



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO

**SCIENZE DEI SISTEMI AGRARI E FORESTALI E DELLE
PRODUZIONI ALIMENTARI XXII CICLO**

Indirizzo: Biotecnologie microbiche agroalimentari
(Coordinatore di Indirizzo: Prof. G. A. Farris)

**Ruolo delle Peptidasi dei LAB nell'idrolisi delle
Gliadine Antigeniche e di Peptidi derivanti dal
33-mer**

Direttore della Scuola: **Prof. Pietro Deidda**

Relatore:

Prof. Giovanni Antonio Farris

Correlatore:

Dr. Franco Carta

Dottoranda

D.ssa Mariangela Stefania Fiori

Anno Accademico 2008-2009

INDICE

<u>INDICE</u>	pag. ii
<u>INTRODUZIONE</u>	pag. 5
<u>LA CELIACHIA</u>	
Definizione e Prevalenza	pag. 8
Eziopatogenesi	pag. 12
Aspetti clinici	pag. 18
Patologie associate	pag. 21
Immunogenicità della gliadina	pag. 22
Possibilità terapeutiche	pag. 29
<u>IL FRUMENTO</u>	
Origine, storia e caratteristiche	pag. 32
Proteine	pag. 34
Albumine, globuline e triticine	pag. 35
Gliadine e Glutenine	pag. 36
Gliadine	pag. 37
Glutenine	pag. 40
Subunità ad alto peso molecolare (HMW-GS)	pag. 41
Subunità a basso peso molecolare (LMW-GS)	pag. 42
<u>IL PANE</u>	
Pane e prodotti da forno	pag. 46
Lievitazione degli impasti	pag. 47
Fermentazione con lievito compresso	pag. 47
Fermentazione con lievito naturale	pag. 48
Fermentazione con lievito e lievito compresso	pag. 48
Fermentazione con colture starter	pag. 49

<u>IL LIEVITO NATURALE</u>	
Preparazione del lievito naturale	pag. 50
Origine, selezione e dinamica dei microrganismi del lievito naturale	pag. 51
Fattori che influenzano i rapporti tra le specie microbiche del lievito naturale	pag. 53
Caratteristiche e ruolo dei lieviti e dei batteri lattici del lievito naturale	pag. 54
Interazione tra lieviti e batteri lattici delle paste acide	pag. 56
Aspetti nutrizionali delle paste acide	pag. 57
La conversione dei prodotti tossici	pag. 59
<u>I BATTERI LATTICI NEL LIEVITO NATURALE E LORO METABOLISMO</u>	pag. 60
Inquadramento dei batteri lattici	pag. 61
Metabolismo degli zuccheri	pag. 62
Sistema proteolitico	pag. 65
<u>LA PROTEOMICA</u>	pag. 71
Spettrometria di massa	pag. 74
Identificazione delle proteine attraverso la Spettrometria di massa	pag. 76
<u>SCOPO DEL LAVORO</u>	pag. 77
<u>MATERIALI E METODI</u>	pag. 79
<u>RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	pag. 93
<u>CONCLUSIONI</u>	pag. 126
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	pag. 130

INTRODUZIONE

La nozione che il grano possa essere nocivo per molti individui si è fatta strada con notevole difficoltà sia in ambito scientifico che nella cultura occidentale.

Non è stato facile, infatti, attribuire proprietà tossiche ad una sostanza contenuta in alimenti che hanno costituito per secoli una delle fonti primarie nell'alimentazione dell'uomo (Auricchio *et al.*, 1988, 1997, 2004). In realtà si ritiene che nell'ultimo secolo diversi fattori abbiano fatto emergere il problema dell'intolleranza al glutine. In primo luogo, nell'era agroindustriale il contenuto di glutine nella farina è aumentato notevolmente. Sono stati selezionati, infatti, i semi in grado di conferire alla farina eccellenti proprietà di panificazione, qualità che risulta essere migliorata dall'elevato contenuto in glutine. Con queste premesse diventava relativamente comune una condizione che si presentava dopo le prime somministrazioni di frumento allo svezzamento, caratterizzata da un danno della mucosa intestinale, da malassorbimento, da diarrea e da un difetto di crescita (Maki *et al.*, 1997). Questi sintomi sono stati associati ad una patologia la Celiachia, definibile come uno stato infiammatorio della mucosa del piccolo intestino che si sviluppa in soggetti geneticamente predisposti in seguito all'ingestione di una proteina del frumento, la gliadina e di proteine ad essa correlate (dette prolamine) presenti in altri cereali, tanto che generalmente ci si riferisce a questa patologia come ad un'enteropatia glutine dipendente definita anche come un'infezione da glutine.

Verso la fine del secolo scorso, mentre si iniziava ad accettare il concetto che alcuni individui non tollerassero il glutine, diventavano più rari i casi con i classici sintomi intestinali della malattia, anche grazie alle mutate condizioni igienico-ambientali. E' stata, allora, suggerita l'ipotesi che i nuovi celiaci potessero superare in modo silente i disturbi classici gastrointestinali e sviluppare manifestazioni molto diverse in seguito ad una prolungata esposizione al glutine.

Oggi la celiachia è considerata una problematica sociale tanto che è stata varata la legge n.123 del 4 luglio 2005 in cui sono codificate le norme per la protezione dei soggetti malati di celiachia. In breve, la legge prevede l'attuazione di provvedimenti mirati ad effettuare precocemente la diagnosi della malattia, a migliorare le modalità di cura dei cittadini celiaci, ad agevolare l'inserimento di questi nelle attività scolastiche, sportive e lavorative attraverso un accesso equo e sicuro ai servizi di ristorazione collettiva, a migliorare l'educazione sanitaria della popolazione sulla malattia celiaca, a favorire l'educazione sanitaria del cittadino celiaco e della sua

famiglia e ad effettuare la diagnosi precoce e la prevenzione delle complicanze della malattia celiaca.

E' ormai noto, infatti, che la prolungata esposizione al glutine porti ad un aumentato rischio di sviluppare altre patologie che vanno ad aggravare il quadro clinico del soggetto celiaco.

Tra queste una delle prime associazioni descritte è stata quella con il diabete autoimmune (Savilahti *et al.*, 1986; Pocecco *et al.*, 1995). Molte evidenze hanno dimostrato che non si tratta semplicemente della coincidenza di due malattie, ma che proprio l'esposizione prolungata al glutine può avere un ruolo determinante nel rischio di sviluppare tale malattia (Ventura *et al.*, 1999). In seguito la stessa associazione è stata descritta per altre malattie autoimmuni ed oggi la celiachia comincia ad essere considerata primariamente un disturbo del funzionamento immune legato all'assunzione di glutine (Ventura *et al.*, 2002).

Recentemente è stata posta molta attenzione al ruolo cardine di un particolare gruppo di batteri, i lattobacilli ed un loro utilizzo come starter in impasti fatti in modo tradizionale, acqua e farina, per la produzione dei prodotti da forno, in particolare per la produzione del pane (Di Cagno *et al.*, 2002, 2004, 2005).

Scopo di questo lavoro è stato quindi quello di valutare l'attività proteolitica dei batteri lattici, che, quando inoculati in impasti di acqua e farina, potrebbero avere la capacità di degradare i peptidi tossici della gliadina, ricercando quindi una possibile correlazione tra l'utilizzo di batteri lattici autoctoni (isolati da madri acide della Sardegna) per la produzione di un pane che potrebbe essere tollerato dai pazienti celiaci.

Il lavoro si è sviluppato in una prima fase, con la messa a punto delle metodiche di studio e, in una seconda fase, con lo studio dell'attività proteolitica dei batteri lattici sia in impasto, sia direttamente a contatto con i peptidi tossici derivati dalla gliadina.

LA CELIACHIA

Definizione e prevalenza della celiachia

La prima descrizione clinica dettagliata della malattia celiaca (CD) risale al 1888, ma solo dalla metà del secolo scorso si sa che si tratta di una patologia scatenata da una particolare classe di proteine.

La celiachia è definibile come uno stato infiammatorio della mucosa del piccolo intestino (più marcato a livello prossimale) che si sviluppa in soggetti geneticamente predisposti in seguito all'ingestione di una proteina costituente del frumento, la gliadina, e di proteine ad essa correlate (dette prolamine) presenti anche in altri cereali quali orzo e segale, tanto che generalmente ci si riferisce a questa patologia come ad un'enteropatia glutine dipendente.

La malattia è il risultato di complesse interazioni tra fattori intrinseci (genetici) e fattori estrinseci (ambientali) responsabili del danno flogistico alla mucosa intestinale (Fig.1); il danno in particolare deriva dall'attivazione di una risposta immunitaria diretta contro la gliadina, di una risposta autoimmunitaria nei confronti di una proteina self tissutale (transglutaminasi) che interagisce con la gliadina non appena questa ha superato la barriera intestinale ed, infine da una probabile tossicità diretta sugli enterociti da parte della gliadina stessa. In seguito all'esposizione del glutine, nei soggetti celiaci, la normale conformazione dei villi con cripte poco profonde ed una normale infiltrazione linfocitaria nella mucosa, evolve in un'aumentata infiltrazione dei linfociti con successiva ipertrofia delle cripte, fino a raggiungere un grado estremo che si presenta con l'atrofia totale dei villi (Fig. 2).

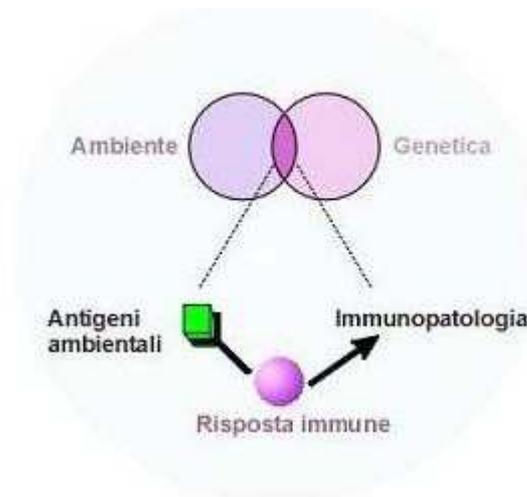


Fig. 1. Interazione ambiente-genetica responsabile della patogenesi della celiachia.



Fig. 2. Sezione di intestino sano (sinistra) e intestino colpito da celiachia (destra), visto al SEM

Descritta fino a non molto tempo fa come una malattia rara, oggi si può affermare che la celiachia è una delle malattie geneticamente determinate più frequenti (Fasano *et al.* 2001; Fornaroli *et al.* 2003; Cerf-Bensussan *et al.* 2003), interessando un soggetto su 100-300 nella popolazione generale (Kolho *et al.*, 1998; Berti *et al.*, 2000) considerata un vero e proprio fenomeno sociale. La celiachia è una patologia molto frequente con una prevalenza di un caso ogni 100-150 soggetti e con una distribuzione praticamente ubiquitaria nel mondo.

Le uniche aree geografiche in cui tale patologia sembra ancora poco frequente sono la Cina, la Malesia, le Filippine e l'Indonesia, verosimilmente per il tipo di dieta consumata, ove notoriamente il consumo di cereali con glutine è molto scarso (Van Hee *et al.*, 2006). In Sardegna la prevalenza della malattia celiaca valutata in una popolazione pediatrica è di 1:100/1:70 (Meloni *et al.*, 1999) (Fig. 3).

Saharawi	23.0 %
Sardegna	22.4 %
Ireland	22.0 %
Tunisia	21.3 %
Morocco	17.3 %
Norway	13.8 %
Algeria	11.7 %
UK	11.5 %
Danish	11.3 %
France	11.0 %
Czech R	10.8 %
Finland	10.7 %
Sweden	10.6 %
Italy	10.0 %
Spain	9.7 %
Turkey	9.4 %
Bulgaria	8.0 %
Germany	7.7 %
Creta	7.4 %
Greece	4.0 %

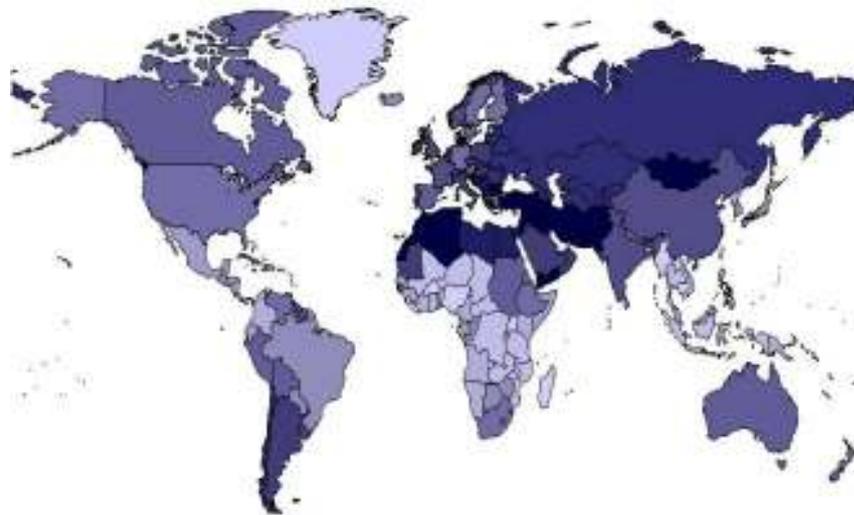


Fig. 3.

Distribuzione e Frequenza Genica del DR3-DQ2

Sono stati individuati due picchi di incidenza, il primo compreso tra il 1° e 5° anno di vita e il secondo tra il 20° ed il 50° anno. Il rapporto maschi-femmine è di 1-2,5 (Mearin *et al.*, 2005). La prevalenza della malattia può variare da regione a regione, ma attualmente essa risulta essere elevata non solo, come già noto, nei paesi europei, ma anche negli U.S.A. e nel sud America dove l'intolleranza al glutine sembrava essere rara (Guandalini 2000).

Naturalmente la prevalenza di celiachia è maggiore in categorie considerate a rischio: i soggetti affetti da Diabete Mellito Tipo 1 (DMT1) hanno una percentuale di malattia che varia dal 1,3% al 19% a seconda delle casistiche (Auricchio *et al.*, 1988; Cronin *et al.*, 1997; Acerini *et al.*, 1998), ed il rischio di malattia nei familiari di pazienti celiaci è di alcune volte superiore a quello della popolazione generale (5-10% nei parenti di I e II grado) (Hill e Fasano, 2000).

Da questi dati appare evidente come la celiachia sia una patologia ampiamente diffusa; è importante tuttavia sottolineare come le diagnosi finora effettuate non sono altro che la punta di un iceberg e numerosi sono i casi che sono diagnosticati con estremo ritardo.

Quanto detto è esemplificato nel modello, introdotto da Logan nel 1992, della celiachia rappresentata come un iceberg (Fig. 4). In questo modello la reale prevalenza della malattia può essere considerata come l'intero iceberg, le cui dimensioni sono influenzate dalla frequenza della predisposizione genetica nella popolazione (i geni primariamente coinvolti sono quelli HLA di classe II, in particolare HLA DQ2 e DQ8) e dalla definizione di patologia (che comprende anche soggetti con lieve sensibilità al glutine e soggetti con celiachia latente o potenziale). Dell'intero "iceberg celiachia" un certo numero di casi sono diagnosticati grazie alla presenza dei sintomi della malattia o per altre ragioni (per esempio la familiarità per celiachia); questi casi sono però solo una ridotta percentuale e sono rappresentati dalla parte emergente dell'iceberg. La parte sommersa (che ne rappresenta la gran parte) è costituita dall'insieme di quei casi di celiachia che ancora aspettano una diagnosi a causa delle loro manifestazioni atipiche.

In questo modello la "linea dell'acqua", cioè il rapporto tra parte diagnosticata e non diagnosticata, si può ovviamente spostare, facendo emergere una maggiore quota dell'iceberg, ma questo dipende da molti fattori:

- a. la consapevolezza della malattia (intesa come capacità di sospettare la stessa),
- b. la disponibilità di strumenti diagnostici semplici e poco costosi,
- c. la variabilità delle manifestazioni cliniche che comprendono forme apparentemente del tutto asintomatiche.

Il problema di queste "mancate diagnosi" è legato soprattutto al fatto che la presentazione classica della malattia con sintomi gastrointestinali (diarrea cronica, dolori addominali ricorrenti, anoressia, ecc) è ormai relativamente rara, mentre la presentazione "extraintestinale" con sintomi atipici e subdoli (dermatite erpetiforme, anemia sideropenica, stomatite aftosa ricorrente, ecc) risulta 15 volte più frequente, rendendo la diagnosi estremamente difficile e impegnativa.

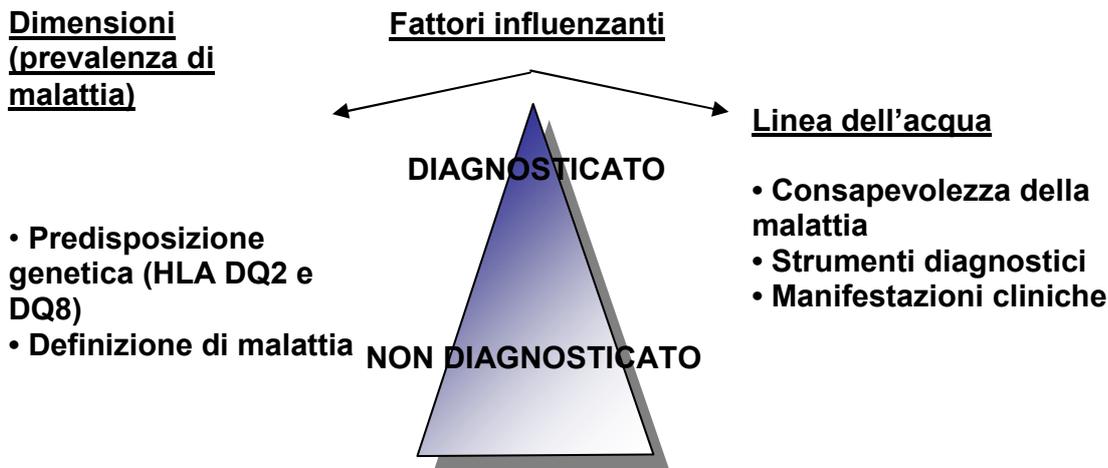


Fig. 4. Modello ad iceberg della celiachia.

L'unico trattamento finora proposto è l'attuazione di una dieta priva di glutine (GFD, *Gluten Free Diet*). La dieta porta alla remissione del danno alla mucosa, che riacquista così le sue caratteristiche fisiologiche e protegge dal rischio di sviluppare altre patologie autoimmuni associate alla celiachia. Per contro, la mortalità in assenza di dieta risulta pari al 10-30% e dipende principalmente dall'aumentato rischio di sviluppare enteropatie associate a linfomi delle cellule T, in particolare linfomi non Hodgkin.

Eziopatogenesi

La patogenesi della malattia celiaca è il risultato dell'interazione tra fattori ambientali, genetici e immunologici (Meeuwisse 1970). Il fattore ambientale che in assoluto svolge un ruolo di primo piano è il glutine, che nella sua veste di antigene non self, è responsabile del "triggering" della risposta immunitaria. Il glutine è la componente proteica della farina di frumento, orzo e segale. È un componente quasi obbligato della dieta dell'area mediterranea, mentre manca, o è scarsamente rappresentato, nella dieta delle popolazioni orientali che si nutrono prevalentemente di riso, in quella degli indiani d'America che privilegiano il mais, e di alcune popolazioni centro-europee che fanno largo uso di patate.

Il glutine presenta, in particolare, due componenti: la frazione gluteninica idro-solubile, poco coinvolta nella tossicità, e la frazione prolaminica alcool-solubile che appare implicata nella patogenesi della malattia (Cornell *et al.*, 1992; Arentz-Hansen H. *et al.*, 2004).

Le prolamine implicate nell'insorgenza della malattia sono la gliadina per il frumento, la secalina per la segale e l'ordeina per l'orzo; caratteristica comune a tutte queste sostanze è l'elevato contenuto in glutamina (>30%) e prolina (>15%).

Fino a pochi anni fa l'avenina, frazione prolaminica dell'avena, era ritenuta dannosa; le conoscenze attuali indicano, invece, che l'avenina, nonostante le evidenti somiglianze strutturali con le prolamine tossiche, sarebbe relativamente ben tollerata dai pazienti celiaci. La spiegazione potrebbe risiedere nel minor contenuto in prolina dell'avenina e nel fatto che le prolamine costituiscono solo il 5-10% delle proteine dell'avena rispetto al 50% del frumento (Bertini *et al.* 2000).

Le prolamine del frumento sono suddivise in α -, β -, γ -, ω -gliadine, con un peso molecolare che varia da 30000 a 75000 daltons; la gliadina A è la componente più importante delle α -gliadine e sembra essere la frazione più direttamente responsabile dell'insorgenza della malattia (Cerf-Bensussan *et al.*, 2003). Un ruolo importante nel determinismo della malattia celiaca è svolto dai fattori genetici. Il meccanismo più probabile attraverso cui la gliadina innesca la malattia è quello immunomediato; nei pazienti celiaci, infatti, è presente un'inappropriata risposta immunitaria T-cellulare al glutine ingerito e alle prolamine in esso contenute. Alla base di questa alterata risposta immunitaria è presente una predisposizione genetica, e una dieta contenente glutine. In particolare, i fattori immunitari (geneticamente determinati) implicati nella patogenesi sono rappresentati dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) in cui si trovano, posti sul cromosoma 6, i geni del sistema HLA di classe I e II. I geni primariamente coinvolti sono quelli HLA di classe II, specificatamente HLA DQ2 (codificato dagli alleli DQA1*0501 e DQB1*0201) e DQ8 (codificato dagli alleli DQA1*0301 e DQB1*0302).

L'associazione tra celiachia e molecole HLA è stata largamente studiata ed è stato dimostrato che più del 90% dei pazienti celiaci presenta l'aplotipo HLA-DQ2, mentre quelli che non lo presentano hanno, nella maggior parte dei casi, l'aplotipo HLA-DQ8. Risultano rarissimi i pazienti privi di entrambi i loci (Sollid *et al.*, 1989, Brusco *et al.*, 1999). Gli alleli HLA-DQ2 si combinano in forma di dimeri e possono essere codificati sia in cis che in trans, spiegando l'associazione sia con il DR3 che con il DR5/7 (Lionetti 2002) (Fig. 5)

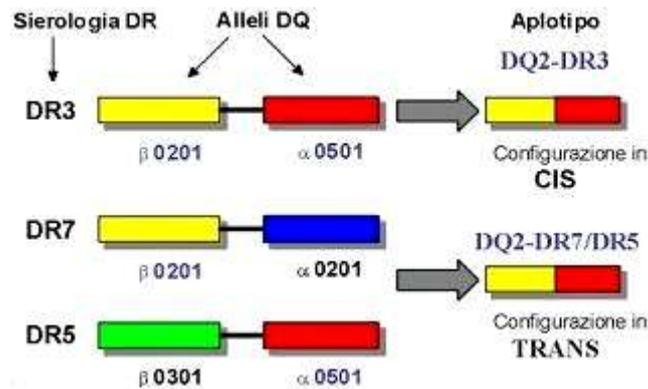


Fig. 5. HLA-DQ2: codificazione in cis e in trans.

Comunque, la prevalenza di HLA-DQ2 è alta anche tra i non-celiaci (25%-30%), suggerendo il coinvolgimento di ulteriori geni, probabilmente non-HLA, nella patogenesi della malattia.

Affinché si realizzi la reazione immunitaria responsabile della malattia è necessario che la gliadina superi l'epitelio intestinale e raggiunga la lamina propria, sede in cui ha inizio la anomala risposta del sistema immunitario che porterà successivamente al danno tessutale.

In condizioni fisiologiche l'epitelio intestinale, grazie alle giunzioni strette (tight junctions) intercellulari, forma una barriera al passaggio di macromolecole quali il glutine; solo piccole quantità di frazioni antigeniche, peraltro immunologicamente efficaci, supera la barriera epiteliale. Gran parte di queste proteine (>90%) oltrepassa la barriera attraverso la via transcellulare; durante questo percorso i peptidi subiscono una degradazione lisosomiale che li rende inattivi dal punto di vista immunologico. Le rimanenti frazioni antigeniche vengono invece trasportate intatte attraverso la via paracellulare grazie a una fine regolazione delle tight junctions (Fig. 6), portando allo sviluppo di una risposta immunitaria che si traduce in uno stato di tolleranza antigenica (Fasano *et al.*, 2001; Fasano 2001).

