric*. 2012 ;92(9):1826-32.

4. Mölleken, H., Nitschke, J., Modick, H., Malolepszy, T., Altenbach, H.-J. A new colorimetric method to quantify β -1,3-1,6-glucans in comparison with total β -1,3-glucans and a method to quantify chitin in edible mushrooms *Food chemistry* 127 (2011), 791-796.

5. Semedo MC, Karmali A, Fonseca L. A high throughput colorimetric assay of β -1,3-D-glucans by Congo red dye. *J Microbiol Methods*. 2015, 109, 140-148.

6. Freixo, M.R., Karmali, A., Frazão, C. and Arteiro, J. M., Production of laccase and xylanase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and their chromatographic behaviour on immobilized metal chelates *Process Biochem*, (2008), 43, 1265-1274.

7. Karmali, A. and Coelho, J. Bioconversion of D-glucose into D-glucosone by Glucose 2-Oxidase from *Coriolus versicolor* at Moderate Pressures, (2011) *Applied Biochemistry and Biotechnology* 163:906-917.

8. Rout D, Mondal S, Chakraborty I, Islam SS The structure and conformation of a water-insoluble (1 $\rightarrow$ 3 $\rightarrow$ 6 $\rightarrow$ 1)- β -D-glucan from the fruiting bodies of *Pleurotus florida*. *Carbohydr Res*. 2008 ; 343(5):982-7.

9. Ojha AK, Chandra K, Ghosh K, Islam SS. Glucans from the alkaline extract of an edible mushroom, *Pleurotus florida*, cv Assam Florida: isolation, purification, and characterization.. *Carbohydr Res*. 2010 ; 345(15):2157-63

Analisi comparativa degli Enzimi di *Inonotus obliquus* (Chaga), *Auricularia auricula* e di *Poria cocos*

	<i>Inonotus obliquus</i> (Chaga)	<i>Auricularia auricula</i>	<i>Poria cocos</i>
Contenuto di proteina	49,5 mg	54,8 mg	59,3 mg
Perossidasi	35,8 mU	31,5 mU	39,5 mU
Glucoamilasi	5,9 U	4,3 U	4,1 U
Glucosio 2 ossidasi	7,2 mU	4,9 mU	6,9 mU
Superossido dismutasi	975 U	487,5U	446,9 U
Citocromo P-450	2,9 nmole	2,1 nmole	2,5 nmoli
Citocromo P-450 riduttasi	10,2 mU	8,5 mU	9,8 mU
Catalasi	18,1 mU	15,3 mU	21,5 mU
Proteasi	29,5 mU	27,1 mU	31,3 mU
Glutazione perossidasi	25,6 mU	18,5 mU	25,9 mU
Livelli di Glutazione (ug/g)	30,3	32,5	19,1
Metaboliti Secondari (Inibitori della trombina %)	7,80%	5,70%	6,30%

Tabella I -Differenze comparative in contenuto di enzimi tra *Inonotus obliquus* (Chaga), *Auricularia auricula* e *Poria cocos*. (Assenza di tripsina e di pepsina)

	<i>Inonotus obliquus</i> (Chaga)	<i>Auricularia auricula</i>	<i>Poria cocos</i>
Contenuto di proteina	41,4 mg	48,9 mg	52,6 mg
Perossidasi	30,9 mU	27,7 m U	35,1 m U
Glucoamilasi	4,8 U	3,9 U	3,7 U
Glucosio 2 ossidasi	5,9 m U	4,2 m U	5,1 m U
Superossido dismutasi	965,8 U	479,3 U	440,1 U
Citocromo P-450	2,4 nmole	1,8 nmole	2,1 nmole
Citocromo P-450 riduttasi	8,9 m U	7,1 m U	7,1 m U
Catalasi	16,8 m U	12,8 m U	17,5 m U
Proteasi	23,9 m U	25,7 m U	28,1 m U
Glutazione perossidasi	21,8 m U	15,1 m U	21,1 m U
Livelli di Glutazione (ug/g)	29,5	30,1	18,1
Metaboliti Secondari (Inibitori della trombina %)	6,90%	4,70%	5,90%

Tabella II - Differenze comparative in contenuto di Enzimi tra *Inonotus obliquus* (Chaga), *Auricularia auricula* e *Poria cocos* in presenza di pepsina.

	<i>Inonotus obliquus</i> (Chaga)	<i>Auricularia auricula</i>	<i>Poria cocos</i>
Contenuto di proteina	43,7 mg	51,3 mg	53,1 mg
Perossidasi	32,7 mU	28,9 m U	32,9 m U
Glucoamilasi	5,3 U	4,2 U	3,9 U
Glucosio 2 ossidasi	6,3 m U	4,4 m U	6,2 m U
Superossido dismutasi	871,8 U	485,3 U	442,5 U
Citocromo P-450	2,6 nmole	1,9 nmole	2,3 nmole
Citocromo P-450 riduttasi	9,4 m U	7,5 m U	7,9 m U
Catalasi	15,4 m U	13,8 m U	19,8 m U
Proteasi	25,8 U	24,8 m U	28,8 m U
Livelli di Glutazione (ug/g)	23,1 m U	16,7 m U	22,5 m U
Metaboliti Secondari (Inibitori della trombina %)	31,1	30,9	19,5
Secondary metabolite (Thrombin inhibitors %)	7,10%	5,30%	6,10%

Tabella III Differenze comparative in contenuto di enzimi tra *Inonotus obliquus* (Chaga), *Auricularia auricula* e *Poria cocos* in presenza di tripsina

Note: un'unità di enzima (U) è definita come la quantità di enzimi richiesti per convertire un micromole di substrato in prodotto per minuto in determinate condizioni sperimentali. Un'unità milli-enzima (mU) è definita come la quantità di enzima necessario per convertire una nanomole di substrato in prodotto per minuto in determinate condizioni sperimentali.

Le Biomasse di *Inonotus obliquus* (Chaga), *Auricularia auricula* e di *Poria cocos* sono state fornite dai Laboratori di Ricerca Micologica Ltd-United Kindom (www.mycologyresearch.com)