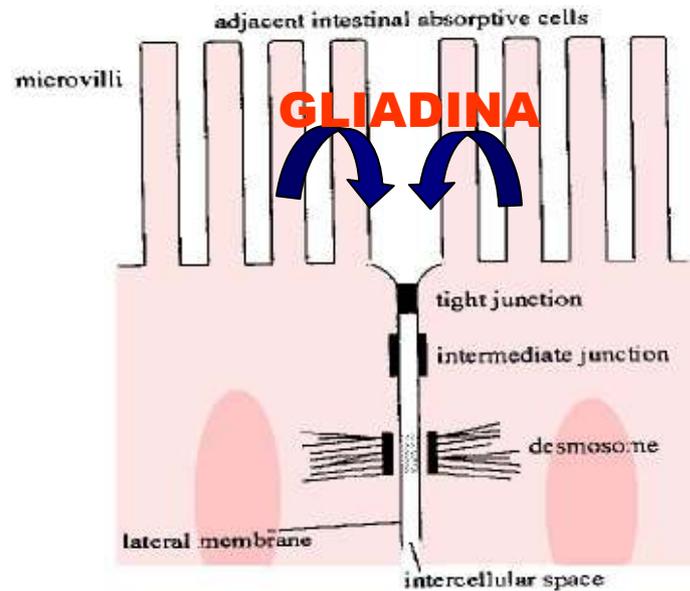


Fig. 6. Tight junction intercellulare: passaggio della gliadina attraverso la via paracellulare.

Nelle prime fasi della celiachia l'integrità delle tight junctions, e quindi la permeabilità dell'epitelio intestinale, risulta alterata; si assiste perciò ad un maggiore assorbimento di macromolecole, tra cui il glutine. Responsabile di questa aumentata permeabilità intestinale sembra essere la up-regulation della zonulina (peptide intestinale coinvolto nella regolazione delle tight junctions) (Schulzke *et al.*, 1998).

Una volta superata la barriera intestinale la gliadina interagisce con un enzima extracellulare, la transglutaminasi tissutale (tTG), che ha un ruolo fondamentale nella patogenesi. Questo enzima catalizza una reazione calcio-dipendente di deaminazione di uno specifico residuo glutammico, convertendo la glutamina in acido glutammico carico negativamente. Dopo aver subito questa modifica la gliadina acquisisce una forte affinità per le molecole HLA-DQ2 e DQ8 poste sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (antigen presenting cells, APC) ai linfociti T-CD4+ (Fig. 7) (Schuppan 2000; Molberg *et al.*, 2000).

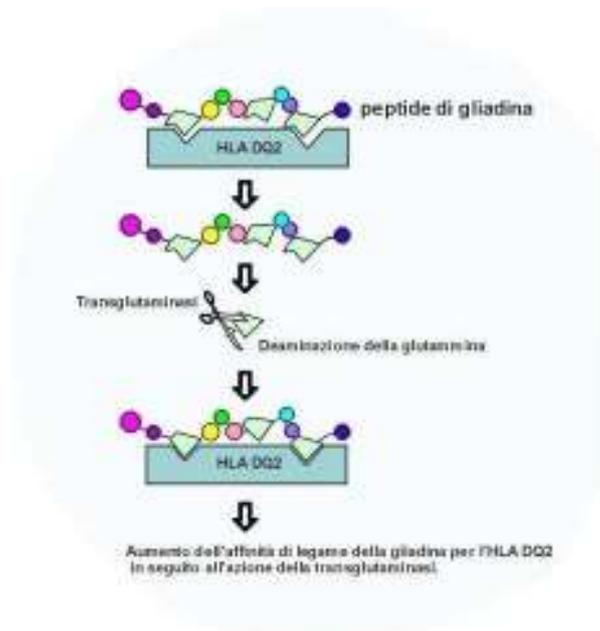


Fig. 7. Azione della tTG sulla gliadina .

L'attivazione linfocitaria porta alla selezione di cloni specifici per la gliadina con produzione non solo di anticorpi verso la gliadina stessa, ma anche di autoanticorpi verso la tTG tessutale e verso complessi proteici tTG-gliadina che, analogamente a quanto avviene in altre patologie autoimmuni, innescherebbero i meccanismi del danno tessutale (Anderson *et al.*, 2000).

Lo schema sottoriportato (Fig. 8) espone un modello recentemente proposto per spiegare la dinamica di insorgenza della malattia. L'attivazione linfocitaria porta alla selezione di cloni specifici per la gliadina con produzione, non solo di anticorpi verso la stessa gliadina, ma anche di autoanticorpi verso la tTG tissutale e verso complessi proteici tTG-gliadina che, analogamente a quanto avviene in altre patologie autoimmuni, innescherebbero i meccanismi del danno tissutale.

Secondo questo modello la reazione immunitaria responsabile del danno ha inizio grazie alla capacità delle cellule presentanti l'antigene (cellule B, macrofagi e cellule dendritiche) di legare, attraverso i loro recettori, le molecole di gliadina immoificate, la gliadina deaminata e i complessi gliadina-tTG. Questi peptidi vengono endocitati e, dopo essere stati processati, sono esposti sulla superficie cellulare associati alle molecole HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e presentati alle cellule T-helper CD4+. Le cellule T così stimolate secernono una serie di citochine le quali dirigono la risposta

immunitaria o verso la produzione di anticorpi (risposta Th2) o verso l'infiammazione e il rimodellamento tessutale (risposta Th1). In particolare, le citochine Th2 (quali ad esempio l'interleuchina 4, IL-4) stimolano l'espansione di cloni di cellule B autoreattive e quindi la produzione di autoanticorpi diretti contro la gliadina, la tTG e i complessi tTG-gliadina. Le citochine Th1 (soprattutto il tumor necrosis factor, TNF) stimolano, invece, la secrezione di metallo-proteinasi di matrice (MMP) da parte dei fibroblasti intestinali; queste proteine hanno un ruolo centrale nel rimodellamento tessutale in quanto sono in grado di degradare varie componenti di matrice causando la distruzione della mucosa attraverso la dissoluzione del tessuto connettivo (Sollid 1997; Schuppan *et al.*, 2000; Molberg *et al.*, 2000/2003; Anderson *et al.*, 2000/2007).

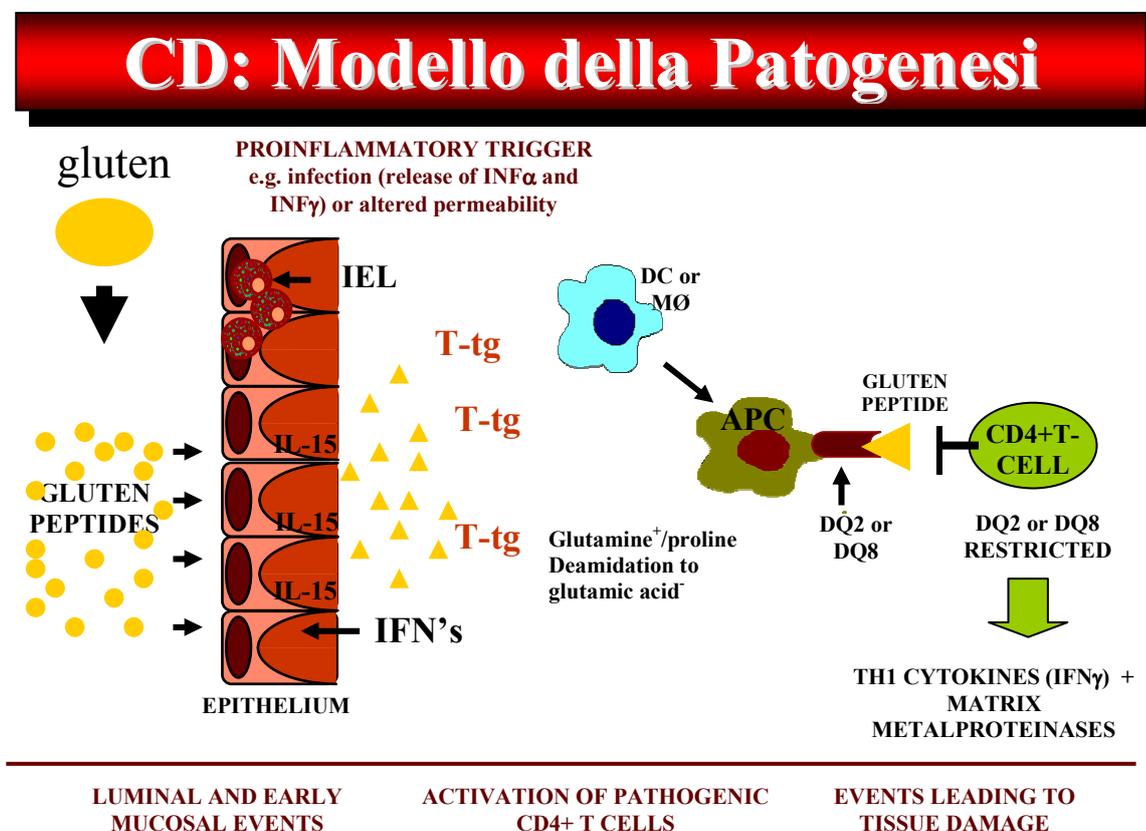


Fig. 8. Modello patogenetico della celiachia.

Nel danno precoce a livello intestinale è stata inoltre proposta una tossicità diretta da parte della gliadina sugli enterociti (Maki *et al.*, 1997; Godkin *et al.*, 1998).

Un possibile meccanismo patogenetico potrebbe consistere nella carenza, nei pazienti affetti da celiachia, di una specifica peptidasi della mucosa, così che il glutine e i suoi peptidi più grandi contenenti glutamina non vengono idrolizzati a molecole peptidiche più piccole, dipeptidi e aminoacidi, con conseguente accumulo nella mucosa di frazioni proteiche “tossiche”. Dopo essere state danneggiate dalle frazioni nocive del glutine, le cellule della superficie di assorbimento si sfaldano rapidamente nel lume intestinale e la successiva liberazione di tTG determinerebbe la deaminazione della gliadina, incrementando la loro affinità per le molecole DQ2 e DQ8 e amplificando definitivamente la risposta T cellulare (Bertini *et al.*, 2000; Aleanzi *et al.*, 2001). Sulla base delle considerazioni fatte fino a questo punto, appare chiaro come nella patogenesi della celiachia i fattori genetici siano importanti tanto quanto i fattori ambientali.

L'interpretazione della celiachia come malattia a forte componente autoimmune, trova conferma indiretta nella frequente associazione della stessa con altre patologie autoimmuni quali il diabete mellito insulino-dipendente, la sindrome di Sjogren, la tiroidite autoimmune.

Aspetti clinici

Lo spettro clinico della malattia celiaca è ampio: varia a seconda dell'età del paziente, della dieta, della durata e dell'estensione della malattia. A seconda delle caratteristiche cliniche e delle alterazioni istologiche ed immunologiche al momento della diagnosi, distinguiamo la forma classica, atipica, silente, latente e potenziale.

La malattia può insorgere in qualsiasi periodo della vita; spesso la forma classica si manifesta tra il sesto e il ventiquattresimo mese, a seguito del divezzamento, quando il bambino passa da un'alimentazione esclusivamente latte ad un'alimentazione includente cibi contenenti glutine (Fornaroli *et al.*, 2003).

Relativamente raro è il riscontro oggi giorno della malattia celiaca nella sua Forma classica, i cui sintomi tipici sono rappresentati da diarrea cronica con feci semiliquide, voluminose e maleodoranti, rallentamento della crescita, inappetenza, distensione e dolore addominale, ipotonia muscolare, irritabilità e calo ponderale. Nei casi più gravi si può manifestare peraltro una diarrea francamente acquosa che può portare a importante disidratazione e a squilibri elettrolitici e talora

possono comparire una severa ipoproteinemia ed edema, con un quadro simile allo shock meglio noto come “crisi celiaca”. Dal punto di vista laboratoristico sono presenti segni di malassorbimento che includono anemia sideropenica, ipoalbuminemia, ipocalcemia, deficit di vitamine (Fasano e Catassi, 2001).

Forme atipiche. Nell’ultimo decennio si è assistito ad un’evidente modificazione nelle modalità di presentazione della malattia. La maggiore tempestività della diagnosi in età pediatrica e la valorizzazione dei sintomi sfumati propri dell’adolescente e dell’adulto sono, verosimilmente, responsabili di questo fenomeno. Nella sua presentazione “atipica”, la celiachia è caratterizzata da sintomi gastroenterici modesti, mentre ci sono vari segni e sintomi extraintestinali, che possono presentarsi da soli o associati e che costituiscono gli unici segni di malattia. Nell’età pediatrica e soprattutto negli adolescenti, che la celiachia tende a manifestarsi in forma atipica. I sintomi tendono a essere modesti, spesso senza diarrea e con il coinvolgimento di organi diversi dall’intestino. Pertanto occorre fare attenzione a segni quali: l’anemia da carenza di ferro (soprattutto se refrattaria a terapia parziale), l’ipertransaminasemia (il cui aumento deve essere persistente o ricorrente una volta che siano state escluse le altre cause più comuni di epatopatia), la comparsa e il persistere di afte, la bassa statura (il 10% dei bambini e adolescenti costituzionalmente piccoli sono affetti da celiachia (Stenhammar *et al.*, 1986); in questi pazienti sia l’età ossea che la velocità di crescita sono significativamente ridotte, l’anomalia dello smalto dentario [linee orizzontali scure o solchi simmetrici sugli incisivi centrali o laterali permanenti sono presenti nel 30% dei pazienti non trattati (Smith e Miller, 1979)], l’artrite e le artralgie [(la celiachia è stata descritta nel 1,5-7,5% dei pazienti con artrite reumatoide, e in alcuni casi questi sintomi sono risultati essere l’unico sintomo di presentazione della malattia(O’Farrelly *et al.*, 1988)], la dermatite erpetiforme. Nell’adulto difficilmente si rileva la sindrome tipica del malassorbimento. La celiachia può manifestarsi con sintomi gastrointestinali, ma questi tendono ad essere modesti e/o atipici, come ad esempio il meteorismo, la stipsi persistente o alternata a episodi di diarrea, l’intolleranza al latte o la ricorrenza di afte della mucosa orale. Più frequenti risultano invece i sintomi extraintestinali come quelli già descritti per l’adolescente, ai quali si aggiungono l’osteoporosi giovanile o in donne premenopausa, l’ipocalcemia e l’iperfosfatemia o comunque alterazioni del metabolismo calcio-fosforo, la poliabortività e le irregolarità mestruali (Ciacci *et al.*, 1996; Piccoli *et al.*, 2002). Da ricordare che l’anemia sideropenica (sintomo molto comune di celiachia) può talora associarsi

carezza di folati e, più raramente, di vitamina B₁₂ (Stene-Larsen *et al.*, 1988), quest'ultima, se severa, può essere accompagnata da leucopenia e trombocitopenia. Anche la comparsa di sanguinamenti cutanei e/o mucosi con il riscontro di ipoprotrombinemia, anch'essa espressione di malassorbimento, può essere l'unico sintomo in un adulto senza altri segni di malattia (Cerf-Bensussan *et al.*, 2003). La dermatite erpetiforme merita di essere considerata a parte in quanto si associa regolarmente ad un'enteropatia glutine sensibile, tanto da essere considerata una variante della celiachia che si esprima però a livello cutaneo. Si caratterizza per un'eruzione papulovescicolare, pruriginosa, localizzata in modo simmetrico ai gomiti, alle ginocchia, alle natiche, al sacro, al tronco, al collo e al viso. I sintomi principali sono il prurito e il bruciore, che può essere talmente severo da causare dolore; la rottura delle vescicole dà immediato sollievo ai sintomi. Le manifestazioni possono essere però molto lievi e limitate per estensione. A questa sintomatologia cutanea può associarsi quella caratteristica della celiachia con dolore e distensione addominale, alvo irregolare, ecc. Solo nel 10% dei casi ci sono segni di malassorbimento, ma quasi il 100% dei pazienti ha istologia duodenale patologica. La diagnosi si attua con la dimostrazione di depositi di IgA nella cute, in aree non affette dalle lesioni. La dieta priva di glutine risolve la sintomatologia.

Forma silente. Questa forma di malattia si caratterizza per la presenza, in soggetti apparentemente asintomatici, di lesioni istologiche della mucosa intestinale tipiche della celiachia (Ferguson *et al.*, 1993). In molti casi la asintomaticità è solo apparente. Una anamnesi clinica più attenta può rivelare infatti la presenza di un malessere psicofisico (tendenza alla depressione, irritabilità, facile affaticabilità), che in molti casi di celiachia silente può rappresentare l'unico sintomo. Molti di questi soggetti dopo qualche mese dall'introduzione di una dieta priva di glutine riferiscono un miglioramento dello stato generale (Fabiani *et al.*, 1996). In altri casi si può riscontrare un deficit di ferro associato o meno ad anemia, o una riduzione della densità minerale ossea (Mustalahti *et al.*, 1999).

La gran parte dei casi di celiachia silente sono stati individuati nel corso di programmi di screening; il 10-15% dei parenti di primo grado di pazienti celiaci risulta affetto da celiachia silente, presentando una mucosa intestinale atrofica in assenza di sintomi. È stato dimostrato che i soggetti affetti da celiachia silente corrono il rischio di sviluppare le stesse complicanze a lungo termine dei pazienti con sintomatologia tipica; per questo motivo è raccomandabile uno screening sierologico dei familiari dei pazienti celiaci.

Celiachia potenziale. I soggetti affetti da questa forma di malattia presentano esami sierologici suggestivi di celiachia, ma la biopsia intestinale risulta essere negativa. Probabilmente la celiachia potenziale è l'espressione di una predisposizione genetica allo sviluppo della malattia.

Celiachia latente. Anche in questa forma di malattia siamo di fronte a soggetti con sierologia positiva e mucosa intestinale normale a dieta contenente glutine, ma questi soggetti in un momento successivo della loro vita presenteranno sintomi e una atrofia della mucosa glutine-dipendente (Bertini *et al.*, 2000).

In sostanza ogni celiachia potenziale potrebbe essere una celiachia latente. La condizione di sensibilizzazione al glutine, caratterizzata da una anomala risposta immunologica a questa proteina sulla base di una definita suscettibilità genetica, non è quindi ristretta ai pazienti con atrofia della mucosa. Soggetti con celiachia latente presentano infatti sensibilizzazione al glutine pur in assenza di una celiachia conclamata; in alcuni di essi un'inappropriata risposta immunologica alla gliadina si può rilevare in organi diversi dall'intestino come la cute (dermatite erpetiforme), la bocca (afte ricorrenti), i reni (nefropatia da IgA) e le articolazioni (artrite). I parenti di primo grado dei celiaci sono il gruppo nel quale è più elevata la probabilità di individuare soggetti con celiachia potenziale o latente. La situazione di latenza è, probabilmente, l'espressione della predisposizione genetica alla celiachia colta in un momento nel quale ha iniziato a dare i primi segni di sé (positività degli anticorpi, ma non ancora danno intestinale) (Bertini *et al.*, 2000).

Patologie associate

Vi sono malattie nelle quali la celiachia si può ritrovare con maggiore frequenza; per alcune di queste condizioni è riscontrabile una affinità alla celiachia per quanto riguarda la patogenesi autoimmune ed il substrato genetico. L'associazione più forte è con il Diabete Mellito insulino dipendente (DMT1); la prevalenza di celiachia in pazienti con dmt1 è significativamente più alta di quella riscontrata nella popolazione generale (circa 1:300), variando a seconda delle casistiche dallo 0,97% al 16% con una prevalenza media del 4,5% (Volta *et al.*, 1997). Sebbene la relazione tra le due condizioni non sia completamente compresa, la loro frequente associazione può essere spiegata dalla presenza di un comune substrato genetico [sia il diabete mellito sia la celiachia si associano all'aumentata frequenza dei genotipi HLA-B8 e DR3 (Barera *et al.*, 1991) e dell'allele DQB1*0201 (Holmes, 2002)] e dalla comune patogenesi autoimmune nel danno tissutale (Koletzko *et al.*, 1988).

Oltre al DMT1 ci sono altre malattie a patogenesi autoimmune che si associano con frequenza relativamente elevata alla celiachia. Tra queste sono presenti le malattie autoimmuni della tiroide (iper- e ipotiroidismo clinicamente manifesti, malattie tiroidee subcliniche). Da diversi studi è emerso che un coinvolgimento della tiroide è evidente clinicamente nel 10-15% dei pazienti celiaci; questi studi dimostrano inoltre che la forma di patologia tiroidea autoimmune che è di più frequente riscontro nei celiaci è l'ipotiroidismo subclinico (Colin *et al.*, 2002). Altre malattie sono: il morbo di Addison, l'anemia perniziosa, la trombocitopenia autoimmune, la nefropatia da IgA, l'alopecia (Helin *et al.*, 1983; Stenhammer *et al.*, 1988; Stene-Larsen *et al.*, 1988; Zelissen *et al.*, 1995; Corazza *et al.*, 2005), l'ipopituitarismo di origine autoimmune, la sindrome di Sjorgen.

Esistono ormai associazioni certe anche con altre malattie in cui è presente un disordine del sistema immunitario, tra queste il deficit selettivo di IgA (Cataldo *et al.*, 1998), l'orticaria, la cirrosi biliare, la colite ulcerosa e, più in generale, le malattie infiammatorie intestinali (Bertini *et al.*, 2000). Un'altra condizione che si associa, in età pediatrica, alla celiachia è la sindrome celiachia-epilessia-calcificazioni endocraniche. La relazione tra sviluppo di calcificazioni e celiachia non è stata chiarita ma c'è qualche evidenza che se la dieta senza glutine è iniziata entro l'età scolare, possa migliorare il controllo dell'epilessia (Bertini *et al.*, 2000). Una serie di malattie neurologiche sono anch'esse associate alla celiachia (alcune neuropatie sensitive, l'atassia cerebellare, alcune miopatie); in questo caso, i pazienti sono spesso anziani e non presentano sintomi evidenti di malassorbimento (Gobbi *et al.*, 1992; Luostarinen *et al.*, 1999). La celiachia si presenta con elevata frequenza (4-7%) anche in soggetti con sindrome di Down.

Immunogenicità della gliadina

Diversi studi (Wieser, 1996; Mowat, 2003; Ciccocioppo *et al.*, 2005) relativi all'attivazione della risposta immunitaria contro il glutine hanno dimostrato che la struttura tridimensionale della gliadina non è indispensabile a tale scopo e hanno spostato l'attenzione sui peptidi della gliadina che, a questo proposito sono stati distinti in:

1. tossici, in grado di indurre danni tissutali alla mucosa intestinale indipendentemente dall'attivazione dei linfociti T *helper*, che esplicano la loro attività attraverso l'attivazione della risposta immunitaria innata;

2. immunogenici, in grado di stimolare in modo specifico linee cellulari di linfociti T HLA-DQ2/DQ8 e linfociti B e quindi di attivare la risposta immunitaria acquisita. Il più noto fra i peptidi tossici è il frammento 31-43 dell' α - gliadina (LGQQQPFPPQQPY), che viene trasportato attraverso la mucosa dei pazienti celiaci in quantità due volte superiore rispetto a quanto succede negli individui sani e non ha attività immunogenica nei confronti dei linfociti T *helper* (Elli *et al.*, 2003; Auricchio *et al.*, 2004; Gianfrani *et al.*, 2005) (Tab.1). L'incubazione di biopsie intestinali di pazienti celiaci con il peptide tossico 31-43 genera, dopo solo tre ore, un incremento notevole della secrezione di IL-15 e l'espressione di ICAM1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule) da parte delle cellule endoteliali. Dopo 24 ore dall'incubazione si ha un aumento della migrazione di IELs (intraepithelial lymphocytes) e NK (Natural Killer Cell) nella lamina propria e del tasso di apoptosi cellulare. Un effetto particolare della gliadina è di causare un incremento dell'espressione intracellulare di zonulina, molecola che regola la polimerizzazione dei microfilamenti di actina e l'apertura delle giunzioni strette (Fasano *et al.*, 2000; Fasano, 2001). La conseguenza è un aumento della permeabilità intestinale e quindi un ingresso facilitato di peptidi immunogeni e tossici nella lamina propria. Negli studi tesi ad individuare gli epitopi riconosciuti dai linfociti glutine specifici sono stati sequenziati diversi geni di gliadine e proteine correlate, espresse poi in *E. coli*, generando un pannello di peptidi sintetici su cui sono stati testati i cloni di linfociti T isolati da biopsia duodenale di pazienti celiaci (Arentz-Hansen H. *et al.*, 2000, 2002). In questo modo sono state identificate le sequenze minime indispensabili per stimolare i linfociti (Tesi di dottorato dott.ssa Monica Vecchiet, Università degli Studi di Trieste), riassunte in Tab.2.

Peptide	Sequence	Origin and location ¹	Reference
33-mer	LQLQFFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF	α -2 gliadin, 56-88	Shan et al 2002
26-mer	FLQPQQPFPPQQPYPQQPQQPFQ	γ -5 gliadin, 26-51	Shan et al 2005
20-mer	LQPQQPFPPQQPYPQQPQ	γ -5 gliadin, 60-79	Arentz-Hansen et al 2002
20-mer	QQQQPPFSQQQQSPFSQQQ	glutenin	Vader et al 2002
19-mer	LGQQQFFPPQQPYPQPQPF	A-gliadin, 31-49	Sturgess et al 1994
17-mer	QLQFFPQPELPYPQPQS	A-gliadin, 57-73	Anderson et al 2000
15-mer	VQGQGIIQPQPAQL	γ -gliadin	Vader et al 2002
15-mer	QQPPFSQQQQPLPQ	glutenin	Vader et al 2002
14-mer	PQPQLPYQPQLPY	α -2 gliadin, 62-75	Arentz-Hansen et al 2000
13-mer	LGQQQFFPPQQPY	A-gliadin, 31-43	Marsh et al 1995
12-mer	FSQPQQQFPQPQ	γ -5 gliadin, 102-113	Arentz-Hansen et al 2002
12-mer	QLQFFPQPQLPY	α -9 gliadin, 57-68	Arentz-Hansen et al 2000
10-mer	QPQSFPPQQ	γ -gliadin	Sjöström et al 1998

¹ α 2-gliadin of Arentz-Hansen 2000; γ 5-gliadin of Arentz-Hansen 2002; A-gliadin of Kasarda et al 1984

Tab. 1. Riassunto degli epitopi tossici nei pazienti celiaci.

Epitopo	Fonte	sequenza nativa del core
α -I	α -gliadina, ricombinante	PFQPQLPY
α -II	α -gliadina, ricombinante	PYPQLPY
α -III	α -gliadina, ricombinante	PQPQLPYPQ
Gli- α 20	α -gliadina, peptide sintetico	FRPQQPYPQ
γ -I	γ -gliadina	PQSFPPQQ
γ -II (Gli- γ 30)	γ -gliadina	IQPQQPAQL
γ -III	γ -gliadina, ricombinante	QQPQQPYPQ
γ -IV	γ -gliadina, ricombinante	SQPQQQFPQ
γ -VI a	γ -gliadina, peptide sintetico	QQPFPQQPQ
γ -VI b	γ -gliadina, peptide sintetico	QQPYPQQPQ
γ -VII a	γ -gliadina, peptide sintetico	PQPQQQFPQ
γ -VII b	γ -gliadina, peptide sintetico	QQPQQPFPQ
Glia- γ 2	γ -gliadina	PYPQQPQQP
Glu-5 (Var 1)	non definita	QIPQQPQQF
Glu-5 (Var 2)	non definita	QLPQQPQQF
Glt 17 (Var 1)	LMW-glutenina, peptide sintetico	PFSQQQQPV
Glt 17 (Var 2)	LMW-glutenina, peptide sintetico	PFSQQQQPI
Hor- α 2/ Sec α 2	ordenine/secaline, peptide sintetico	PQPQQPFPQ
Hor- α 9/ Sec α 9	ordenine/secaline, peptide sintetico	PFQPQQPF
Avenin- I (Av- α 9A)	avenine, peptide sintetico	PYPEQQEPF
Avenin- II (Av- α 9B)	avenine, peptide sintetico	PYPEQQQPF

Tab. 2. Riassunto degli epitopi noti riconosciuti da linfociti T di celiaci.

Sottoponendo i linfociti T a test di proliferazione in presenza di frazioni purificate di gliadina, sono stati individuati i seguenti frammenti proteici che contengono gli epitopi sopra elencati:

- la sequenza di 11 amminoacidi SGQGSFQPSQQ, corrispondente alla regione 206-216 al C-terminale dell' α -gliadina, riconosciuta da cloni di linfociti T HLA-DQ8 isolati da biopsia intestinale di pazienti celiaci; questo epitopo risulta essere la sequenza minima necessaria per stimolare questo tipo di cellule T e contiene la sequenza PSQQ.
- il frammento sintetico QLQPFQPPELPYPQPQPQS, corrispondente alla regione 57-73 dell' α -gliadina, riconosciuto da una popolazione HLA-DQ2 di linfociti isolati da sangue periferico di pazienti celiaci a cui è stato somministrato glutine; la sequenza riconosciuta presenta la glutamina 65 deamidata. Il 57% dei pazienti celiaci presenta, a livello sierico, IgA che riconoscono questo peptide stimola i linfociti T attraverso la sequenza PXPQP.
- i peptidi α -2 glia (PQPQLPYPQPQLPY) e α -9 glia (QLQPFQPQLPY), corrispondenti rispettivamente alle sequenze 62-75 e 57-68 dell' α -gliadina; questi due epitopi sono riconosciuti da cloni di linfociti T DQ2, sono parzialmente sovrapposti e presentano 7 amminoacidi in comune; hanno inoltre il residuo di glutamina in posizione 65 deamidato, che risulta indispensabile per il riconoscimento. Somministrati a pazienti in GFD, questi peptidi determinano un peggioramento del quadro clinico, una riduzione significativa del rapporto altezza villi: profondità cripte e un aumento del numero di linfociti intraepiteliali; utilizzati
- per stimolare cellule T isolate da pazienti celiaci, determinano un incremento della secrezione di INF- γ . Entrambi gli epitopi sono resistenti ad incubazione con endoproteasi pancreatiche e il processamento da parte della dipeptidil-peptidasi IV (enzima dell'orletto a spazzola degli enterociti) all'Nterminale è rallentato; inoltre, la sequenza PQPQLPY risulta resistente alla digestione da parte di dipeptidil-carbossipeptidasi I, un altro enzima dell'orletto a spazzola.
- l'epitopo α -20 glia (FRPQQPYYPQ), isolato da un pannello di peptidi sintetici, che contiene il motivo PQQ, corrispondente al *core* degli epitopi riconosciuti dagli AGA.
- il frammento 33-mer (LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPQPF) corrispondente alla regione 56-88 dell' α -gliadina, generato dalla digestione *in vitro* della gliadina con proteasi gastriche e pancreatiche; contiene 6 copie parzialmente sovrapposte dei 3 epitopi principali riconosciuti dai linfociti T (PFPQPQLPY, PQPQLPYPQ e PYPQPQLPY) e li stimola maggiormente rispetto ai peptidi più corti (α -2 glia, α -9 glia e α -20 glia) contenenti uno solo degli epitopi. E' un substrato della tTG e la deamidazione sito-specifica genera un aumento dell'affinità per l'HLA-DQ2 e potenzia l'attivazione dei linfociti T sensibili.

Inoltre è resistente, *in vitro*, ad incubazione prolungata con proteasi pancreatiche e gastriche, alla digestione con enzimi isolati dall'orletto a spazzola sia umani che murini; questa resistenza alla digestione è stata osservata anche *in vivo*, in topi adulti sottoposti a test di perfusione. E' ricco in proline, che rappresentano il 40% dei residui, e assume una conformazione ad elica poliprolinica di tipo II, caratteristica degli epitopi che legano gli MHC di classe II.

- il frammento 26-mer di γ 5-gliadina (FLQPQQPFPPQQPQQPYPPQQPQQPFPPQ), identificato mediante approccio computazionale, che contiene motivi in comune con il 33-mer ed è resistente alle proteasi pancreatiche e a quelle dell'orletto a spazzola come il 33-mer, pur essendo meno stabile.

Al fine di individuare, invece gli epitopi riconosciuti dai linfociti B, sono stati testati sieri di pazienti celiaci per valutare il riconoscimento dei peptidi sintetici. Da questi studi sono state individuate cinque principali sequenze *consensus* riconosciute:

- QXQPFP, corrispondente alla regione 33-65 dell' α -gliadina, riconosciuta sia da IgA che IgG (con X = P, Q e L).
- WQIPEQ, corrispondente alla regione 167-172 dell' α -gliadina; in questo caso il riconoscimento è differente tra i due isotipi anticorpali; infatti, mentre per le IgA il riconoscimento copre l'intera sequenza *consensus*, per le IgG è ristretto a IPEQ.
- QGXFQP, corrispondente alla regione 239-244 dell' α -gliadina; anche in questo caso la sequenza riconosciuta dalle IgG è più ristretta XFQP (con X = F e S).
- PQQLPQ, corrispondente alla regione 256-262 dell' α -gliadina, riconosciuta sia da IgA che da IgG.
- QPQQPF, corrispondente alla regione 115-118 della γ -gliadina. Dagli stessi studi è emerso che per gli ultimi due epitopi la deamidazione sito-specifica operata dalla tTG, che genera il motivo PEQ, aumenta notevolmente il riconoscimento da parte degli anticorpi.

Il confronto tra gli epitopi isolati ha permesso di individuare le caratteristiche comuni ai peptidi immunogenici:

- sono localizzati in regioni ricche in proline; questa caratteristica risulta importante in quanto peptidasi e proteasi di mammifero non riescono a scindere il legame peptidico in posizione N- o C-terminale rispetto ad una prolina; inoltre l'MHCII ha un'elevata capacità di accomodare peptidi ricchi in prolina (Arentz-Hansen *et al.* 2002, 2004)
- sono substrati della tTG e la deamidazione potenzia il riconoscimento (Ellis *et al.*, 2003)

- in condizioni di equilibrio, possono occupare una frazione rilevante dei siti attivi dell'enzima e nella mucosa duodenale di pazienti celiaci si possono isolare complessi sovramolecolari di tTG e gliadina (Ciccocioppo *et al.*, 2003); questo può essere alla base del meccanismo di risposta anticorpale contro la tTG; infatti, se le cellule presentanti l'antigene (APC) internalizzassero i complessi gliadina-tTG, si potrebbe avere la presentazione di frammenti di entrambe le proteine e la produzione di anticorpi anti-gliadina e anti-tTG (Piper *et al.*, 2002)
- sono riconosciuti dal DQ2 e presentati ai linfociti CD4+ (Qiao *et al.*, 2004, 2005)
- si trovano all'interno di peptidi più lunghi e multivalenti; a causa della diminuzione della degradazione del glutine che si osserva nei pazienti celiaci, da questi peptidi multivalenti vengono rilasciati frammenti oligopeptidici, tra cui quelli immunogenici e quelli tossici (Haush *et al.* 2002; Matysiak-Budnik *et al.* 2003; Ciccocioppo *et al.*, 2005). Un'analisi del proteoma del glutine, tenendo conto di queste caratteristiche, ha evidenziato più di 50
- potenziali peptidi immunogenici e l'analisi di 157 proteine del glutine ha dimostrato che oltre il 51% contiene uno o più epitopi noti (Arentz-Hansen *et al.*, 2002).

Inoltre, si è rilevata la presenza di sequenze resistenti a proteolisi in α - e γ -gliadine, glutenine, secaline e ordeine; nelle avenine, invece, non ci sono peptidi resistenti alla digestione di dimensioni superiori a 8 aminoacidi (Shan *et al.*, 2005; Ciccocioppo *et al.*, 2005). La presenza di potenziali peptidi immunogenici in ordeine, secaline e glutenine potrebbe essere alla base della capacità di queste proteine di attivare linee cellulari di linfociti T gliadina-specifici isolate da mucosa di celiaco. D'altra parte, la minore resistenza alla digestione delle avenine, dovuta ad un contenuto di proline più basso (10%), è uno dei motivi dell'assenza di potenziali peptidi immunogenici e della ridotta tossicità dell'avena per i celiaci, (Anderson *et al.*, 2000; Fleckenstein *et al.*, 2002; Parrot *et al.*, 2002; Hausch *et al.*, 2003; Shan *et al.*, 2000; Mazzeo *et al.*, 2003; Chu-Yiung Kim *et al.*, 2003; Fleckenstein *et al.*, 2004; Qiao *et al.*, 2004; Londei *et al.*, 2005; BeiBbarth *et al.*, 2005; Stepniak *et al.*, 2005; Lu Shan *et al.*, 2005; Qiao *et al.*, 2005; Shinjini e Nitya, 2006; Mamone *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2007; Moron *et al.*, 2008; Fukushima *et al.*, 2008).

Possibilità terapeutiche

La celiachia non è una classica malattia autoimmune; gli anticorpi IgA infatti scompaiono quando la gliadina viene rimossa dalla dieta e il danno alla mucosa è reversibile senza residui fibrotici o cicatrici infatti è definita anche infezione da glutine.

Come precedentemente indicato, l'unica terapia attualmente riconosciuta è la dieta priva di glutine (GFD). Per garantire la tolleranza a questa sostanza il consumo giornaliero di glutine dovrebbe essere inferiore a 50mg, ben lontano dai 13g che rappresentano il consumo quotidiano nei Paesi occidentali. Una dieta completamente priva di glutine è indispensabile per mantenere sotto controllo i sintomi, evitare gli scompensi nutrizionali ed il calo dei livelli ematici di acido folico e ferritina, diminuire in maniera significativa il rischio di contrarre malattie dello scheletro e l'insorgenza di tumori maligni.

Diversi studi sono in corso al fine di individuare strategie terapeutiche alternative alla GFD, di fatto lo sviluppo di nuove terapie potrebbe prevedere:

- la somministrazione orale dell'auto-antigene per indurre la tolleranza (Dieterich *et al.*, 1997)
- il blocco dell'azione degli anticorpi grazie all'uso di peptidi inibitori (Krupickova *et al.*, 1999)
- la creazione di frumento non-tossico rimuovendo o modificando le sequenze antigeniche nella gliadina (Anderson *et al.*, 2000)
- lo sviluppo di una terapia con peptidi antagonisti alterati (Bateman *et al.*, 2004).
- una prima possibilità, legata alla resistenza alla digestione dei peptidi tossici e immunogenici, potrebbe risiedere nel pre-trattamento del glutine con prolilendopeptidasi di *Flavobacterium meningosepticum*, enzima in grado di digerire, *in vitro*, tutti i peptidi ricchi in proline e di eliminare così i peptidi immunogenici e tossici (Holtmeier *et al.*, 2006)
- l'osservazione che i peptidi α -2 gli, α -9 gli e α -20 gli non sono distribuiti casualmente a livello genico, ma sono presenti in maggior numero nel genoma D, che una sequenza omologa al 33-mer sembra essere codificata dal cromosoma 6D e che esistono varietà di frumento a più basso contenuto di sequenze tossiche, permette di dar vita a strategie d'ibridazione tese a ridurre il contenuto di proteine codificate
-

- dal genoma D e ad ottenere una varietà di frumento meno tossico per i celiaci (Spaenij-Dekking *et al.*, 2005; Van Herpen *et al.*, 2006)
- un'altra possibilità terapeutica è legata al fatto che è possibile identificare le modificazioni aminoacidiche degli epitopi presenti nel glutine che li rendano non tossici e in grado di fungere da antagonisti all'attivazione dei linfociti T; questi antagonisti sono definiti APL (*Altered Peptide Ligand Antagonists*). Recentemente è stato individuato un APL di sintesi corrispondente al frammento 57-73 dell' α -gliadina con la prolina 67 sostituita da alanina; questa singola sostituzione sembra ridurre la produzione di INF- γ da parte dei linfociti T indotta dallo stesso frammento non modificato (Ellis *et al.*, 2003)
- un decapeptide derivato da grano duro risulta in grado di proteggere, *in vitro*, dagli effetti tossici della gliadina e determina una riduzione della proliferazione e della

- produzione di citochine pro-infiammatorie da parte di linfociti T attivati; inoltre aumenta il rilascio di IL-10, citochina anti-infiammatoria. Un'iper-espressione di questo decapeptide potrebbe rendere il frumento non tossico (Ciccocioppo *et al.*, 2003).
- l'utilizzo dei microrganismi in grado di degradare i peptidi tossici della gliadina; si è dimostrato che tra i microrganismi presenti negli impasti acidi i lattobacilli, in particolari condizioni durante il processo di fermentazione, hanno la capacità di idrolizzare i peptidi della gliadina (Di Cagno *et al.*, 2002, 2004; De Angelis *et al.*, 2006b).

IL FRUMENTO

Origine, Storia e caratteristiche

I cereali fanno parte della famiglia delle *Graminacee* che include tre diverse sottofamiglie:

- *Pooideae*, di cui fanno parte 2 tribù:
- *Triticeae*, che comprende i generi frumento, segale e orzo
- *Aveneae*, di cui fa parte il genere avena
- *Bambusoideae*, di cui fa parte il genere riso
- *Panicoideae*, di cui fanno parte i generi mais, sorgo e miglio.

Riso, mais, sorgo e miglio sono tassonomicamente più distanti rispetto a segale, frumento e orzo, che hanno invece un progenitore ancestrale comune. Il frumento della specie *Triticum aestivum*, la cui farina è utilizzata negli impasti del pane e della pasta, è alloesaploide e deriva da 3 diversi genomi, indicati con le lettere A, B e D, ognuno dei quali è costituito da 7 paia di cromosomi ($AABBDD = 2n = 6x = 42$). La grandezza dei genomi delle diverse specie di cereali varia moltissimo: si passa da genomi di 400Mbp per il riso e il miglio a genomi di 16000Mbp per il frumento, che risulta quindi essere uno dei più complessi; all'interno dei genomi l'ordine dei geni e la loro localizzazione cromosomica risulta, però, altamente conservata nonostante riso, mais e frumento divergano di 50 milioni di anni (Tesi di dottorato dott.ssa Monica Vecchiet, Università degli Studi di Trieste).

Grazie a indicazioni di tipo citogenetico e molecolare si è visto che la sottospecie selvatica esaploide del *Triticum aestivum* molto probabilmente deriva da alcune mutazioni di progenitori esaploidi, che a loro volta originano dall'ibridazione del frumento tetraploide (*Triticum dicoccum* e *Triticum turgidum*, AABB, $2n=4x=28$) con una pianta diploide di *Aegilops squarrosa* (DD, $2n = 2x = 14$) (Fig. 9).

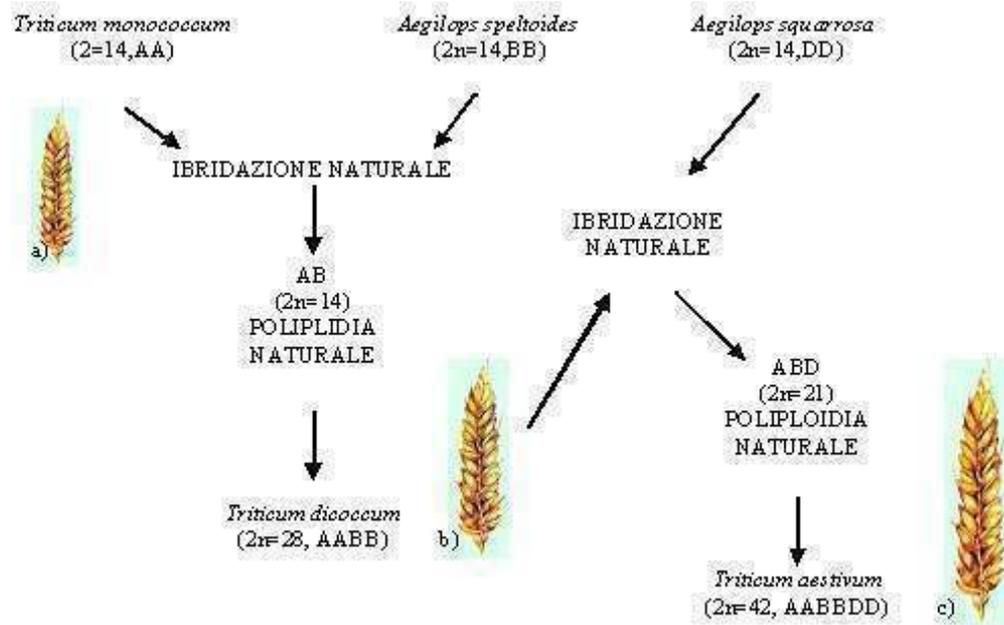


Fig. 9. Rappresentazione schematica dell'evoluzione del frumento: la specie diploide *Triticum monococcum* (a) ($2n=14$, AA) è stata naturalmente impollinata da *Aegilops speltoides* ($2n=14$, BB); la successiva duplicazione del genoma mediante poliploidia naturale ha dato origine a numerose specie selvatiche tetraploidi come *Triticum dicoccum* (b) ($2n=28$, AABB), mentre fenomeni di impollinazione naturale di specie tetraploidi con altre specie selvatiche, come *Aegilops squarrosa* ($2n=14$, DD), hanno dato origine a specie esaploidi ($2n=42$, AABBDD).

Delle 16000 Mbp che costituiscono il genoma del frumento, circa l'80% è rappresentato da sequenze di DNA ripetitive non codificanti che risultano specie specifiche; fra queste è sparso un numero molto ridotto di singoli geni codificanti (Devos *et al.*, 2000; Francki *et al.*, 2002). Su ogni cromosoma ci sono circa 6-8 regioni ricche di geni separate da regioni povere di geni, che sono costituite da sequenze ripetitive di retrotrasposoni, pseudogeni ed eterocromatina. Le regioni povere di geni sono distribuite in modo irregolare lungo i cromosomi e risultano concentrate a livello dei centromeri o in prossimità di regioni ricche di geni o agli apici dei cromosomi stessi (Sandhu *et al.*, 2002).

Proteine

Un primo studio sistematico delle proteine del frumento risalente al 1907 proponeva un sistema di classificazione delle proteine di riserva in base alla loro solubilità e ha portato all'individuazione di quattro classi:

- albumine: solubili in acqua
- globuline: solubili in soluzioni saline
- gliadine: solubili in etanolo 70-90%
- glutenine: solubili in acidi o alcali diluiti.

Una classificazione più attuale tende, invece, a dividere le proteine in tre gruppi:

- di riserva
- strutturali e metaboliche
- protettive.

Nel grano le maggiori proteine di riserva sono le prolamine, costituite da una miscela di gliadine e glutenine, proteine ricche in proline (1 residuo su 7) e glutamine (1 residuo su 3), ma povere in lisina, acido aspartico, arginina, acido glutammico e istidina (Kasarda *et al.*, 1984), che si localizzano nella parte ricca di amido dell'endosperma. Le altre classi proteiche non sono state ancora ben caratterizzate sia perché il loro ruolo nella determinazione della qualità della farina non è ancora ben definito, sia perché sono componenti minori dell'endosperma. La sintesi delle proteine di riserva avviene a livello del reticolo endoplasmico rugoso (RER) e poi esse vengono trasportate, all'interno di vacuoli specifici, attraverso il lume dell'apparato di Golgi, per essere infine depositate in corpi di riserva (Vensel *et al.*, 2005).

Un ulteriore sistema di classificazione suddivide tutte le prolamine delle *Triticeae* (frumento, orzo e segale) in base al contenuto di zolfo:

- ricche di zolfo
- povere di zolfo
- ad alto peso molecolare (HMW) (Shewry *et al.*, 2002).

Per meglio comprendere le successive analisi delle singole frazioni proteiche, in Fig.10 viene riportata una sezione della cariosside del frumento.

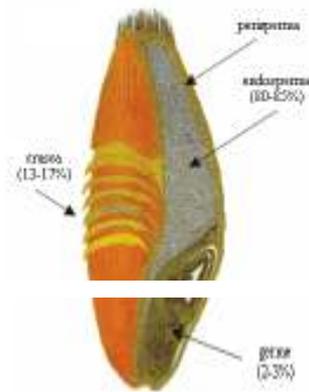


Fig. 10. Sezione della cariosside di frumento.

Albumine, globuline e triticine

Albumine e globuline si accumulano a livello dell'involucro del seme, dell'embrione e dello strato aleuronico e costituiscono circa il 20% della cariosside. I geni che codificano per queste proteine sono localizzati sui cromosomi dei gruppi 3, 4, 5, 6, e 7.

Le globuline in particolare (PM = 20-30KDa) sono molto solubili in soluzioni saline. All'interno delle cellule si trovano in corpi di riserva, dove svolgono principalmente la funzione di immagazzinamento. Sono composte da subunità multiple tenute insieme da forze di legame non covalenti (come interazioni idrofobiche, elettrostatiche e legami idrogeno) e per questo vengono definite eterooligomeri non equimolari. Un'analisi più approfondita ha dimostrato che le subunità che compongono le globuline si possono raggruppare in due *range* di pesi molecolari: tra 20 e 27KDa e tra 30 e 37KDa; si è quindi ipotizzato che questi due gruppi possano corrispondere rispettivamente a subunità basiche e acide (Marcone 1998). Le triticine sono proteine tetrameriche localizzate nei corpi proteici a livello dell'endosperma amilaceo dei chicchi. In termini di composizione aminoacidica, hanno un contenuto in lisina e treonina più elevato rispetto alle proteine del glutine. Le triticine vengono codificate da geni che si trovano strettamente associati sul braccio corto dei cromosomi 1A (*locus Tri-A1*) e 1D (*locus Tri-D1*). In quanto a solubilità, si comportano come le globuline, quindi sono solubili in soluzioni saline (Okita *et al.*, 1982; Gianibelli 2001; Vensel *et al.*, 2005).

Gliadine e glutenine

Gliadine e glutenine sono le principali frazioni proteiche del glutine e sono responsabili delle caratteristiche tecnologiche e nutrizionali dei prodotti a base di farina di frumento; in particolare le glutenine sono responsabili della viscosità ed elasticità, mentre le gliadine dell'estensibilità degli impasti. Mentre le gliadine sono monomeriche, le glutenine sono polimeriche, stabilizzate da ponti disolfuro; è possibile, però, che alcune gliadine diventino parte dei polimeri gluteninici se il numero dei residui cisteinici risulta mutato (Ferrante *et al.*, 2006).

La loro sintesi si verifica in un preciso lasso di tempo durante il processo di formazione del seme, in cui i trascritti di mRNA che codificano per queste proteine sono presenti esclusivamente nei tessuti di riserva (Francki *et al.*, 2002; Shewry *et al.*, 2002). Queste proteine vengono depositate nei corpi proteici dei vacuoli. È stata dimostrata l'esistenza di due differenti tipi di corpi proteici, a bassa e ad alta densità, che si accumulano contemporaneamente ed indipendentemente durante lo sviluppo delle cellule dell'endosperma. Date le notevoli dimensioni dei corpi proteici, essi vengono trasportati direttamente a livello dei vacuoli senza passare attraverso l'apparato del Golgi. Tuttavia questo tipo di trasporto può operare simultaneamente ad una via Golgi-mediata verso i vacuoli, nei quali le proteine si condensano nei corpi proteici a livello del reticolo postendoplasmico.

Dagli studi effettuati si è potuto osservare che le gliadine sembrano essere trasportate con entrambe le vie. Le glutenine, invece, sono sintetizzate sulla membrana dei polisomi e sequestrate a livello del reticolo endoplasmico rugoso (RER) e studi di microscopia ottica hanno messo in evidenza come utilizzino solamente la via Golgi-mediata (Rubin *et al.*, 1992; Blatter *et al.*, 2004).

Gliadine

Le gliadine costituiscono la principale frazione proteica di riserva dei chicchi e hanno un elevato contenuto in glutamine (30-50%) e proline (15-30%), ma uno scarso contenuto in lisine e aminoacidi ionici (istidina, arginina, lisina e gruppi carbossilici liberi di acido aspartico e glutammico) (Rocher *et al.*, 1995; Devos *et al.*, 2000; Van Herpen *et al.*, 2006). Le gliadine sono proteine monomeriche in quanto naturalmente prive di residui di cisteina o perché tutti i residui di cisteina presenti sono impegnati in legami disolfuro intramolecolari. Le gliadine hanno un peso molecolare compreso tra 30 e 70KDa e sono state classificate in α -, β -, γ - e ω -gliadine in base alla loro mobilità elettroforetica in ambiente acido (Fig. 11) (Pogna *et al.*, 1894; Wieser, 1996; Giroux e Morris, 1998; Chen *et al.*, 2007; Ferranti *et al.*, 2007).

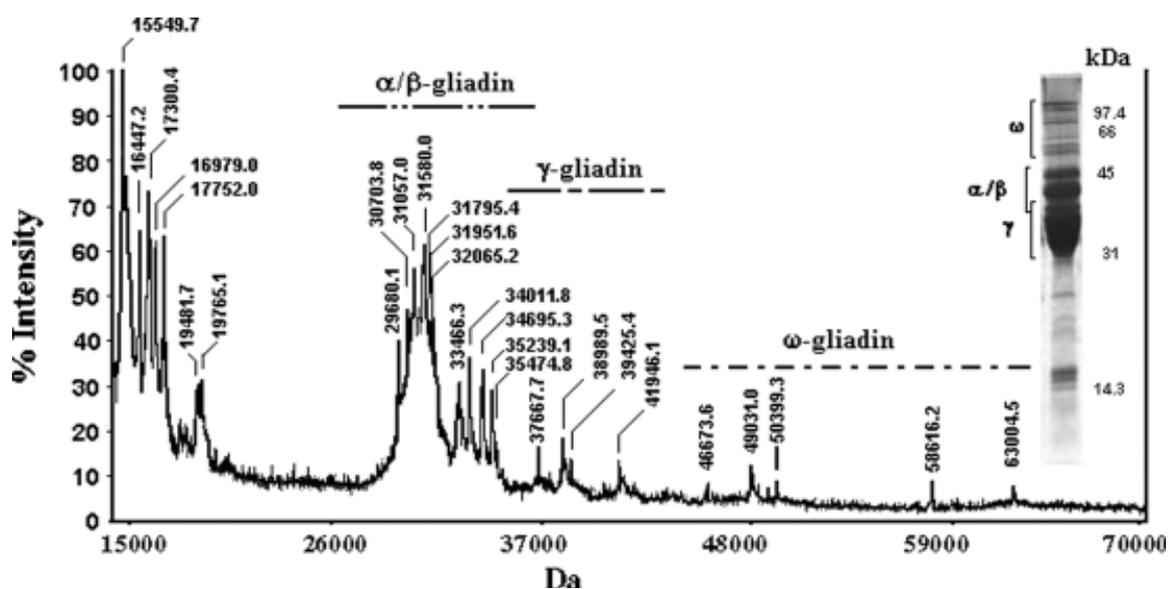


Fig. 11. a) Separazione in spettrometria di massa delle gliadine di frumento di pesi molecolari con un range 30-50 KDa che corrispondono ai pesi molecolari delle componenti α/β -, γ - e ω - gliadine
b) Gel di poliaccrilamide a pH acido (A-PAGE).

Le α - e β -gliadine hanno un peso molecolare compreso tra 30 e 50KDa e hanno una sequenza aminoacidica molto simile, tanto che spesso vengono classificate complessivamente come α/β -gliadine. In Fig. 12 è riportata la struttura schematica delle α/β -gliadine. Le α -gliadine sono

presenti solo nel frumento e nelle specie correlate di *Triticum* ed *Aegilops*, ma non in orzo e segale. Le sequenze dimostrano che la struttura primaria di queste proteine è costituita da diversi domini di dimensioni variabili, una caratteristica comune a tutte le prolamine. La regione N-terminale è un breve dominio costituito da 5 residui aminoacidici (VRVPV). Il dominio centrale ripetitivo ha più di 100 residui organizzati come sequenze ripetute di uno o due motivi costituiti da glutamina, prolina e aminoacidi idrofobici (fenilalanina o tirosina), ma privi di cisteine: PQQPFP e PQQPY. La regione C-terminale, un dominio non ripetuto, è costituita da una serie di segmenti di poliglutamine e sequenze uniche particolarmente ricche in lisina e arginina che contengono sei residui di cisteina.

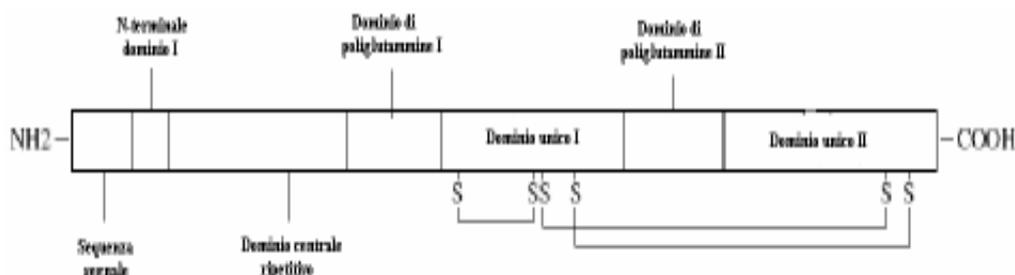
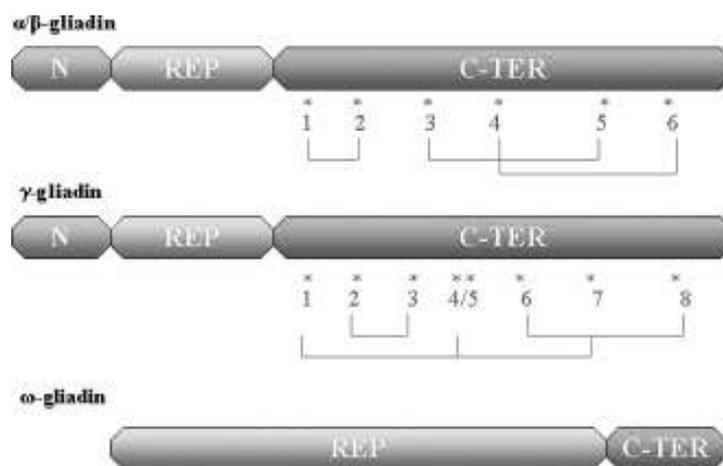


Fig. 12. Struttura schematica di un'α/β-gliadina. La proteina consiste di una sequenza segnale, un corto peptide N-terminale, un dominio ripetitivo e un più lungo dominio non ripetitivo, separato da due sequenze poliglutamine ripetute.

Le γ-gliadine hanno lo stesso peso molecolare delle α/β-gliadine, ma differiscono nella quantità di acido aspartico, prolina, metionina, tirosina, fenilalanina e triptofano. Anche le γ-gliadine sono formate da tre regioni distinte: un breve dominio N-terminale di 12 residui (NMQVDPSGQVQW), un dominio centrale formato dalla ripetizione di una sequenza ricca in prolina e glutamina (PQQPFPQ) e un dominio C-terminale con otto residui di cisteina. Il dominio ripetuto è ricco di β-foglietti che possono formare una struttura più estesa; il dominio non ripetitivo è ricco invece in α-eliche.

Le ω-gliadine hanno un peso molecolare compreso tra 44 e 74KDa e differiscono nella composizione aminoacidica dalle altre in quanto prive di cisteine.

Sono caratterizzate da più alti livelli di glutamina, prolina e fenilalanina che rappresenta più dell'80% dei residui aminoacidici totali. Sulla base delle sequenze N-terminali, si possono distinguere tre differenti tipi di ω -gliadine, chiamate ARQ-, KEL e SRL-. Il dominio centrale è costituito da una sequenza ripetuta di otto aminoacidi: PQQFPQQ, (Schema 1).



Schema 1. Sono rappresentate le catene polipeptidiche dell' α/β -, γ - e ω - gliadine. N,N –domini terminali, REP, domini ripetuti, C-Ter, domini C-terminali. Gli asterischi indicano la posizione dei residui di cisteina. Sono riportati anche i legami disolfuro in α/β e γ -gliadina.

I geni che codificano per queste proteine sono localizzati sul braccio corto de cromosomi dei gruppi 1 e 6. I *loci* che codificano per la maggior parte delle α - e β - gliadine sono localizzati sui cromosomi della serie 6 e sono indicati come *Gli-2* (*Gli-A2*, *Gli-B2*, *Gli-D2*), mentre quelli codificanti la maggior parte delle γ - e ω -gliadine sono localizzati sui cromosomi della serie 1 e sono indicati come *Gli-1* (*Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*). I *loci* che codificano per le α/β -gliadine sono multigenici e comprendono 25-150 geni a seconda delle specie di frumento; queste differenze sono probabilmente dovute a duplicazioni o delezioni che in alcune linee di frumento portano alla perdita di un'intera classe di geni. Il 50% di questi geni sono in realtà pseudogeni con sostituzioni C→T che portano a codoni di stop. Per le γ -gliadine è stato identificato un numero di geni compreso tra 17 e 39 e per le ω -gliadine da 15 a 18 (Reeves *et al.*, 1986; Sandhu *et al.*, 2002).

Glutenine

Le glutenine sono proteine polimeriche con un peso molecolare che può variare da 60KDa fino a milioni di Da, costituendo i polimeri di maggiori dimensioni presenti in natura. Queste proteine sono costituite da una miscela eterogenea di polimeri uniti da legami disolfuro e possono essere classificate in quattro gruppi in base alla loro mobilità elettroforetica dopo riduzione dei legami S-S. Il gruppo A ha un peso molecolare compreso tra 80 e 120KDa e corrisponde alle subunità delle glutenine ad alto peso molecolare (HMW-GS). I gruppi B e C hanno un peso molecolare compreso tra 30 e 40 KDa, corrispondono alle subunità delle glutenine a basso peso molecolare (LMW-GS) e comprendono proteine simili alle α - e γ -gliadine. Il gruppo D deriva anch'esso dalle LMW-GS, ma è costituito prevalentemente da proteine acide simili alle ω -gliadine (Gianibelli 2001). In Fig. 13 sono riportate le frazioni gluteniniche separate mediante SDS-PAGE monodimensionale e bidimensionale (D'Ovidio *et al.*, 2003; Martinez Ma del Carmen *et al.*, 2004).

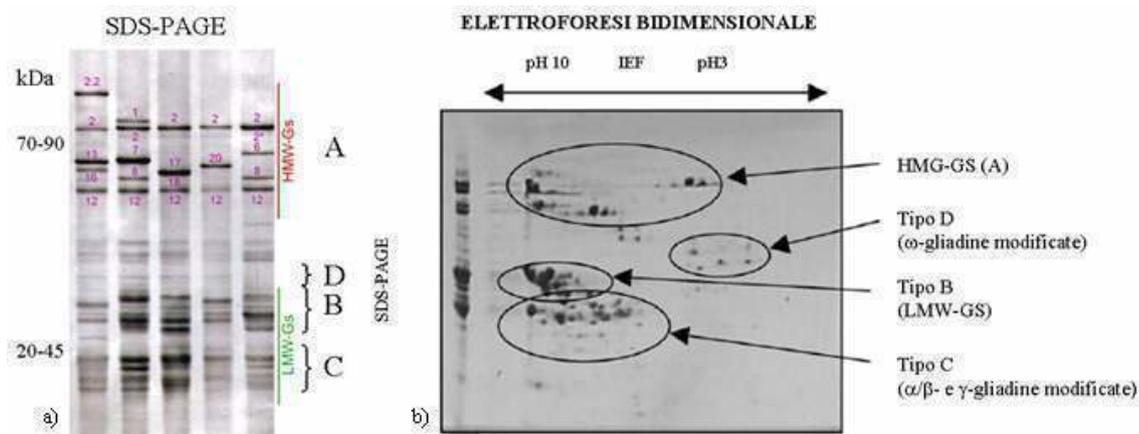


Fig. 13. a) classificazione e peso molecolare delle subunità delle glutenine comprese nei gruppi A, B, C, D in SDS-PAGE monodimensionale;
b) elettroforesi bidimensionale di subunità gluteniniche: sono indicati i tipi B- e C- delle HMW-GS e il tipo D- delle LMW-GS.

Subunità ad alto peso molecolare (HMW-GS)

Le glutenine ad alto peso molecolare rappresentano la componente minore in termini di quantità: rappresentano solo il 5-10% delle proteine totali della cariosside matura. A differenza delle altre proteine di frumento, hanno un alto contenuto in glicina (più del 20%) e un basso contenuto in prolina (Buonocore, 1996.).

Le HMW-GS hanno un peso molecolare compreso tra 70 e 90KDa e sono caratterizzate da una regione centrale, con conformazione a β -foglietto, ricca di glutamine e proline, responsabili dell'elasticità e flessibilità della struttura proteica, e da regioni terminali, che presentano struttura ad α -elica e contengono residui di cisteine coinvolti nella formazione dei ponti disolfuro. Sono codificate da geni i cui *loci* sono localizzati sui bracci lunghi dei cromosomi 1A, 1B e 1D (indicati come *Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1*). Ciascuno di questi *loci* include due geni strettamente associati che codificano per due tipi diversi di HMW-GS: le subunità di tipo x e y. La subunità di tipo x ha una mobilità elettroforetica minore in SDS-PAGE che rispecchia un peso molecolare più elevato rispetto alla subunità y (Giroux *et al.*, 1998). Le subunità HMW-GS di tipo x e y sono costituite da tre domini: un dominio N-terminale di circa 100 residui, un dominio centrale ripetuto, costituito da un corto motivo che rappresenta circa l'85% della sequenza della proteina e un dominio C-terminale di circa 50 residui. Le subunità di tipo x possiedono quattro residui di cisteina per catena polipeptidica, di cui tre localizzati nella regione N-terminale ed uno nella sequenza C-terminale. Le subunità di tipo y possiedono sette residui cisteinici, di cui cinque localizzati nell'estremità N-terminale e due in quella C-terminale. La differenza che si osserva tra le subunità di tipo x e y, relativamente al numero di cisteine presenti nel dominio N-terminale, è dovuta probabilmente ad un evento di delezione che ha coinvolto due delle cinque cisteine presenti nell'estremità N-terminale delle subunità di tipo y. Da un punto di vista funzionale le HMW-GS agiscono come elementi estensori dei polimeri del glutine formando legami inter-molecolari con le altre subunità gluteniniche mediante due delle cinque cisteine presenti nella catena polipeptidica, una localizzata nel dominio N-terminale e l'altra nel dominio C-terminale (Kawaura *et al.*, 2005).

I residui di cisteina presenti sono coinvolti, inoltre, nella formazione di ponti disolfuro intra-molecolari tra le HMW-GS e le LMW-GS per formare polimeri di proteine con un *range* di dimensioni che può arrivare al milione di Dalton (Fig.14).

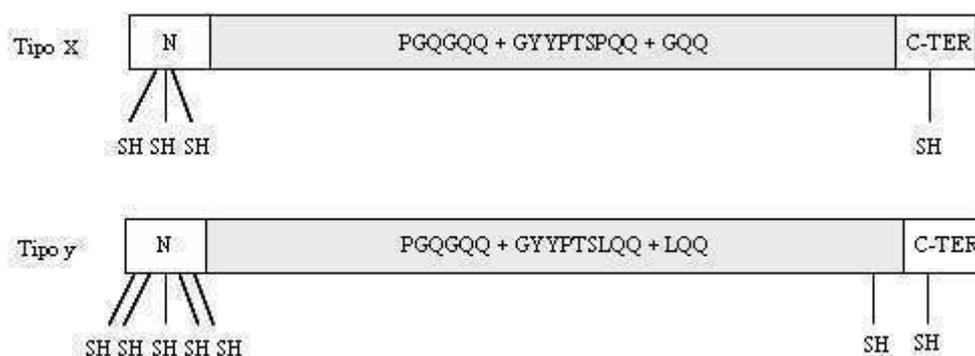


Fig. 14. Rappresentazione schematica della catena polipeptidica delle HMW-GS di tipo x e y. Sono indicati i residui di cisteina (SH), 4 per il tipo x e 7 per il tipo y.

Subunità a basso peso molecolare (LMW-GS)

Le subunità LMW-GS vengono classicamente suddivise in 3 gruppi: B, C e D, in base al peso molecolare e al punto isoelettrico. Le più rappresentative sono quelle del gruppo B, che hanno un peso molecolare tra 42 e 51KDa; quelle del gruppo D invece hanno un peso molecolare tra 55 e 70KDa e corrispondono a ω -gliadine mutate, in quanto contengono una cisteina in più che risulta spaia e induce un comportamento alterato. Le proteine del gruppo C invece hanno un peso molecolare compreso tra 30 e 40KDa; questo è il gruppo meno caratterizzato a causa delle difficoltà nella separazione e purificazione dovute alle forti similitudini con le subunità B (Muccilli *et al.*, 2005).

Sulla base delle caratteristiche strutturali dei gruppi B, C e D, è stata ipotizzata la possibilità di raggruppare le LMW-GS in 2 classi funzionali: una include la maggior parte delle subunità B e agisce come estensore dei polimeri in crescita grazie alla capacità di formare due ponti disolfuro inter-molecolari, l'altra include la maggior parte delle subunità C e D e agisce come terminatore della catena dei polimeri in crescita perché ha solo una cisteina libera in grado di formare un ponte disolfuro (Masci *et al.*, 2002). Sulla base della sequenza N-terminale, in accordo con il primo residuo aminoacidico della proteina matura, si possono distinguere 3 sottogruppi: LMW-s (serina), LMW-m (metionina), LMW-i (isoleucina). Le LMW-s sono le più abbondanti, il loro peso molecolare medio è compreso tra 35 e 45KDa e la sequenza aminoacidica N-terminale è SHIPGL.

Le LMW-m hanno un peso tra 30 e 40KDa e la sequenza aminoacidica N-terminale è molto più varia: METSHIGPL, METSRIPGL o METSCIPGL. La grande differenza tra questi due sottogruppi risiede nella mancanza, nelle LMW-s, dei primi tre aminoacidi (MET) e questo può suggerire che si verifichi un diverso processamento delle informazioni. Le LMW-i sono invece considerate delle forme varianti, in cui manca del tutto la regione N-terminale; queste proteine iniziano direttamente con il dominio centrale preceduto solo da una breve sequenza segnale ISQQQQ.

Nelle subunità a basso peso molecolare si identificano 4 regioni strutturali: un peptide segnale di 20 aminoacidi, una corta regione N-terminale (costituita da 13 aminoacidi), un dominio centrale ricco di glutamine e una regione C-terminale; la regione C-terminale può essere suddivisa in una regione ricca di cisteine, una regione ricca di glutamine e una regione altamente conservata (Fig. 15).

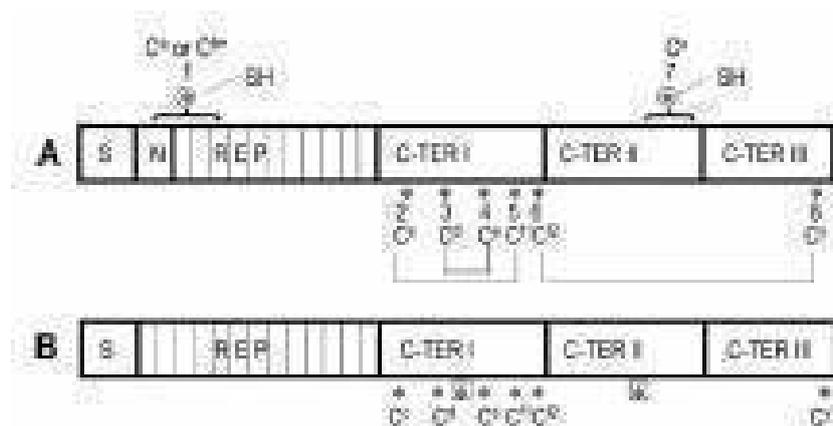


Fig. 15. Struttura delle LMW-GS dedotta dai geni codificanti. a: LMW-m e LMW-s type; b: LMW-i type. S: peptide segnale; N: regione N-terminale; REP: dominio ripetitivo; C-TER: regione C terminale; gli asterischi cerchiati (a) indicano dei residui di cisteina che molto probabilmente sono coinvolti in ponti disolfuro intermolecolari; gli asterischi quadrati (b) indicano i due residui cisteinici in piu, presenti nelle LMW-GS di tipo i.

Le LMW-GS sono codificate dai loci *Glu-3A*, *Glu-3B* e *Glu-3D*, presenti sul braccio lungo dei cromosomi del gruppo 1 (1A, 1B, 1D), i quali sono strettamente associati al complesso *Gli-1* che, come precedentemente riferito, controlla la sintesi delle γ - e ω -gliadine (Zhao *et al.*, 2004).

Un'attenzione particolare deve essere riservata alle proteine del gruppo B, sia per la loro abbondanza che per la loro importanza nel determinare le caratteristiche delle farine. Queste frazioni sono costituite per la maggior parte da serine (52%) e metionine (24%).

Grazie allo sviluppo delle tecniche di elettroforesi bidimensionale, è stato possibile associare le subunità B al *locus Glu-3B*, che si trova sul braccio corto del cromosoma 1B, a poca distanza dal *locus Gli-1B*, identificato a livello centromerico dello stesso cromosoma. Il *locus Glu-3B* è stato definito come un *locus* complesso ed è stato dimostrato che a questo livello sono codificate anche subunità di tipo D, anche se la maggior parte di queste viene codificata a livello del *locus Glu-2B*, sempre sul braccio corto del cromosoma 1 (D'Ovidio, 2004) (Fig.16).

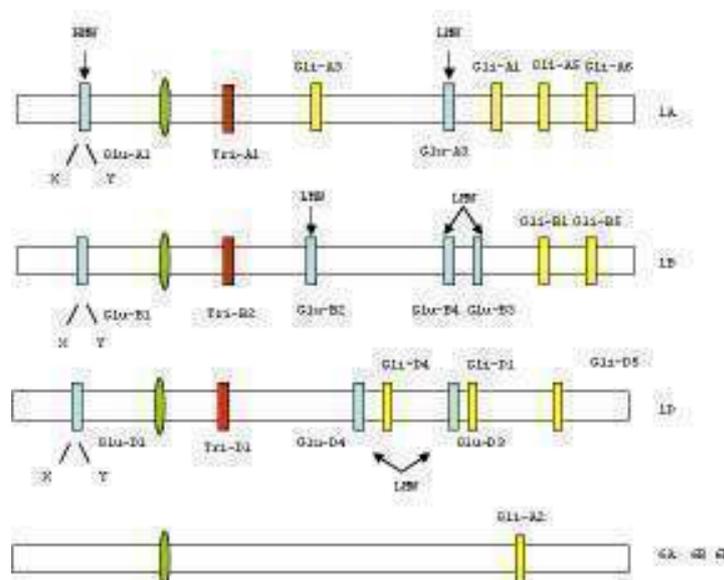


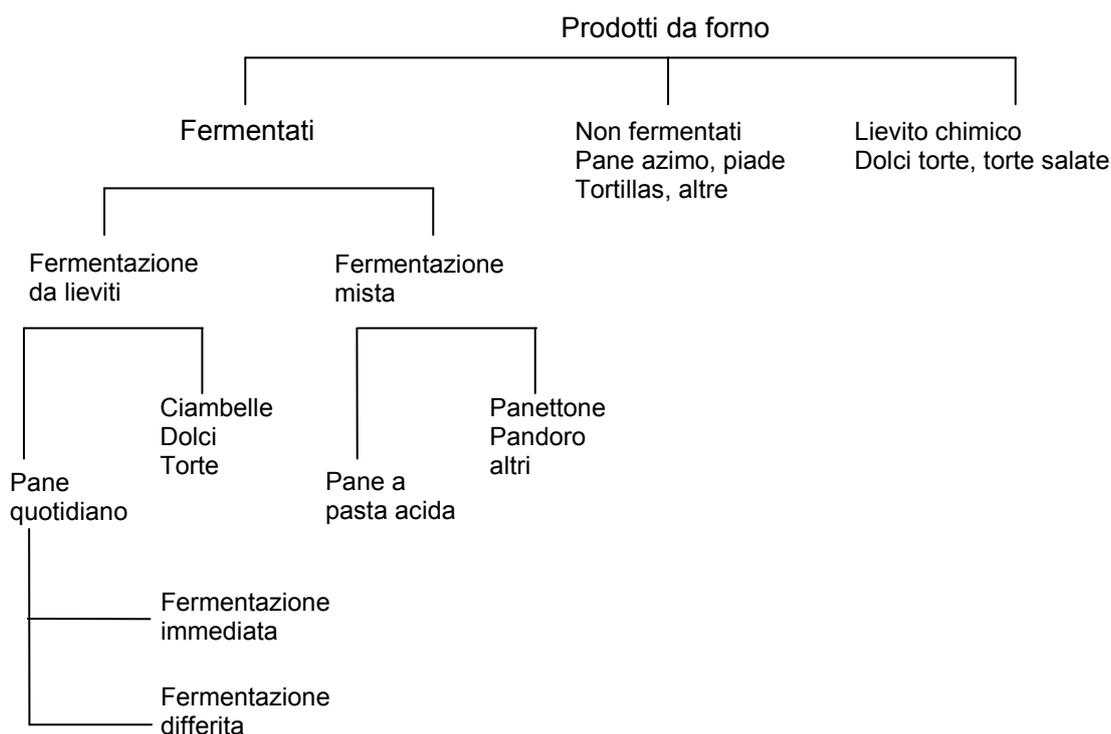
Fig. 16. Schema riassuntivo relativo alla localizzazione cromosomica dei geni codificanti le diverse proteine di riserva del frumento; i loci indicati con HMW o LMW codificano rispettivamente per le HMW-GS e le LMW-GS. I loci indicati con il colore giallo (compresi quelli minori) sono relativi alle gliadine. I loci indicati in rosso sono quelli che codificano per le triticine. L'ovale verde corrisponde al centromero.

Per quanto riguarda le frazioni di tipo C si è visto che hanno sequenze N-terminali che corrispondono alle sequenze delle α/β - e delle γ -gliadine (con una percentuale del 95%); da questo si può dedurre che è possibile che queste frazioni vengano codificate a livello dei loci *Gli-1* e *Gli-2*, oltre che dal locus *Glu-3*. La maggior parte delle dimensioni dei geni varia da 909 a 1167bp, in accordo con le grandezze delle proteine codificate che hanno peso molecolare compreso tra 32 e 42,8 KDa. Come suggerito da Shewry nella teoria dell'evoluzione delle prolamine, si può identificare come maggior elemento responsabile della variabilità delle dimensioni dei geni la presenza di sequenze ripetitive che sono state introdotte da fenomeni di delezione e/o inserzione o da crossing-over sfalsato durante la replicazione del genoma; questi domini ripetitivi sono probabilmente i maggiori responsabili delle caratteristiche idrofiliche delle LMW-GS. La struttura delle LMW-GS è poco conosciuta, ma è stato proposto che il dominio N-terminale sia costituito da forme irregolari disposte a β -foglietto, mentre nel dominio C-terminale ci sarebbe una predominanza di α -eliche; questi risultati teorici, sono supportati da studi di predizione della struttura proteica secondaria (Field *et al.*, 1987).

IL PANE

Pane e prodotti da forno

Il pane ed i prodotti da forno sono alimenti ottenuti per cottura di impasti fermentati, gli ingredienti basilari di tali impasti sono: farina, acqua, lievito e sale. Generalmente viene impiegata farina di frumento tenero *Triticum vulgare* o di frumento duro *Triticum durum* e di segale *Secale cereale*. Questi alimenti trovano largo consumo in Europa ed in altre parti del mondo dove sono stati importati dagli stessi europei (Australia, Nuova Zelanda, America del nord e gran parte dell'America del sud). Per altri continenti i cereali autoctoni e tradizionalmente coltivati sono: il riso in Asia, il sorgo in Africa ed il mais in America con i quali non si può ottenere pane perché l'impasto della loro farina non ha capacità di lievitazione in quanto non riescono a trattenere il gas della fermentazione (Zambonelli *et al.*, 2001) (Schema 2.).



Schema 2. Classificazione dei prodotti da forno

Lievitazione degli impasti

Con il termine *lievitazione* si intende "l'aumento di volume per azione dei gas durante la fermentazione dovuta al lievito".

Le caratteristiche strutturali e sensoriali del pane sono influenzate dalle tecniche di fermentazione degli impasti, tra queste ricordiamo:

- fermentazione con lievito compresso od essiccato (*Saccharomyces cerevisiae*)
- fermentazione per aggiunta di pasta acida e lievito compresso
- impiego esclusivo di *lievito naturale*
- impiego di starter microbici

Fermentazione con lievito compresso

La fermentazione con lievito compresso (colture prevalentemente costituite da cellule di *Saccharomyces cerevisiae*) fu introdotta nell'industria panaria dopo che fu chiaro il ruolo dei saccaromiceti nella lievitazione. In un primo tempo veniva utilizzato il residuo della fabbricazione della birra lavato delle impurezze. Oggi viene prodotto *ad hoc* e si trova in commercio o come lievito in pani compresso, con un contenuto in acqua del 60-75%, o essiccato, conservabile a lungo, con un contenuto in acqua del 4-10%. Al momento dell'uso va rinvigorito. Per questo si stempera in poca acqua tiepida, meglio in acqua zuccherata che vien aggiunta alla farina, per fare un impasto. Appena la massa è fermentata si introduce nell'impasto da lievitare. Questa tecnica offre numerosi vantaggi:

- garanzia di una fermentazione rapida e costante nel tempo
- possibilità di avere a disposizione il lievito in qualunque momento della giornata
- sofficià del prodotto e quindi una più facile ed uniforme cottura (il pane risulta con crosta sottile e mollica meno acquosa)
- diminuzione dei tempi di lavorazione

Per contro, la lievitazione condotta con lievito compresso determina una minore durata di conservazione del pane.

Fermentazione con lievito naturale

Si intende per *lievito naturale* un impasto formato da farina ed acqua lasciato fermentare, senza l'ausilio di lieviti incorporati volontariamente, per un periodo di tempo più o meno lungo. Il risultato dell'evoluzione biologica dell'impasto è una coltura di lieviti e batteri lattici indigeni che aggiunta a farina ed acqua è in grado di causarne la lievitazione. Il lievito naturale viene aggiunto in quantità pari al 5-20% dell'impasto totale ed è ottenuto attraverso aggiunte successive di farina ed acqua. Nella pratica si preferisce operare due o tre rinfreschi successivi. A questo punto il lievito, che viene chiamato "di tutto punto", presenta l'aspetto di una pasta elastica ed estensibile pronta per l'utilizzo. Oltre a quello appena descritto sono diffusi nella pratica altri schemi di preparazione che consentono di differenziare in maniera apprezzabile un lievito dall'altro. L'utilizzo del lievito naturale nel processo di panificazione da un lato richiede tempi di fermentazione più lunghi, dall'altro permette di ottenere prodotti con proprietà sensoriali caratteristiche, in particolare si ha:

- formazione di composti organici volatili durante la fermentazione e la cottura che danno sapore e profumo caratteristici
- alveolatura fine e regolare dovuta alla lenta e graduale formazione di CO₂ durante la lievitazione
- maggiore digeribilità: la fermentazione lenta infatti consente la formazione di molecole più semplici
- tempi più lunghi di conservazione (l'acidità dell'impasto contrasta lo sviluppo di muffe e rallenta il fenomeno del raffermaimento).

Fermentazione con lievito naturale e lievito compresso

Molti panificatori utilizzano come lievito una porzione di impasto della lavorazione precedente ed al momento della miscelazione degli ingredienti aggiungono una quantità di lievito compresso proporzionale alla massa da panificare. L'avvio della fermentazione è in questo modo garantito comunque dal lievito compresso, questa tecnica offre il vantaggio di rapide e sicure fermentazioni e caratteristiche sensoriali intermedie rispetto al pane prodotto con solo lievito naturale e pane prodotto con lievito compresso.

Fermentazione con colture starter

Gli starter microbici sono delle colture pure o miste in forma liquida, semi liquida, secca (disidratata o liofilizzata). Questa forma di inoculo non è molto diffusa anche se i vantaggi legati al suo utilizzo sono svariati:

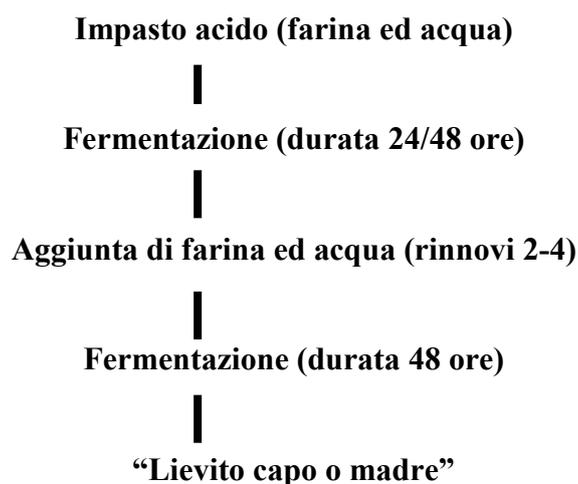
- una più facile organizzazione della produzione
- diminuzione della quantità di lievito
- ottimizzazione e standardizzazione del processo di lievitazione (scelta di ceppi selezionati sulla base di criteri tecnologici e sensoriali).

Le specie di lieviti e batteri lattici impiegati per la produzione di starter sono diverse e la scelta viene fatta in base alle caratteristiche metaboliche delle specie e dei fenomeni di mutualismo che si possono instaurare tra i diversi tipi di microrganismi.

Il lievito naturale

Preparazione del lievito naturale

La preparazione di un *lievito naturale* (Schema 3) richiede una serie di tappe volte principalmente alla moltiplicazione dei lieviti presenti nella farina e dei batteri che determineranno le caratteristiche sensoriali del prodotto finito. Le fasi dell'elaborazione prevedono la formazione di un impasto di farina ed acqua lasciato riposare per 24-48 ore. Durante questo intervallo si ha una leggera acidificazione dell'impasto ad opera di enterobatteri ed in misura minore da batteri lattici. A questo punto si rende necessario aggiungere nuova farina ed acqua lasciando fermentare per due giorni. Questa pratica, che prende il nome di "rinnovo" o "riporto", impedisce all'impasto di sviluppare un odore acre e sgradevole, si procede con ulteriori rinnovi fino ad un prodotto con profumo gradevole e sapore leggermente acido che prende il nome di "madre" o "lievito capo". La madre è il punto di partenza per la preparazione dei quantitativi necessari di lievito da impiegare nella panificazione.



Schema 3. Fasi della preparazione del lievito naturale

Origine, selezione e dinamica dei microrganismi del lievito naturale

L'origine primaria della microflora del lievito naturale è da ricercare nelle materie prime utilizzate, quali farina e componenti vegetali. Infatti nelle farine sono presenti i microrganismi abituali delle cariossidi e microrganismi accidentali derivanti dagli ambienti di lavorazione (Tab. 3).

GRUPPI MICROBICI	GENERI
Muffe	<i>Penicillium, Aspergillus, Rhizopus, Fusarium, Mucor</i>
Lieviti	<i>Saccharomyces, Candida</i>
Batteri	<i>Enterobacter, Bacillus, Lactobacillus, Streptococcus, Micrococcus</i>

Tab. 3. I microrganismi delle farine

Le differenti tecnologie di preparazione e di mantenimento del lievito naturale incidono notevolmente sul tipo e sui rapporti dei microrganismi presenti. L'inizio della fermentazione è attribuibile agli enterobatteri che rimangono prevalenti fino a circa 20 ore dalla preparazione dell'impasto, successivamente si assiste al rapido sviluppo dei batteri lattici che ben presto raggiungono una popolazione di 10^8 - 10^9 ufc/g di pasta. Nello stesso tempo la progressiva riduzione del pH sino a valori intorno a 4 inibisce l'accrescimento di tutti gli altri microrganismi.

In realtà anche i batteri lattici mostrano a tali valori di pH un certo rallentamento della crescita e delle attività, ed il loro numero rimane pressoché costante anche nelle fasi successive. Diversamente dai batteri lattici che hanno una elevata velocità di crescita, il numero dei lieviti progredisce lentamente. Dopo circa 25 ore dalla preparazione dell'impasto, il loro numero è minore di 1×10^3 ufc/g di pasta; dopo 42 ore tale valore si attesta intorno a 1×10^5 ufc/g di pasta, per raggiungere alla fine valori tra 1×10^6 - 1×10^8 ufc/g di pasta (Lonner *et al.*, 1986). La microflora, anche se stabilmente costituita da lieviti e batteri lattici, è variabile oltre che quantitativamente anche qualitativamente.

Nella tabella 4 sono riportati i lieviti ed i batteri lattici maggiormente riscontrati nelle paste acide naturali e nei prodotti da esse derivati. Alcune specie hanno un'ampia diffusione e sono state riscontrate in campioni di diversa origine e provenienza (Kline e Sugihara, 1970; Gatti *et al.*, 2001; Foschino *et al.*, 2001; Corsetti e Gobbetti, 2002; De Angelis *et al.*, 2003; Foschino *et al.*, 2005; Di Cagno *et al.*, 2006; De Angelis *et al.*, 2006; Ganzle *et al.*, 2006; Gobbetti *et al.*, 1994, 1995, 1996, 2007; Koistinen *et al.*, 2007).

Specie di batteri lattici	Specie di lievito
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Candida milleri</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Candida holmii</i>
<i>Lactobacillus bruchneri</i>	<i>Pichia anomala (hansenula anomala)</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Pichia sbpelliculosa(hansenula subpelliculosa)</i>
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>Pichia saitoi(Saturnispora saitoi)</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus farciminis</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	<i>Torulopsis stellata</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Torulopsis holmii</i>
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>Candida humilis</i>
<i>Leuconostoc spp.</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	

Tab. 4. Batteri lattici e lieviti più frequentemente isolati da impasti acidi o prodotti analoghi

I fattori che influenzano i rapporti tra le specie microbiche del lievito naturale.

I fattori che influenzano i rapporti tra le specie microbiche presenti nel lievito naturale sono principalmente la temperatura, la composizione della farina, l'idratazione dell' impasto, il contenuto di cloruro di sodio, la concentrazione di acidi organici ed il tempo che intercorre tra un rinnovo e l'altro. Più sono restrittive e costanti nel tempo le variabili considerate minore è il numero di specie riscontrate nel lievito naturale.

Ad esempio, lieviti naturali conservati per lungo tempo con una bassa frequenza di rinnovi presentano un numero di specie di batteri lattici e lieviti molto limitato. Tra i primi si riscontrano soltanto specie eterofermentanti obbligate:

Lactobacillus sanfranciscensis, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus pontis*; fra i secondi specie di lievito acido resistenti ed incapaci di fermentare il maltosio: *Saccharomyces exiguus*, *Candida holmii*, *Candida milleri*, *Candida krusei*, *Pichia saitoi* (Foschino *et al.*, 1997, 2001, 2005). In particolare, in un caso di lievito naturale, mantenuto e moltiplicato in rigorose e controllate condizioni di crescita, *Candida humilis* è risultata essere l'unica specie di lievito. Per quanto riguarda i singoli parametri la loro azione può essere esemplificata come segue:

- la temperatura influenza fortemente l'attività biologica dei microrganismi e condiziona fortemente i rapporti tra le specie presenti. Intervalli di temperatura da 20 a 35 °C permettono lo sviluppo sia di lieviti che di batteri lattici, però alle basse temperature i batteri sono maggiormente inibiti rispetto ai lieviti e viceversa
- la farina contiene numerose sostanze nutritive necessarie per lo sviluppo dei microrganismi. Inoltre, durante la fermentazione, le attività enzimatiche (amilolitiche e proteolitiche) liberano zuccheri semplici ed amminoacidi le cui quantità variano secondo i tipi di farina. Nelle prime fasi della crescita, i microrganismi mostrano un'elevata domanda di aminoacidi utilizzabili per i processi di biosintesi, in questo contesto risulta importante l'attività proteolitica svolta sia dagli enzimi costitutivi della farina sia da quelli rilasciati dai microrganismi
- l'idratazione dell'impasto favorisce le attività microbiologiche ed enzimatiche; un incremento della quantità d'acqua, in genere, comporta una maggiore crescita di lieviti e batteri lattici. Per preparare e mantenere un impasto acido occorre rallentare l'attività dei microrganismi e conservare un impasto di consistenza non troppo molle
-

- il cloruro di sodio a concentrazioni superiori al 2% svolge un'azione inibitrice sui lieviti. Infatti è consigliabile aggiungere il sale solo quando l'attività dei microrganismi è al massimo livello; spesso viene, infatti, utilizzato per rallentare la fermentazione e diminuire l'idrolisi dell'impasto
- la concentrazione degli acidi organici, in particolare l'acetico inibisce lo sviluppo dei lieviti. La sensibilità di un ceppo di lievito all'acido acetico è funzione del pH, della concentrazione della sua forma indissociata
- i tempi tra un rinnovo e l'altro costituiscono dei parametri importanti al fine di mantenere costante il rapporto tra le specie presenti e di preservare la vitalità del lievito naturale
- rinnovo e mantenimento a temperatura ambiente, in questo caso il successivo rinnovo deve essere fatto entro le 10 -15 ore
- rinnovo, disidratazione dell'impasto per aggiunta di farina e conservazione in frigorifero
- rinnovo e conservazione in "bagno d'acqua" metodo diffuso in Piemonte ed in alcune zone della Lombardia oltre che per la produzione di pane, per prodotti da forno da ricorrenza (panettone, pandoro, colomba).

Caratteristiche e ruolo dei lieviti e dei batteri lattici del lievito naturale

I lieviti sono organismi tipicamente mesofili con temperatura ottimale di crescita tra i 20 e 40 °C, prediligono pH acidi (ottimo 3,5- 4,5), sono anaerobi facoltativi. Hanno esigenze nutrizionali semplici; i composti utilizzati sono carboidrati, composti azotati, vitamine. Non tutti riescono ad utilizzare il disaccaride maltosio, questo aspetto riveste notevole importanza nel caso di utilizzo in associazione con i batteri lattici. In sintesi, i lieviti sono molto meno esigenti dei batteri lattici: possono crescere impiegando lo ione ammonio come unica fonte di azoto per la sintesi di amminoacidi, purine e pirimidine.

E, nonostante siano in grado di utilizzare molti composti azotati, non presentano alcuna attività idrolitica nei confronti delle proteine.

I batteri lattici sviluppano nell'intervallo di temperatura compreso tra 5 e 53 °C, con optimum tra 30 e 40 °C in funzione della specie, il pH ottimale di crescita è di 5,5-5,8, ma riescono a moltiplicarsi sino a valori di 3,2. Le specie prevalentemente isolate da un lievito naturale appartengono ai generi *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Il metabolismo omo od eterofermentante di questi ceppi permette, a partire dagli esosi, la liberazione nel mezzo di

solo acido lattico L(+) e D(-) (omofermentanti) o di acido lattico, acido acetico, CO₂, etanolo e tracce di composti secondari (eterofermentanti) (Tab. 5).

Metabolismo	Ac.lattico	Ac. acetico	CO ₂	Tracce di altri componenti
Omofermentanti <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Pediococcus</i>	2 moli	Tracce	Per certe specie a partire da pentosi	Acetaldeide, acetoino, di acetile, isobutanolo, 2-3 metilbutanolo
Eterofermentanti <i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i>	1 mole	1 mole il rapporto acetato/etanolo dipende dal potenziale redox del mezzo	1 mole	Idem omofermentanti + Etanolo, mannitolo, propanolo, etilacetato, etanolo, 2-3 butandiolo, ottandiolo

Tab. 5. Metabolismo omo ed eterofermentante dei batteri lattici

I carboidrati metabolizzati dai batteri lattici sono numerosi; alcune specie (*Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus brevis*) utilizzano preferenzialmente maltosio e glucosio e successivamente gli altri zuccheri.

Le esigenze nutrizionali dei batteri lattici variano a seconda delle specie e dei ceppi. In generale composti di cui necessitano oltre ai carboidrati sono: vitamine, amminoacidi, peptidi, acidi grassi e loro esteri. Il ruolo principale dei batteri lattici è la produzione di acidi organici e CO₂ per degradazione dei glucidi. La quantità di CO₂ prodotta dai batteri lattici eterofermentanti è variabile a seconda delle specie e dei ceppi, comunque si tratta di quantità minori rispetto a quelle prodotte

dai lieviti. Oltre ai glucidi semplici, altri composti dell'impasto (proteine, amido, pentosani ed acidi organici) subiscono degradazioni risultanti dall'azione diretta o indiretta dei batteri lattici. La presenza degli acidi lattico ed acetico gioca un importante ruolo durante le fasi dell'evoluzione dell'impasto. L'acidità della pasta, infatti, condiziona lo sviluppo microbico e l'attività dei sistemi enzimatici della farina.

È molto importante che il rapporto acido lattico/acido acetico non si discosti dal valore ottimale di 3:1 per gli effetti che i due acidi hanno sul glutine, in quanto, l'acido lattico lo rende più elastico, l'acido acetico ne accorcia ed irrigidisce le maglie (Bianco *et al.*, 1991). La cinetica di acidificazione, il pH finale dell'impasto ed i valori del quoziente fermentativo dipendono sia da parametri tecnologici che dalle specie presenti nell'impasto. Ad esempio batteri lattici eterofermentanti quali *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fructivorans* ed *Lactobacillus fermentum* sono caratterizzati da una bassa velocità di acidificazione. Di contro i batteri lattici omofermentanti, come *Lactobacillus plantarum*, mostrano una rapida produzione di acido lattico influenzando notevolmente l'acidità dell'impasto (Gobbetti *et al.*, 1995). Gli altri acidi organici (propionico, butirrico, isobutirrico, valerico ed isovalerico) deriverebbero dalla degradazione dei lipidi e dalla deamminazione e transamminazione degli amminoacidi (Galal *et al.*, 1978) e pur essendo poco rappresentati sono altrettanto importanti per il quadro sensoriale.

Interazione tra lieviti e batteri lattici delle paste acide

Il lievito naturale è un sistema biologico in equilibrio che garantisce l'armonico sviluppo dei microrganismi in esso presenti grazie a precise interazioni che si vengono a stabilire tra gli stessi. Il numero ed il tipo di microrganismi dipende dalla capacità che essi hanno di coabitare e di determinare in sinergia l'equilibrato sviluppo dell'impasto (Boraam *et al.*, 1993). La relazione che lega lieviti e batteri lattici è da ricondurre principalmente alla produzione, degli ultimi, di antibiotici ed acidi organici, nonché all'utilizzazione non competitiva della fonte di carbonio. La modificazione dell'ambiente, in primo luogo, causa la selezione delle specie che meglio vi si adattano; la mancanza di competizione per le sostanze nutritive permette, poi, la normale crescita dei differenti microrganismi.

A conferma di ciò molti dei lieviti, che normalmente vivono nell'impasto acido, mostrano un'elevata resistenza sia agli acidi organici che agli antibiotici (Lues *et al.*, 1993). L'attività dei lieviti sui carboidrati spesso influenza in modo marcato la crescita ed il comportamento dei batteri

lattici. Ad esempio, la mancanza di competizione tra *Saccharomyces exiguus* ed *Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri* per il maltosio, determina un incremento della crescita e della produzione di acido lattico da parte di quest'ultimo.

Quando, invece, la fonte principale di carbonio è rappresentata dal glucosio, l'associazione con *Saccharomyces cerevisiae* si traduce in una riduzione della crescita del *Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri*, nonché nella produzione di acido lattico. La marcata competizione tra i due microrganismi è dovuta al più rapido consumo di glucosio da parte dei lieviti i quali ne riducono ben presto la disponibilità. (Gobbetti *et al.*, 1994).

Sino a quando un'adeguata quantità di zuccheri e vitamine è presente nella pasta, la velocità di moltiplicazione dei batteri lattici è legata alla disponibilità nel mezzo di aminoacidi. I lattobacilli, infatti, mostrano una forte domanda di questi composti, tanto che ne causano una rapida caduta di concentrazione. La disponibilità di aminoacidi aumenta quando i batteri lattici crescono in associazione con *Saccharomyces cerevisiae*.

I lieviti, infatti, sono soliti rilasciare nell'ambiente questi composti ed in presenza di NH_4Cl e di aminoacidi, essi preferiscono utilizzare il primo. Ciò stimola fortemente l'attività dei batteri determinando spesso una maggiore acidificazione dell'impasto come nel caso dell'associazione *Saccharomyces cerevisiae*-*Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri* (Spicher *et al.*, 1982). Un analogo risultato si ottiene dall'associazione *Candida krusei*-*Lactobacillus acidophilus* (Spicher *et al.*, 1981). Dagli esempi riportati si comprende l'importanza di come le differenti specie di microrganismi presenti nel *lievito naturale*, e le relazioni che intervengono a regolarne lo sviluppo e le funzioni, possano influire in modo determinante la qualità della pasta acida, giustificando, almeno in parte, l'originalità sensoriale che spesso accompagna i prodotti ottenuti da madri differenti.

Aspetti nutrizionali della pasta acida

Le paste acide sono utilizzate nella preparazione del tradizionale pane di segale (tipico delle regioni del Nord-Europa), senza le quali le farine integrali di segale o miscele di grano e segale sono molto difficili da lavorare (Katina *et al.*, 2005).

Così non solo migliorano il *flavour* e la struttura di questi pani, ma consentono il consumo di questi prodotti, ben conosciuti per le proprietà nutrizionali, e che altrimenti non potrebbero essere prodotti.

L'importanza nutrizionale delle fibre è stata dimostrata in molti studi; se ne raccomanda il consumo di 25-30 g/die (Cummings *et al.*, 1993), attualmente invece il consumo giornaliero pro capite è di 20 g/die, quindi inferiore al consumo ottimale e ciò contribuisce a diverse malattie, quali obesità, cancro colon-rettale, malattie coronariche e diabete di tipo 2.

Queste conoscenze hanno portato a un crescente interesse per i prodotti ricchi di fibre; tuttavia quando vengono utilizzate nei prodotti da forno è necessario variare diversi parametri del processo per ottenere un prodotto di qualità.

La pre-fermentazione della crusca con lieviti, ma soprattutto con lieviti e batteri lattici insieme, migliora il volume del pane e la morbidezza della mollica (Salmenkallio *et al.*, 2001), pertanto le paste acide possono effettivamente migliorare anche la panificazione con alto contenuto di fibre. Questo potrebbe essere dovuta all'attività degli enzimi endogeni delle farine, soprattutto amilasi e proteasi (Boskov-Hansen *et al.*, 2002). L'acidità prodotta durante la fermentazione abbassa il pH dell'impasto, interessando così l'attività enzimatica e le caratteristiche del glutine; il pH ottimale degli enzimi che degradano i carboidrati, come le amilasi, pentosanasi, b-glucanasi, varia tra 3.6 e 5.6, a seconda della varietà di frumento e dello stato di germinazione. Le proteinasi associate al glutine sono normalmente attive a pH inferiori a 4. In aggiunta alle fibre i semi contengono un'ampia varietà di composti bioattivi, che contribuiscono ai positivi effetti sulla salute, per esempio lignani, acidi fenolici, fitosteroli, tocoferoli e tocotrienoli e altre vitamine, concentrati nel germe e negli strati esterni del chicco. L'utilizzo delle paste acide modifica i livelli di questi composti bioattivi; tuttavia ci sono pochi dati a disposizione.

È stato riportato, per esempio, che le paste acide aumentano il contenuto di folati (Liukkonen *et al.*, 2003; Kariluoto *et al.*, 2004), diminuiscono invece il contenuto di tocoferoli e tocotrienoli. La presenza di lieviti favorisce la formazione di folati e di tiamina. L'abbassamento del pH aumenta i livelli di alcuni composti (come i composti fenolici) e diminuisce i livelli di altri composti (come tiamina e tocoferoli).

La conversione dei composti tossici

Il pane ottenuto da madre acida deve la propria popolarità alla sua naturalezza e alla tradizione; tuttavia anch'esso, a causa del contenuto di glutine, è tossico per le persone affette da celiachia (Silano *et al.*, 1999).

Nella lista della proteine che liberano peptidi tossici sono incluse anche le glutenine con alto peso molecolare (Dewar *et al.*, 2006). La proteolisi di questi peptidi tossici è resa difficile dalla posizione e dall'abbondanza dei residui di prolina (Andria *et al.*, 1980; Hausch *et al.*, 2003). A causa di questo gli individui affetti da celiachia non possono assumere prodotti contenenti glutine come pasta o pane. Recentemente, una endopeptidasi prodotta da *Flavobacterium meningosepticum*, attiva sui residui di prolina, ha mostrato effetti idrolizzanti sul peptide 33-mer; uno dei principali peptidi coinvolti nella celiachia, infatti è stato proposto l'impiego di tale endopeptidasi nella terapia orale dei pazienti affetti da celiachia (Di Cagno *et al.*, 2002) dimostrando che diversi peptidi ricchi in prolina, compreso il peptide 33-mer, possono essere idrolizzati grazie ad alcune specie di lattobacilli. E' stata prodotta una pasta acida contenente il 30% di farina di grano e il 70% di altre farine (avena, grano saraceno, miglio), fermentata per 24 h con lattobacilli selezionati. Lo starter misto, composto da *L. alimentarius*, *L. brevis*, *L. sanfranciscensis* e *L. hilgardii*, ha idrolizzato quasi completamente le frazioni di gliadina e il pane che ne è derivato ha potuto essere assunto dai pazienti affetti da celiachia (Di Cagno *et al.*, 2004). Con lo stesso obiettivo, è stata testata con successo una preparazione probiotica (VSL Pharmaceuticals, Gaithesburg, MD) contenente *Streptococcus thermophilus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii spp. bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium infantis* (De Angelis *et al.*, 2006b).

Tuttavia la possibilità di impiegare la pasta acida per la produzione di pane con farine contenenti glutine, adatto ai pazienti celiaci, è ancora oggetto di studio e al momento è stato solo dimostrato che l'utilizzo della pasta acida è in grado di migliorare le proprietà sensoriali del pane privo di glutine (Arendt *et al.*, 2007).

I Batteri Lattici del Lievito Naturale e loro metabolismo

Tra i microrganismi coinvolti nella preparazione di alimenti fermentati, i batteri lattici, sia naturalmente presenti sulle materie prime sia aggiunti agli alimenti come componenti di colture starter e/o protettive, trovano largo impiego nella produzione di una grande varietà di alimenti fermentati, come derivati del latte, della carne, di vegetali, di prodotti da forno, insilati e altri, contribuendo in vari modi nel determinare le loro caratteristiche e la loro stabilità (Villani *et al.*, 2007).

Il riconoscimento da parte di Pasteur nel 1857 della natura microbica delle fermentazioni e successivamente il primo isolamento in coltura pura di un batterio da parte di Lister nel 1878, identificato come *Bacterium lactis* (oggi *Lactococcus lactis*) portarono all'impiego nel 1890 della prima coltura starter per la produzione di formaggi, aprendo la strada per l'industrializzazione delle fermentazioni alimentari (Stiles *et al.*, 1997; Axelsson *et al.*, 1998).

I batteri lattici sono considerati organismi di grado alimentare (Food-grade) e la maggior parte di essi sono riconosciuti come generalmente sicuri per la salute umana, cioè organismi GRAS (generally recognised as safe). La qualità di grado alimentare e l'assenza di rischi per la salute sono le prime due caratteristiche che i ceppi selezionati devono possedere per far parte di una coltura starter o protettiva. Altre caratteristiche riguardano i loro effetti benefici apportati al prodotto, come l'adattamento al substrato, la capacità di competere con la microflora naturalmente presente e la produzione di metaboliti ad attività antimicrobica (acidi organici, perossido di idrogeno, enzimi, metaboliti a basso peso molecolare e le batteriocine) (Holzapfel *et al.*, 1995). Molte specie di batteri lattici rappresentano i principali microrganismi dotati di proprietà probiotiche e dunque in grado di contribuire positivamente al mantenimento e al miglioramento della salute dell'uomo. Che ceppi di lattobacilli, associati con prodotti a base di latte fermentato, potevano essere efficaci per controllare l'equilibrio intestinale umano, l'aveva già intuito, all'inizio del 1900, il premio nobel russo Elie Metchnikoff, con i suoi lavori presso l'Istituto Pasteur di Parigi.

I batteri lattici sono microrganismi ampiamente diffusi in natura, prediligendo habitat ricchi di nutrienti. Sono associati con vari prodotti alimentari come carne, latte e vegetali e alcune specie fanno parte della normale microflora della bocca, dell'intestino.

Inquadramento dei batteri lattici

La prima classificazione dei batteri lattici è dovuta ad Orla-Jensen che nel 1919 li definì come batteri Gram positivi, immobili, non sporigeni, di forma bastoncellare o coccica, capaci di fermentare gli zuccheri con produzione di acido lattico come principale prodotto. Jensen propose una prima suddivisione in funzione della morfologia cellulare (cocchi o bastoncini) e modalità di fermentazione del glucosio (omo o etero-fermentanti) e stabilì i caratteri fondamentali da considerare ai fini di una loro identificazione a livello di specie, rappresentati dalla temperatura ottimale di crescita (10 e 45°C) e dalla capacità di fermentare un certo numero di zuccheri. Sulla base di queste caratteristiche, Jensen individuò 7 generi.

Dare una definizione inequivocabile dei batteri lattici risulta abbastanza difficile. Una definizione generale, che pure con alcune limitazioni è largamente accettata, è la seguente: batteri gram-positivi con morfologia bastoncellare, coccica o cocco-bacillare, catalasi negativi, non sporigeni, privi di citocromi, anaerobi aerotolleranti, esigenti nutrizionalmente, acido-tolleranti e con metabolismo strettamente fermentativo (Schleifer *et al.*, 1995). Si tratta di un gruppo eterogeneo di microrganismi e pertanto possono esistere delle eccezioni in alcune caratteristiche elencate nella definizione generale. Nel considerare le proprietà dei batteri lattici è necessario fare alcune considerazioni:

- non posseggono citocromi e una catena di trasporto degli elettroni, traendo energia solo dalla fosforilazione a livello del substrato nel corso della fermentazione degli zuccheri. Citocromi possono essere formati da alcuni batteri lattici quando vengono coltivati su particolari terreni nutritivi contenenti ematina
- sono incapaci di sintetizzare gruppi porfirinici (gruppi eme) e dunque sono sprovvisti di una vera catalasi. Una pseudocatalasi, non eme dipendente, può essere prodotta da alcune specie di lattobacilli e di pediococchi; inoltre, in terreni nutritivi contenenti ematina o emoglobina, producono una vera catalasi
- crescono anaerobicamente. La maggior parte delle specie non è sensibile all'ossigeno e possono dunque crescere anche in sua presenza. Sono pertanto considerati come anaerobi ossigeno tolleranti
- non producono spore. Il genere *Sporolactobacillus* che filogeneticamente è strettamente correlato con i generi di batteri lattici classici produce endospore

- hanno esigenze nutrizionali complesse richiedendo per il loro sviluppo aminoacidi, purine, pirimidine e vitamine. Alcune specie di streptococchi hanno limitate esigenze nutrizionali
- sono distinti in due gruppi sulla base dei principali prodotti finali della fermentazione degli zuccheri: omofermentanti (fermentano il glucosio con produzione quasi esclusiva di acido lattico) ed eterofermentanti (fermentano il glucosio producendo acido lattico, etanolo/acido acetico e CO₂). Negli ultimi 20 anni, grazie all'introduzione di moderne tecniche biochimiche e molecolari, gli studi chemiotassonomici e filogenetici hanno consentito un ampliamento del raggruppamento inizialmente proposto, comportando allo stesso tempo grosse modificazioni anche della loro nomenclatura. Per una corretta collocazione tassonomica dei batteri lattici, attualmente uno degli strumenti diagnostici più affidabile è rappresentato dallo studio delle caratteristiche molecolari degli acidi nucleici, come il contenuto in percentuale di guanina e citosina del DNA (G+C mol%), l'ibridazione DNA-DNA, nonché lo studio della struttura e della sequenza del DNA ribosomiale (Stiles *et al.*, 1997). In particolare attraverso l'analisi comparativa della sequenza del gene 16S rDNA è stato possibile dividere i diversi gruppi batterici in 16 "phyla" (Schleifer *et al.*, 1995).

Al gruppo dei batteri lattici attualmente sono ascrivibili moltissimi generi, tra cui le specie e i ceppi maggiormente utilizzati nelle fermentazioni alimentari e/o come microrganismi probiotici, appartengono ai generi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* ed *Enterococcus*.

Metabolismo degli zuccheri.

I batteri lattici producono l'energia necessaria (ATP) per i loro processi biosintetici, mediante la fermentazione degli zuccheri. Gli esosi (glucosio, mannosio, fruttosio) sono fermentati secondo due vie principali, la via glicolitica di Embden-Meyerhof (EM) e la via del 6-fosfogluconato-fosfochetolasi. Gli zuccheri possono essere trasportati all'interno della cellula microbica sia come zuccheri liberi che come derivati fosforilati. Nel primo caso lo zucchero è attivato all'interno della cellula attraverso una fosforilazione mediata da una fosfotrasferasi ATP-dipendente; nel secondo caso lo zucchero è trasportato mediante l'intervento di una fosfotrasferasi dipendente dal fosfoenolpiruvato accumulato endogenamente nel corso della fermentazione e che funge da donatore di fosfato. Tale sistema di trasporto, denominato sistema fosfoenolpiruvato-fosfotrasferasi (PEP-PT), è un complesso sistema enzimatico che trasporta lo zucchero attraverso la

membrana con simultanea fosforilazione. Ad eccezione delle specie del genere *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* e del gruppo III degli eterofermentanti obbligati di *Lactobacillus*, tutti i batteri lattici fermentano il glucosio secondo la via di EM. Il glucosio, attivato da una glucochinasi ATP-dipendente, è trasformato in fruttosio-1,6-difosfato che a sua volta è idrolizzato in due triosi, la 3-fosfogliceraldeide e il diidrossiacetonefosfato dall'enzima fruttosio-1,6-difosfoaldolasi. La successiva sequenza metabolica porta alla formazione di piruvato e di ATP mediante fosforilazione a livello del substrato. La riduzione del piruvato ad acido lattico, mediante l'intervento di una lattico deidrogenasi-NAD dipendente, consente di ristabilire il bilancio redox attraverso la riossidazione del NADH, formato durante l'ossidazione della 3-fosfogliceraldeide, a 1,3- difosfoglicerato. Da una molecola di esoso sono prodotte due molecole di acido lattico (fermentazione omolattica) e due molecole di ATP.

Nella fermentazione secondo la via del fosfogluconato/fosfochetolasi (anche nota come via dell'esosomonofosfato o via dei pentoso fosfato), il glucosio dopo fosforilazione è ossidato a fosfogluconato che a sua volta è decarbossilato a ribulosio 5-fosfato. Quest'ultimo, dopo trasformazione in xilulosio 5-fosfato, è scisso in gliceraldeide 3-fosfato e acetil fosfato, per mezzo dell'enzima fosfochetolasi.

La gliceraldeide 3-fosfato è metabolizzata ad acido lattico secondo la via glicolitica, mentre l'acetil fosfato è ridotto ad acetaldeide e quindi ad etanolo. Da una molecola di esoso sono prodotti una molecola di acido lattico, una di CO₂, una di etanolo (o acido acetico) (fermentazione eterolattica) e una di ATP.

Anche altri zuccheri esosi, come mannosio e fruttosio, sono metabolizzati principalmente attraverso la via di Embden-Meyerhof, entrando nel ciclo glicolitico a livello del glucosio-6P o del fruttosio-6P. Il galattosio, invece, quando è trasportato all'interno della cellula per mezzo di una permeasi specifica come zucchero libero, è fermentato secondo la via di Leloir. Tra i disaccaridi, il metabolismo fermentativo meglio conosciuto è quello del lattosio. Tale disaccaride può essere trasportato all'interno della cellula da un sistema di permeasi come zucchero libero. Nel citoplasma è idrolizzato dall'enzima β -galattosidasi in glucosio e galattosio. Il glucosio è metabolizzato secondo la via EM, mentre il galattosio è fermentato secondo la via di Leloir. Il lattosio può essere inoltre trasportato e fosforilato per mezzo di un sistema specifico PEP-PT. I pentosi come D-ribosio, D-arabinosio e D-xilosio sono fosforilati, dopo trasporto all'interno della cellula da parte di

permeasi specifiche e quindi convertiti, mediante epimerasi o isomerasi, a ribulosio 5P o a xilulosio 5P. Ad eccezione dei lattobacilli del gruppo I, tutti i generi di batteri lattici sono in grado di utilizzare i pentosi per mezzo di una fosfochetolasi costitutiva o inducibile dalla presenza di pentosi. Nella fermentazione dei pentosi non viene prodotta CO₂ e l'acetil fosfato, derivante dalla trasformazione dello xilulosio 5-fosfato per mezzo dell'enzima fosfochetolasi, viene trasformato da una acetatochinasi in acido acetico e ATP. Durante la fermentazione degli zuccheri secondo le vie fermentative prese in considerazione, le diverse specie di batteri lattici, in funzione della stereospecificità della latticodeidrogenasi (LDH)-NAD⁺-dipendente presente nelle cellule, possono produrre esclusivamente L(+)-lattato o D(-)-lattato o entrambe le forme in eguale quantità o con predominanza di una delle due forme. Il racemato si può formare quando nella stessa cellula sono presenti sia la L-LDH che la D-LDH. Quest'ultimo enzima, peraltro, presenta una mobilità elettroforetica variabile, spesso in maniera considerevole, nell'ambito delle diverse specie (Kandler e Weiss, 1986). L'isomero L(+)-lattato è prodotto dai generi *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus* e *Vagococcus*.

I generi *Leuconostoc* e *Oenococcus* producono D(-)-lattato. I generi *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Weissella* possono produrre L(+)-lattato, D(-)-lattato e l'isomero DL in funzione della specie.

Il piruvato, intermedio chiave nella maggior parte delle fermentazioni, può essere utilizzato dai batteri lattici in alternativa all'acido lattico, con produzione di altri composti come acetato, formiato, etanolo, acetaldeide, diacetile, acetoino, 2,3-butanediolo. Una via metabolica alternativa del piruvato, di grande interesse tecnologico, è quella che porta alla formazione di diacetile ed acetoino/2,3-butanediolo (Thompson *et al.*, 1994; Desmazeaud *et al.*, 1994; Axelsson, 1998.).

Sistema proteolitico

La capacità proteolitica dei batteri lattici è stata estensivamente studiata da diversi autori. I batteri lattici hanno un metabolismo energetico abbastanza semplice e, al contempo, necessitano di precursori complessi presenti nel terreno di crescita per soddisfare il loro fabbisogno nutrizionale. Le esigenze nutrizionali dei batteri lattici solitamente comprendono, oltre alle fonti di carbonio, amminoacidi, vitamine, acidi nucleici e sali minerali. Gli ambiente atti a fornire ai microrganismi questo pool di sostanze in forma libera e disponibile non sono molti e, nonostante l'ubiquità dei batteri lattici, solo un gruppo relativamente ristretto di substrati naturali (principalmente latte, vegetali e carni) è adatto per favorirne una crescita massiccia. I batteri lattici sono particolarmente esigenti in aminoacidi. La composizione e la relativa disponibilità degli aminoacidi varia significativamente a seconda della matrice alimentare, ad esempio, negli impasti acidi (sourdough) non fermentati la concentrazione di aminoacidi varia da 400 a 500 mg/Kg di pasta; così durante la fermentazione questa concentrazione aumenta ulteriormente consentendo una rapida crescita dei microrganismi (Mills *et al.*, 1981; Verplaetse 1994; Hierro *et al.*, 1999,). Tale necessità nutrizionale è variabile in relazione alla specie e, in alcuni casi, risulta legata a specifiche caratteristiche del singolo ceppo, per fare un esempio, le proteine del latte, e in particolare le caseine organizzate in micelle, hanno dimensioni troppo elevate per poter permeare nel citoplasma attraverso la parete e la membrana della cellula batterica. Al contempo la frazione azotata non proteica del latte sarebbe infatti idonea a garantire solo un numero di duplicazioni cellulari sufficiente a raggiungere valori di concentrazione cellulare prossimi alle centinaia di migliaia per millilitro, con massimo nell'ordine del milione di millilitri. Questo valore medio è in realtà assai impreciso e comunque variabile in ragione delle esigenze nutrizionali del ceppo e di altre condizioni colturali. I batteri lattici per poter continuare a moltiplicarsi nel latte, pertanto utilizzano sistemi enzimatici idonei all'idrolisi delle caseine ed eventualmente delle sieroproteine.

Preferenzialmente i batteri lattici idrolizzano le caseine mediante endo e esopeptidasi. La proteolisi delle caseine comporta la produzione di peptidi dalle dimensioni compatibili con il trasporto attraverso la membrana cellulare. Nel citoplasma, poi, i peptidi subiranno ulteriori trasformazioni a composti più semplici. Si ritiene che la taglia dei peptidi che possono penetrare all'interno della cellula non superi la decina di aminoacidi, ma anche tale valore è variabile in relazione sia alla specie dei microrganismi sia alla specifica sequenza aminoacidica del peptide.

Gli aminoacidi e gli oligopeptidi possono essere utilizzati dalla cellula a fini biosintetici o in alternativa, se in eccesso rispetto al fabbisogno cellulare, demoliti ad acidi o ammine e/o trasformati tramite altri percorsi metabolici. Il catabolismo degli aminoacidi è considerato uno dei metabolismi di maggiore importanza per la formazione del sapore e dell'aroma.

La cellula batterica dispone di sistemi enzimatici articolati, in grado di agire in modo coordinato nel recuperare frazioni azotate a minor peso molecolare dalle proteine.

Negli ultimi anni sono stati studiati e riconosciuti molti enzimi proteolitici presenti in differenti specie di batteri lattici. Sono stati evidenziati complessi sistemi di endo e esopeptidasi, diffusi per natura, specificità e localizzazione cellulare. In genere si può affermare che la proteolisi utile alla crescita dei vari ceppi sia un fenomeno coordinato a livello cellulare che prevede l'intervento di più enzimi in successione. Per esempio, sulla parete di diverse specie di batteri lattici è stata riscontrata la presenza di alcuni tipi di proteasi. Questi enzimi hanno il compito di consentire un primo attacco idrolitico alle proteine del substrato, che può essere completato da altri enzimi connessi alla membrana citoplasmatica e da differenti peptidasi rinvenute nel comparto parete-membrana dei batteri lattici. Nella parete e nella membrana sono stati inoltre individuati sistemi di trasporto specifici dei peptidi che ne permettono la permeazione nel citoplasma dove, grazie all'intervento di altre peptidasi, viene completata l'idrolisi con il rilascio di singoli aminoacidi.

Nel mondo dei batteri lattici il sistema proteolitico è stato studiato in *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. casei* isolati da diversi substrati (Fadda *et al.*, 2001; Di Cagno *et al.*, 2002). Tra i batteri lattici isolati da impasti acidi il *L. sanfranciscensis* è la sola specie dove il sistema proteolitico è stato purificato e caratterizzato (Gobbetti *et al.*, 1994, 1995, 1996).

Le componenti principali del sistema proteolitico dei batteri lattici sono costituite da:

1. **PROTEINASI:** sono degli enzimi che catalizzano l'idrolisi delle proteine, cioè che spezzano i legami che tengono uniti i loro costituenti di base (gli aminoacidi) con l'intervento di acqua. Sono localizzate a livello della parete cellulare e appartengono al gruppo delle serina-proteasi. Le serina proteasi (o proteasi a serina) sono una classe di proteasi che basano il loro meccanismo di catalizzazione in presenza della serina e di acqua, si ha la rottura del legame con la serina liberando acido carbossilico. Sono inoltre classificate in base a pH e temperature ottimali ovvero alla specificità del substrato.

2. PEPTIDASI: Con il termine proteasi (o proteinasi, peptidasi, enzima proteolitico) si indica un enzima che sia in grado di catalizzare la rottura del legame peptidico tra il gruppo amminico e il gruppo carbossilico delle proteine. La rottura del legame avviene attraverso un meccanismo che utilizza una molecola di acqua, per cui le proteasi vengono classificate tra le idrolasi. Questi enzimi esplicano la loro azione litica sui legami peptidici delle proteine idrolizzandole in aminoacidi. Le peptidasi rappresentano una classe di enzimi che comprende cisteino-peptidasi, metallo-peptidasi e serin-peptidasi; si tratta di enzimi che hanno strutture quaternarie da monomeriche a ottameriche. Il sistema di classificazione più utilizzato per questi enzimi è quello che si basa sulla specificità di taglio nei confronti di substrati peptidici sintetici.

3. CARRIERS sono dei sistemi enzimatici di membrana che operano il trasporto di peptidi e amminoacidi all'interno della cellula. Sono stati studiati e caratterizzati tre specifici sistemi di trasporto:

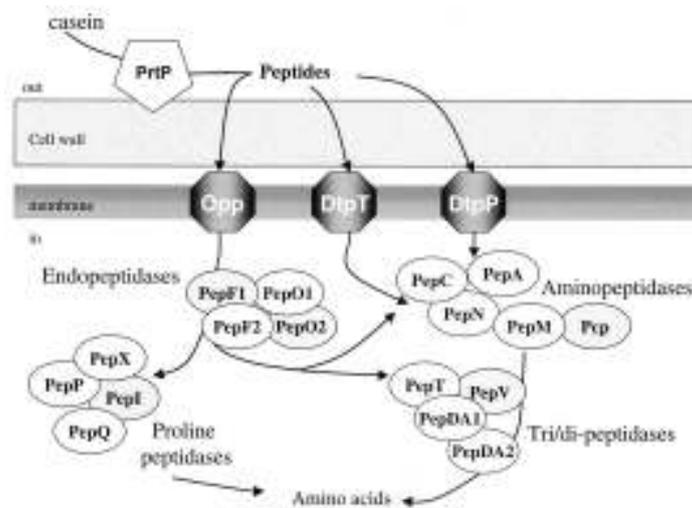
1. le proteine per poter essere trasportate all'interno della cellula ed essere utilizzate sotto forma di aminoacidi dal batterio, devono essere prima scomposte in frazioni più piccole che possano facilmente essere traslocate attraverso la parete cellulare;
2. prima vengono degradate in oligopeptidi, di-peptidi e tri-peptidi dalle proteasi di parete chiamate Prt in seguito vengono trasportati all'interno della cellula da tre specifici sistemi di trasporto: *Dtpt* e *Dtt* che sono proteine singole che mediano il trasporto di di- e tri-peptidi idrofilici e *Opp* un sistema che consiste di cinque proteine che mediano il trasporto di oligopeptidi. I peptidi in seguito all'interno della cellula sono idrolizzati da peptidasi intracellulari in aminoacidi (Schema 1 e 2).

La conversione dei peptidi a singoli amminoacidi e la loro successiva utilizzazione rappresentano la parte centrale delle attività metaboliche dei procarioti. Sino ad oggi, sono state caratterizzate (dal punto di vista biochimico e genetico) circa 20 peptidasi di diverse specie batteri lattici. I sistemi peptidasici caratterizzati in maggior dettaglio sono quelli delle specie *L. helveticus*, *Lactococcus lactis*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. sanfranciscensis*.

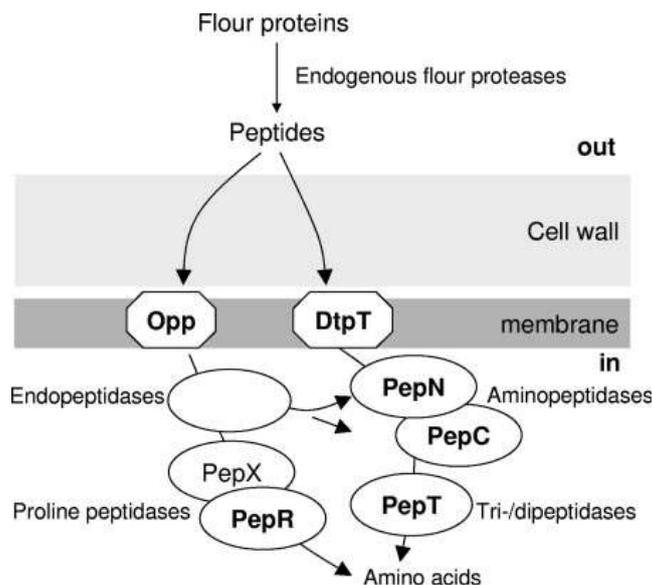
Il macchinario di trasporto dei batteri lattici si può suddividere in una sequenza di tre fasi principali:

1. nella **prima fase**, le proteinasi di parete intervengono attaccando le proteine e generando piccoli peptidi.
2. nella **seconda fase**, i piccoli peptidi generati vengono trasportati all'interno della cellula da opportune proteine di trasporto (DtpT, Dpp e Opp) dove potranno essere ulteriormente idrolizzati ad aminoacidi necessari per la crescita cellulare (Schema 4 e 5).
3. nella **terza fase** dove intervengono una categoria piuttosto complessa di peptidasi costituite da endo-, ammino-e carbossi-peptidasi (Tab. 6).

(Preston *et al.*, 1976; Sasaki *et al.*, 1995; Dako *et al.*, 1995; Foucaud *et al.*, 1995; Gobbetti *et al.*, 1996; Detmeers *et al.*, 1998; Guedon *et al.*, 2001; Christensen *et al.*, 1999; Chen Yo-Shen *et al.*, 2002; Guillot *et al.*, 2003; Vido *et al.*, 2003; Marti *et al.*, 2004; Lu Shan *et al.*, 2004; Vermeulen *et al.*, 2005; Savijoki *et al.*, 2006; Manso *et al.*, 2005).



Schema 4. Sistema proteolitico dei batteri lattici che utilizza le caseine del latte.



Schema 5. Sistema proteolitico dei batteri lattici che utilizza le proteina della farina come fonte di azoto

ENZIMA	NOME	SIGLA	SUBSTRATO	SPECIE
Endopeptidasi		Pep P	Oligopeptidi	L. lactis
		Pep O	Oligopeptidi (frammenti di caseina)	L. lactis L. helveticus
		Pep E	Oligopeptidi	L. helveticus
		Pep F	Oligopeptidi	L. lactis
		Pep G	Tripeptidi, tetrapeptidi	L. delbrueckii
Tripeptidasi		Pep T	X-X-X Pro-X-X	L. lactis L. delbrueckii L. sake
Dipeptidasi		Pep V	X-X (aspecifica)	L. lactis L. delbrueckii L. helveticus L. casei L. sake L. sanfranciscensis
		Pep D	X-X (maggiore specificità)	L. helveticus
Aminopeptidasi		Pep N	Oligopeptidi Lis-X(n) Arg-X(n) Leu-X(n) Ala-X(n)	L. lactis L. delbrueckii L. helveticus L. casei L. rhamnosus S. thermophilus L. sanfranciscensis
				Pep C

			His-X(n) Glu-X(n) Asp-X(n) Ale-X(n) Leu-X(n) Phe-X(n)	L. helveticus S. thermophilus
Peptidasi specifiche	Glutamil-aminopeptidasi	Pep A	Glu-X(n) Asp-X(n) Anche n=10	L. lactis S. thermophilus
	Leucil-aminopeptidasi	Pep L	Leu-X(n) Ala-X(n) n=2 o 3	L. delbrueckii
Peptidasi che coinvolgono la prolina	Aminopeptidasi P	Pep P	X-Pro-Pro-X(n) X-Pro-X(n) n<8	L. lactis
	Prolidasi	Pep Q	X-Pro	L. lactis L. delbrueckii L. helveticus L. casei
	Prolil-iminopeptidasi	Pep I	Pro-X(n)	L. lactis L. delbrueckii L. helveticus
	Prolinasi	Pep R	Pro-X	L. helveticus L. rhamnosus L. curvatus
	X-prolil-dipeptidil-aminopeptidasi	Pep X	X-Pro-X(n)	L. lactis L. delbrueckii L. helveticus L. acidophilus L. casei S. thermophilus

Tab. 6. Peptidasi di batteri lattici

La proteomica

Negli ultimi anni lo sviluppo di metodi avanzati per il sequenziamento del DNA, ha contribuito in modo notevole alla caratterizzazione e all'ottenimento del genoma completo di numerosi organismi (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Genome/main_genomes.html).

I risultati ottenuti in questo campo hanno comunque evidenziato che la conoscenza del genoma è solo il primo *step* per la comprensione dei processi cellulari. Infatti, mentre il genoma contiene le informazioni che permettono ad un organismo di vivere e riprodursi, le funzioni essenziali di una cellula sono svolte dai prodotti dei geni: le proteine. Sono infatti le proteine che operano e che rendono possibile tutti i processi, sia fisiologici che patologici. Di conseguenza, alla genomica oggi si è affiancata la “*proteomica*”, ovvero la scienza che studia su grande scala il proteoma, ovvero, “*l'intero contenuto PROTeico espresso dal genOMA*” di una cellula, di un tessuto o di un organismo, in determinate condizioni ambientali. Lo scopo della *proteomica* è proprio quello di fotografare, a livello proteico, in ogni istante della vita di una cellula, di un tessuto o di un organismo, l'evoluzione di tale complesso sistema. La caratterizzazione e lo studio del complesso sistema proteico presente in una cellula non è solo la naturale conseguenza del sequenziamento dei geni. Infatti ogni proteina non è la mera traduzione dell'informazione genomica e, infatti, a causa di modifiche post-trasduzionali, fenomeni di “*differential splicing*”, un singolo gene può esprimere in realtà una serie di proteine caratterizzate da una estesa micro-eterogeneità (Fig.17).

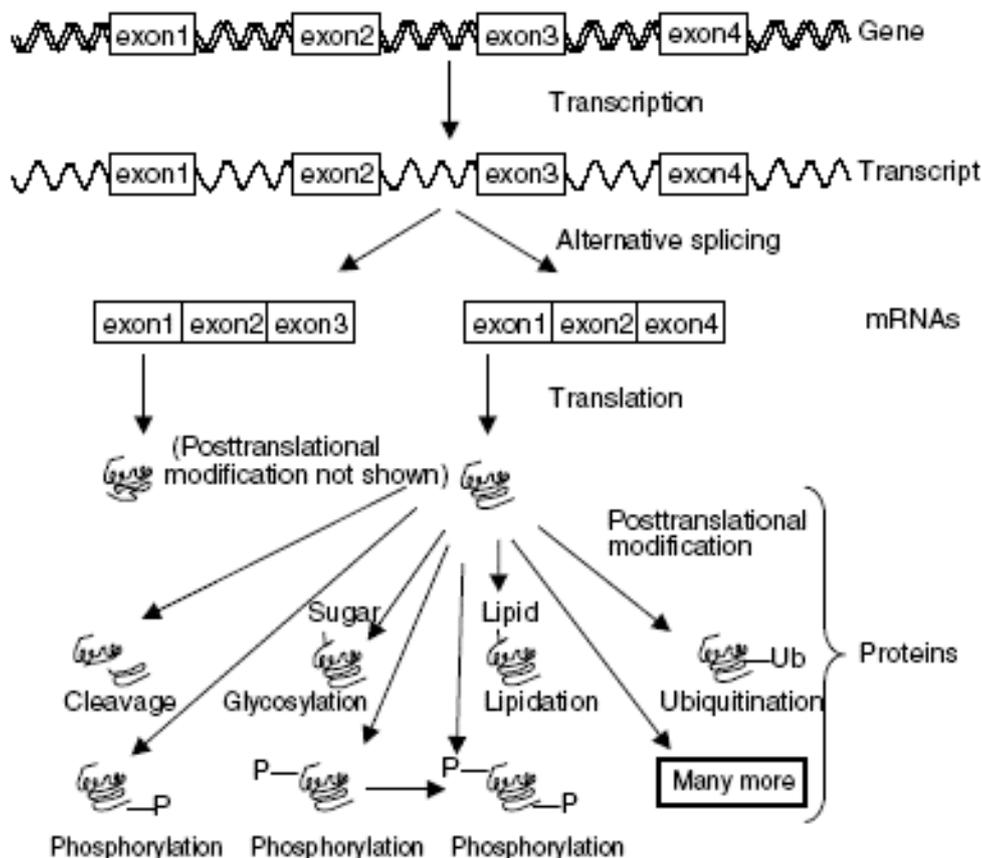


Fig. 17. Complessità dell'analisi proteomica. Un gene può produrre, nella fase di trascrizione, tramite "alternative splicing" più sequenze mRNAs. Dopo la traduzione, numerose modifiche post-trasduzionali possono generare larghe variazioni nel numero e nel tipo di forme proteiche.

Dalle precedenti considerazioni emerge chiaramente la difficoltà cui va incontro uno studio proteomico. L'avvento, negli ultimi anni, di tecniche ionizzazione *soft*, quali l'electrospray (ESI) e il desorbimento/ionizzazione laser assistita da matrice (MALDI), ha contribuito in modo determinante a far sì che la spettrometria di massa divenisse la tecnica *leader* nel campo della proteomica. L'accoppiamento della spettrometria di massa con tecniche ad alto potere risolutivo, quali l'elettroforesi bidimensionale (2D) su gel (SDS-PAGE) e la cromatografia su fase inversa (RP-HPLC), ha consentito di ottenere risultati un tempo impensabili, aprendo di fatto l'era della postgenomica, quella della *proteomica*.

In questo contesto, la “*bioinformatica*” è diventata parte integrante degli studi proteomici. Infatti, in un singolo esperimento si ottengono generalmente una consistente quantità di dati, espressione della complessità di tali studi. Quindi, l’analisi dei dati ottenuti (bioinformatica) rappresenta uno *step* essenziale per lo studio delle proteine.

L’insieme delle informazioni ottenute dagli studi proteomici, correlate con quelle ottenute a livello genomico, dovrebbe consentire di stabilire l’effettivo ruolo sia delle proteine sia dei geni, nonché le relazioni genotipo-fenotipo. In tal senso, l’identificazione dei geni espressi fenotipicamente in un organismo in rapporto a un particolare contesto temporale e spaziale dello sviluppo, definito dalla configurazione delle proteine presenti nella cellula, nonché la comparazione tra il proteoma di diverse cellule o della stessa cellula in tempi diversi, rappresentano oggi le nuove sfide conoscitive dell’indagine molecolare sulla vita.

Spettrometria di massa (MS)

La spettrometria di massa è una potente tecnica di caratterizzazione strutturale delle proteine e viene utilizzata per l'analisi di proteine e peptidi dal 1989. Lo sviluppo di un elevato numero di strategie analitiche, basate sull'impiego di differenti tecniche spettrometriche, ha reso la spettrometria di massa una tecnologia indispensabile per l'interpretazione delle informazioni codificate nel genoma (Salzano *et al.*, 2005). Attualmente la MS è la tecnica preferita per la caratterizzazione e il controllo di qualità delle proteine ricombinanti e di altre macromolecole, un'attività importante nel settore delle biotecnologie. E' anche comunemente utilizzata per l'identificazione di proteine, sia in progetti di biochimica classica sia in quelli di proteomica su larga scala. Infine, poiché la MS misura il peso molecolare di una proteina, è il metodo preferito per l'individuazione e la caratterizzazione di modificazioni post-traduzionali e potenzialmente è in grado di identificare qualsiasi modificazione covalente che altera la massa di una proteina. Il principio su cui si basa la spettrometria di massa è la possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica tramite campi magnetici statici o oscillanti (En-Ong *et al.*, 2005).

Tale miscela è ottenuta ionizzando le molecole del campione, principalmente facendo loro attraversare un fascio di elettroni ad energia nota.

Le molecole così ionizzate sono instabili e si frammentano in ioni, più leggeri, secondo schemi tipici in funzione della loro struttura chimica. Il diagramma che riporta l'abbondanza di ogni ione in funzione del rapporto massa/carica è il cosiddetto spettro di massa, tipico di ogni composto in quanto direttamente correlato alla sua struttura chimica ed alle condizioni di ionizzazione cui è stato sottoposto. Uno spettrometro di massa è costituito da una sorgente di ionizzazione, un analizzatore e un rivelatore di corrente ionica prodotta (Fig.18)

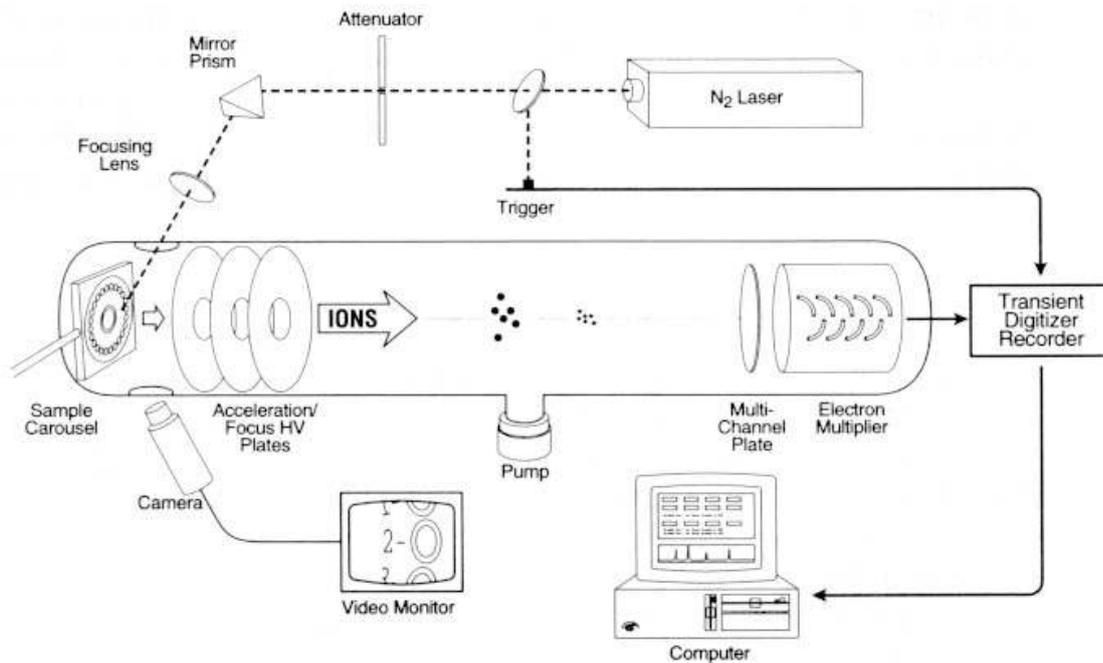


Fig. 18. Spettrometro di massa

Il campione viene introdotto nella sorgente di ionizzazione dello strumento e le molecole di campione vengono ionizzate, dal momento che gli ioni sono più facili da “manipolare” rispetto alle molecole neutre. Questi ioni nella regione dell’analizzatore di massa, vengono separati in base al rapporto massa/carica (m/z); gli ioni separati vengono rilevati e il segnale inviato ad un data-system dove i rapporti m/z sono confrontati con la loro abbondanza ionica relativa e il tutto analizzato tramite un computer che fornisce uno spettro di massa.

Tra le tecniche per la ionizzazione si possono elencare:

1. ionizzazione per elettro-nebulizzazione (Electrospray-ESI): gli ioni si presentano sottoforma di una soluzione liquida a pressione atmosferica
2. ionizzazione laser assistita da matrice (matrix-assisted laser desorption ionization-MALDI): pulsazione laser che porta alla sublimazione del campione su una matrice cristallina secca.

Ci sono quattro tipi fondamentali di analizzatori di massa usati per lo studio delle proteine: a trappola ionica (IT), a tempo di volo (TOF), a quadrupolo (Q) e a risonanza ionica elettronica in trasformata di Fourier (FT-ICR). Questi presentano differenze nel modello e nella prestazione e ognuno ha i propri punti di forza e di debolezza. Due analizzatori possono essere combinati insieme per svolgere una spettrometria di massa in due stadi (spettrometria di massa tandem detta MS/MS). Nella MS/MS, con diversi meccanismi nei differenti spettrometri di massa, gli ioni peptidici vengono isolati e frammentati e viene misurato il rapporto m/z dei frammenti. I più comuni

analizzatori di massa tandem, in grado di svolgere la frammentazione peptidica, sono a trappola ionica con quadrupolo (IT), a triplo quadrupolo (QqQ), a quadrupolo-tempo di volo (Q-ToF), a doppio tempo di volo (TOF-TOF). Le apparecchiature MALDI-TOF hanno il vantaggio di una maggiore sensibilità e di un più alto potere di risoluzione, anche se non danno informazioni sulla sequenza. Strumenti più recenti hanno una sorgente MALDI accoppiata con un analizzatore Q_TOF (Krutchinsky *et al.*, 2001) o TOF-TOF (Medzihradszky *et al.*, 2000) e sono perciò in grado, utilizzando la sensibilità della sorgente MALDI, di effettuare il sequenziamento del peptide.

Identificazione delle proteine attraverso la spettrometria di massa

Gli esperimenti di MS per l'identificazione delle proteine sono basati soprattutto sull'analisi dei peptidi.

Le Proteine interessanti vengono purificate da cellule o da tessuti utilizzando diverse metodologie, quali il frazionamento fisico e/o biochimico, il più recente dei quali è basato su tecniche cromatografiche, che includono affinità di purificazione.

Il campione proteico viene parzialmente purificato e ulteriormente frazionato attraverso gel di elettroforesi mono-dimensionale (SDS-PAGE) o bi-dimensionale (2D-PAGE), un potente metodo basato sulla separazione ortogonale per punto isoelettrico e peso molecolare (O'Farrel 1975, Rabilloud 2002). Le bande del gel (1D-gel) o gli spots (2D-gel) vengono tagliati e le proteine digerite usando differenti proteasi e/o reagenti chimici. La Tripsina è una proteasi efficiente e molto stabile che taglia in maniera specifica all'estremità C-terminale dei residui di Lisina e Arginina. I peptidi ottenuti dal taglio con Tripsina hanno un residuo basico all'estremità C-terminale e la giusta taglia in grado di essere rilevata e sequenziata con uno spettrometro di massa. In alcuni casi il

campione (un lisato cellulare non frazionato o un mix di proteine parzialmente purificate) viene ridotto, alchilato e digerito in soluzione; in seguito la mix di peptidi ottenuta viene frazionata attraverso una colonna a scambio cationico (SCX), che separa i peptidi sulla base della loro carica, e le frazioni derivate sono ulteriormente separate su colonna a fase inversa (RP). Questa tecnica cromatografica viene utilizzata per la separazione di mix di proteine molto complesse. Questo approccio sembra essere la soluzione migliore per l'analisi di campioni che non possono essere separati su gel a causa delle loro proprietà chimico-fisiche. Nella maggior parte dei casi le mix di proteine vengono prima separate con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), i peptidi sono

eluiti da colonne RP utilizzando concentrazioni crescenti di solventi organici, i quali permettono la separazione dei peptidi sulla base della loro idrofobicità. La colonna cromatografica è collegata in linea con uno spettrometro di massa dotato di una sorgente ESI che ionizza i campioni a partire da una fase liquida utilizzando le così dette tecniche LC-ESI-MS. Una volta che la mix dei peptidi è stata analizzata attraverso MS di peptidi, le proteine vengono identificate attraverso il confronto con una lista di masse sperimentali con le masse peptidiche calcolate teoricamente e ottenute da una digestione *in silico* di tutte le proteine presenti in database, considerando la specificità della proteasi utilizzata. Questo approccio è detto “fingerprinting della massa peptidica” (PMF).

SCOPO DEL LAVORO

La celiachia è definibile come uno stato infiammatorio della mucosa del piccolo intestino (più marcato a livello prossimale) che si sviluppa in soggetti geneticamente predisposti in seguito all'ingestione di una proteina del frumento, la gliadina, e di proteine ad essa correlate (dette prolamine) presenti anche in altri cereali quali orzo e segale, tanto che generalmente ci si riferisce a questa patologia come ad un'enteropatia glutine dipendente.

La malattia è il risultato di complesse interazioni tra fattori intrinseci (genetici) e fattori estrinseci (ambientali) responsabili del danno flogistico alla mucosa intestinale che porta ad ipertrofia delle cripte, fino a raggiungere un grado estremo che si presenta con l'atrofia totale dei villi

La grande sfida nel campo della ricerca scientifica sulla malattia celiaca è tutta incentrata sulla identificazione di una terapia alternativa ad una dieta priva di glutine.

Recentemente è stata posta molta attenzione al ruolo cardine di un particolare gruppo di batteri, i lattobacilli, ed un loro utilizzo come starter in impasti fatti in modo tradizionale, acqua e farina, per la produzione dei prodotti da forno, in particolare per la produzione del pane (Di Cagno *et al.*, 2002, 2004, 2005).

Con il presente lavoro si è voluto valutare l'attività proteolitica di batteri lattici autoctoni della Sardegna, isolati da paste acide preparate in modo tradizionale.

L'obiettivo principale è stato quello di verificare se i batteri lattici possedevano degli enzimi capaci di agire sulla gliadina, degradandola.

MATERIALI E METODI

Autore: D.ssa Mariangela Stefania Fiori

Titolo: Ruolo delle Peptidasi dei LAB nell'Idrolisi delle Gliadine Antigeniche e di Peptidi derivati dal 33-mer.

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

Verifica della proteolisi negli impasti

Ceppi condizioni colturali

I microrganismi usati in questo studio per la preparazione delle madri acide (sourdough) sono evidenziati nella Tab. 7.

Questi ceppi sono stati utilizzati al fine di verificare l'attività proteolitica dei batteri lattici nei confronti della gliadina, proteina implicata nella celiachia.

Numero Collezione PCC	Sigla Originale	Provenienza	Specie Microbica
1545		Bonorva	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
1539	G13	Bonorva	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
859	B10g	Bono	<i>Lactobacillus alimentarius</i>
861	B11B	Bono	<i>Lactobacillus pentosus</i>
863	E1ss	Bono	<i>Lactobacillus brevis</i>
881	C1p	Nule	<i>Lactobacillus plantarum</i>
882	B4	Bono	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>
893	C3pB	Nule	<i>Lactobacillus plantarum</i>
1879		Villanova strisaili	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> str. <i>Kline</i>
1080	SB1	Ozieri-	<i>Lactobacillus plantarum</i>
1082	SB2	Ozieri	<i>Lactobacillus plantarum</i>
1088	SB5	Ozieri	<i>Lactobacillus plantarum</i>
1090	SB5c	Ozieri	<i>Lactobacillus plantarum</i>
1092	SB6b	Ozieri	<i>Lactobacillus plantarum</i>
1094	SB7b	Ozieri	<i>Lactobacillus plantarum</i>
1108	SB14b	Ozieri	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Tabella 7. Lista di lattobacilli isolati da paste acide della Sardegna

Tutti i ceppi sono stati isolati da paste acide provenienti da diverse zone della Sardegna, dove è ancora presente la tradizione della panificazione casalinga con pasta acida prodotta artigianalmente senza aggiunta di lievito compresso. I ceppi isolati sono stati caratterizzati mediante amplificazione del gene 16 S rRNA, sequenza dell'amplicone e confronto con le sequenze riportate in Database (Meroth *et al.*, 2002; Ricciardi *et al.*, 2005; De Vuyst *et al.*, 2005, 2007) e sono depositati presso la collezione di microrganismi del DISAABA (Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari, Università degli studi di Sassari) e alla Porto Conte Ricerche (Polo Biotecnologico Agro-alimentare di Sardegna Ricerche).

I ceppi da testare sono stati fatti crescere su piastre di MRS (Oxoid) e le piastre sono state incubate a 30°C per 18 ore (Anaerogen system; Oxoid).

Terreno utilizzato

MRS (Oxoid, Milano, Italia)

Costituzione della madre acida

Per la preparazione di ciascuna madre sono stati utilizzati i microrganismi autoctoni isolati e selezionati dalle madri naturali. Il processo biotecnologico prevede l'inoculo iniziale dei ceppi selezionati in un impasto la cui formulazione (% di acqua, semolato rimacinato e microflora) riproduce la composizione dell'ecosistema naturale. Nella prima fase, condotta in laboratorio, tra i ceppi selezionati di batteri lattici sono stati scelti i seguenti batteri per la verifica dell'attività proteolitica in impasto: *L. plantarum* pcc 1090, *L. plantarum* pcc 1092, *L. pentosus* pcc 861, *L. sanfranciscensis* pcc 1879, *L. alimentarius* pcc 859, *L. brevis* pcc 863, *L. sakei* subsp. *sakei* pcc 882, *Pediococcus pentosaceus* pcc 1545, *L. plantarum* pcc 1080; come ceppo di riferimento è stato utilizzato il *L. plantarum* WCFS1, ceppo isolato da saliva gentilmente fornito dall'Università di Bari (Kleerebezem *et al.*, 2002) I ceppi sono stati inoculati in MRS, e fatti crescere per 24 h a 30°C. Le brodo-culture sono state centrifugate a 7000 x g per 15 minuti e il pellet di cellule è stato utilizzato per effettuare l'inoculo in un impasto costituito da semola e acqua (madre inoculata). È stato preparato un impasto costituito da 100 g di semolato rimacinato di grano duro, 100 ml di acqua in cui sono stati inoculati i microrganismi (10^9 cell/g), sopra descritti, in forma di pellet di cellule. Sono stati inoltre preparati due impasti di controllo, il primo è stato inoculato con lievito di

birra commerciale di *Saccharomyces cerevisiae*; il secondo senza inoculo batterico. Tutti gli impasti sono stati incubati a 30°C, per 24, 48 e 72 ore, quindi sono state estratte le proteine, (Paramithiotis *et al.*, 2004; Di Cagno *et al.*, 2005; Gerez *et al.*, 2005; Ikram-Ul-Haq e Hamid Mukhtar, 2006; Zotta *et al.*, 2006; Gobetti *et al.*, 2007; Carnevali *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007; Rizzello *et al.*, 2007; Arendt *et al.*, 2007; De Angelis *et al.*, 2007).

Determinazione della variazione del pH

Per determinare la variazione del pH nell'impasto durante il processo di fermentazione si è proceduto in questo modo:

- ad un grammo d'impasto sono stati aggiunti 9 ml di acqua bidistillata e agitato con il vortex per 5 minuti.

Estrazione proteine da impasti

Le gliadine sono state estratte direttamente dall'impasto utilizzando due metodi: il metodo descritto da Osborne e modificato da Weiss *et al.* (1993) e il metodo che utilizza la dimetilformammide (DMF).

Per il primo si è proceduto in questo modo:

- un grammo di impasto è stato diluito con 4 ml di Tris-HCl (pH 8.8) 50mM e tenuto a 4°C per 1 ora agitando con il vortex a intervalli di 15 minuti; successivamente è stato centrifugato a 20.000 x g per 20 minuti. Il surnatante, contenente albumine e globuline, è stato scartato. Per minimizzare la contaminazione delle gliadine con albumine e globuline il pellet è stato ulteriormente trattato due volte con Tris-HCl (pH 8.8) 50mM. Dopo un lavaggio con acqua distillata per rimuovere il tampone, il pellet è stato diluito in 4 ml di etanolo al 75% e lasciato a 25°C per 2 ore agitando con il vortex ad intervalli di 15 minuti. Al termine è stato centrifugato a 20.000 x g per 20 minuti. Il surnatante conteneva le gliadine.

Per il secondo metodo si è proceduto nel seguente modo:

- un grammo di impasto è stato diluito con 5 ml di DMF 1,5M e tenuto a temperatura ambiente da 3 ore a overnight agitando con il vortex a intervalli di 15 minuti, successivamente è stato centrifugato a 10.000 x g per 15 minuti.

Tutti gli estratti sono stati conservati a -80°C prima di essere utilizzati. La concentrazione delle proteine presenti nel surnatante, è stata determinata con il metodo di Bradford (Bradford, 1976, DC Protein Assay Bio-Rad), usando siero albumina bovina come standard

Elettroforesi SDS-PAGE e A-PAGE

Le proteine estratte dagli impasti fermentati sono state separate su Tricina-SDS-PAGE al 10% e A-PAGE al 7% (Rumbo *et al.*, 1997; Gianibelli *et al.*, 2001; Ram *et al.*, 2005; Rizzello *et al.*, 2007)

1. *Tricina SDS-Page*: i campioni sono stati diluiti con Tricine Sample Buffer in presenza di B-mercaptoetanolo al 5%, la miscela è stata tenuta a 95°C per 5 minuti. Sono state utilizzate le seguenti condizioni di corsa:

- voltaggio costante 50 V per 30 minuti e 130 V sino a fine corsa.

Preparazione della porzione *running* del gel per 10 ml:

Gel al 10% di Acrilammide	
H ₂ O	1,99 ml
Acril. 30%	3,62 ml
Tris-HCl/SDS 1,5 M (pH 8.45)	3,33 ml
Glicerolo	1,06 ml
Aps 10%	0,10 ml
TEMED	0,005 ml

Preparazione della porzione *stacking* del gel per 5 ml

Gel al 4% di Acrilammide	
H ₂ O	2,93 ml
Acril. 30%	0,83 ml
Tris-HCl/SDS 1,5 M (pH 8.45)	1,24 ml
Aps 10%	0,05 ml
TEMED	0,005 ml

Preparazione del *loading buffer*

TRICINE SAMPLE BUFFER 2X
Tris-HCl 0,1M pH 6.8
SDS 0,8 g
Glicerolo 2,4 ml
Coomassie blue G-250 2 mg
DTT 0,31 g
H ₂ O 10 ml

Preparazione del *Running Buffer*

CATHODE BUFFER 10X
Tris base 0,1M
Tricina 0,1M
SDS 0,1%
H ₂ O a volume conservare a 4°C

ANODE BUFFER 10X
Tris base 0,2M pH 8.9
H ₂ O a volume conservare a 4°C

2. *A-Page* : i campioni sono stati diluiti con una soluzione di 100 g saccarosio + 50 mg di violetto metile. Sono state utilizzate le seguenti condizioni di corsa:
- è stata fatta una precorsa con elettrodi invertiti a 90 mA senza i campioni utilizzando un tampone Potassio Lattato diluito 1:50 ad una temperatura costante di 10°C;
 - una corsa (con i campioni), sempre con elettrodi invertiti, a 50 mA sino a che il colorante e quindi i campioni raggiungono il gel *stacking* e lo superano di 1 cm, poi 90 mA per tutta la durata della corsa;
 - i tamponi utilizzati per la corsa sono: il tampone Potassio Lattato (nella camera esterna) e il tampone Alluminio Lattato (nella camera interna) entrambi diluiti 1:50. Per tutta la durata della corsa la temperatura è stata di 8-10°C costante.

Preparazione della porzione *running* del gel per 10 ml (polimerizzare al buio):

Gel al 7% di Acrilammide	
H ₂ O mQ a volume	2,2 ml
Acril. 30%	2,5 ml
Idrato di potassio (3,5 gr in 100 ml di H ₂ O mQ portare a pH3,1 con Acido Lattico)	0,2 ml
Persolfato d'ammonio (68 mg di APS in 50 ml di H ₂ O mQ)	5 ml
Nitrato d'Argento (34 mg in 2 ml di H ₂ O mQ)	0,1 ml

Preparazione della porzione *stacking* del gel per 5 ml:

Soluzione Stock costituita da 17% Acril. al 30%, 2% di Idrato di Potassio, 20 mg di Acido Ascorbico (conservata a -20°C)	5 ml
Solfato Ferroso (20-25 mg in 1 ml di H ₂ O mQ)	5 µl
Acqua Ossigenata 1%	12,3 µl

Preparazione del *Runnig buffer*.

TAMPONE CORSA A-PAGE
Alluminio lattato pH 3,15 (4,4 g in 100 ml di H ₂ O mQ e portare a pH con Acido Lattico)
Potassio Lattato pH 3,1 (3,5 g in 100 ml di H ₂ O mQ e portare a pH con Acido Lattico)
Sterilizzare con filtro 0,45 µm e conservare in bottiglia scura in frigo

Per ogni campione è stata effettuata una corsa preparativa, colorazione mediante Coomassie ed una ulteriore corsa destinata al Western Blotting.

Preparazione del campione per l'analisi in Spettrometria di Massa

Dopo colorazione con Coomassie le bande di interesse sono state tagliate dal gel e, dopo decolorazione, incubate in tripsina. Le bande in esame:

1. sono state decolorate con 100 μ l di ammonio bicarbonato 2,5 mM in 50% di Acetonitrile (ACN).
2. sono state lavate con 100 μ l di ACN per 10 minuti
3. sono state asciugate all'aria per 10 minuti
4. sono stati aggiunti 5-20 μ l (quantità sufficiente per coprire il gel) di buffer di digestione (Tripsina 10 nmoli/ μ l in bicarbonato di ammonio 5 mM) e incubate a 4°C per 30 minuti
5. è stato eliminato il buffer in eccesso e sostituito con 5-20 μ l (quantità sufficiente per coprire il gel) di una soluzione di bicarbonato di ammonio 5 mM.
6. le bande sono state incubate da 6 ore a overnight a 37°C.

Analisi in MS/MS

I prodotti della digestione con tripsina sono stati analizzati tramite nanoHPLC accoppiato con uno spettrometro di massa equipaggiato con: sorgente di ioni nano elettrospray e, doppio analizzatore di massa formato da un quadrupolo e da un tubo a tempo di volo (nanoHPLC-nanoESI-Q-TOF). Il CapLc (Waters), interfacciato con il Q-TOF Ultima (Waters), è dotato di autocampionatore a valvola a 10 porte (Valco-Vici), con un volume morto zero, che viene impiegato nel rapido caricamento dell'analita su precolonna (Opti-Guard 1mm, Symmetry 300 C18, Optimize Technologies Inc., OR) consentendo il lavaggio dei sali ad un flusso di 20 μ l/minuto di solvente A. Dopo lavaggio in contro corrente della precolonna la valvola a 10 porte commuta in posizione analitica: il campione viene condotto in colonna (XTerra C18, 150 mm x 100 μ m, 3 μ m, by Waters) e i vari peptidi si separano per effetto di un gradiente lineare di CH₃CN condotto dal 10% al 95% in 55 minuti (solvente A: H₂O con 0,2% di HCCOH e 1% di CH₃CN, solvente B: CH₃CN con 0,2% di HCCOH).

Gli spettri di massa/massa sono stati registrati in modalità *data-dependent*: istante per istante i due peptidi più intensi (recanti carica +2,+3,+4) vengono isolati nel quadrupolo, frammentati nell'esapolo e, rivelati nel TOF. La calibrazione esterna è stata effettuata in soluzione di Glu1-Fibrinopeptide B (Sigma-Aldrich) 500 fM in H₂O/ CH₃CN 50/50 e 0,2% HCOOH.

I dati così ottenuti sono stati processati in automatico mediante appositi algoritmi al fine di convertirli nel formato richiesto dalla ricerca automatica in database effettuata su *Mascot MS/MS Ions Search* all'indirizzo http://www.matrixscience.com/serach_form_select.html; parametri utilizzati per la ricerca: 0,2 Da, fragment tolerance 0.1 Da, database SWISSPROT. Inoltre, per le bande in cui la ricerca con *Mascot* non ha fornito identificazioni statisticamente significative, gli spettri di massa sono stati processati manualmente, le sequenze ottenute sono state sottoposte a ricerca in database con *protein-protein BLAST* all'indirizzo <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

Analisi Immunologica delle gliadine dopo l'azione proteolitica dei batteri lattici utilizzando sieri di Pazienti Celiaci e Pazienti Sani

Le gliadine separate in Tricina SDS-Page, sono state trasferite su nitrato di cellulosa (Membrane optimizer for protein transfer HYBOND™-C EXTRA, Amersham Biosciences). Sia la membrana di nitrocellulosa che la carta da filtro, prima del loro utilizzo sono state equilibrate nel tampone di trasferimento (*Transfer Buffer 1X*).

Il trasferimento è stato fatto in ghiaccio a 120V costanti per 75'. L'avvenuto trasferimento è stato controllato mediante colorazione del nitrato con rosso *Ponceau* (*Ponceau S Solution*, Sigma).

TRANSFER BUFFER 5X Ph 8.3
Glicina 72 g
Tris 15 g
Metanolo 20%
H ₂ O deionizzata 1 litro

Western-Blot dopo A-PAGE

Le gliadine separate in A-Page, sono state trasferite su nitrato di cellulosa (Membrane optimizer for protein transfer HYBOND™-C EXTRA, Amersham Biosciences). Sia la membrana di nitrocellulosa che la carta da filtro, prima del loro utilizzo sono state equilibrate nel tampone di trasferimento (*Transfer Buffer per A-Page*).

Dopo la corsa il gel è stato equilibrato 20' a RT nel Transfer Buffer per A-PAGE 1X. Anche la membrana di nitrocellulosa e la carta da filtro, prima del loro utilizzo, sono state equilibrate nel tampone Transfer Buffer per A-PAGE 1X. Il trasferimento è stato fatto in ghiaccio a 40V costanti per 50', (Rumbo *et al.*, 1997).

TRANSFER BUFFER PER A-PAGE 1X pH 2.7
H ₃ PO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 0,01M in un Litro di H ₂ O deionizzata

Rilevamento proteico dopo Blotting

Dopo il trasferimento la membrana è stata bloccata con PBS 1X, Siero albumina bovina (BSA) 5%, Tween 20 0,1% per 30 minuti a RT in agitazione. La membrana, dopo essere stata lavata con PBS 1X, Tween 20 (0,1%) è stata incubata over night con siero di pazienti celiaci e con siero di controllo, (Siero 1:100 in Pbs 1X, tween 80 (0,1%). La membrana è stata successivamente incubata con un anticorpo secondario Anti-Human IgA(α -chain specific)-Alkaline Phosphatase (Sigma-Aldrich), (Anti-Human IgA. 1:10000 in Pbs 1X, tween 20 (0,1%) Fra un anticorpo e l'altro sono stati effettuati 5 lavaggi con PBS 1X - Tween 20 (0.1%).

Per lo sviluppo è stato utilizzato il substrato BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitroblue tetrazolium) (Sigma-Aldrich).

Verifica dell'attività peptidasica utilizzando peptidi antigenici nella Celiachia

Tutti i ceppi analizzati, elencati in Tabella 6, hanno mostrato attività proteolitica nei confronti della gliadina quando inoculati direttamente in impasto.

Abbiamo quindi scelto 4 ceppi, (Tabella 8), isolati da pasta acida e il ceppo WCFS1 isolato da saliva, che sono stati testati per la loro capacità proteolitica nei confronti dei peptidi tossici della gliadina

pcc 1090	<i>L. plantarum</i>
pcc 1092	<i>L. plantarum</i>
pcc 861	<i>L. pentosus</i>
pcc 1879	<i>L. sanfranciscensis</i>
WCFS1	<i>L. plantarum</i> (ceppo di referenza)

Tabella 8. Ceppi di LAB utilizzati per l'attività Peptidasi

I batteri lattici sono stati fatti crescere in un terreno contenente Glutine (Gluten Media): glutine **10 g/l**; yeast extract **4 g/l**; glucosio **10 g/l**; tween 80 **1 ml**; di-potassium hydrogen phosphate **2 g/l**; sodium acetate 3H₂O **5 g/l**; tri-ammonium citrate **2 g/l**; magnesium sulphate 7 H₂O **0.2 g/l**; manganese sulphate 4H₂O **0.05 g/l**, 20 g/l. per terreni solidificabili.

I batteri sono stati fatti crescere in 10 ml di Gluten Media per 24 ore a 37°C. Quindi la coltura è stata centrifugata a 7000 x g per 15 minuti a 4°C., il pellet è stato lavato per 2 volte con 0.01 M NaH₂PO₄ 0,01M pH 4,5 e centrifugato a 7000 x g per 15 minuti e risospeso in 20% (w/v) NaH₂PO₄ 0,01M pH 4,5.

Le cellule sono state sottoposte a tre passaggi a 18.000 psi con l' omogenizzatore Emulsi felx C5. L'omogenato è stato centrifugato a 15.000 x g per 45 minuti a 4°C (Di Cagno *et al.*, 2001; De Angelis *et al.*, 2002; Di Cagno *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2004; Rollan *et al.*, 2005)

La reazione di idrolisi è stata preparata mettendo a contatto l'estratto cellulare dei *Lattobacilli*, con Peptide 1, Peptide 2, Peptide 3 (la sequenza di ciascuno dei peptidi è stata disegnata sulla base della sequenza aminoacidica del peptide immunogenico 33-mer frammento 56-88 dell' α 2-gliadin), (Christensen *et al.*, 2003, 2005)

PREPARAZIONE DELLA MIX DI REAZIONE:

MIX DI REAZIONE	CONCENTRAZIONI	SEQUENZA PEPTIDI
Estratto cellulare	1,05 μ g/ μ l	
Peptide 1	1 μ g/ μ l	LQLQPFPPQLPYPQP
Peptide 2	1 μ g/ μ l	PQLPYPQPQLPYPQPQ
Peptide 3	1 μ g/ μ l	QLPYPQPQLPYPQPQPF

La Mix di reazione è stata incubata a 37°C e i prodotti della digestione sono stati analizzati in spettrometria di massa

Analisi in Spettrometria di massa dell'attività Peptidasica

In questa analisi i campioni si legano ad una matrice organica acida (600 µl TFA 0,1%, 400 µl ACN, Acido sinapinico 10 mg) che viene colpita da un raggio laser; l'energia si trasferisce dalla matrice al campione, che risulta ionizzato e passa in fase gassosa. Le molecole così ottenute sono poi analizzate con il TOF (*Time of Flight*). Esse vengono incamerate in un compartimento in cui c'è il vuoto e a seconda della loro energia cinetica hanno una determinata velocità, che risulta inversamente proporzionale alla radice quadrata della massa. Il passaggio di frammentazione e l'analisi TOF vengono effettuati due volte e il risultato appare sotto forma di spettri di massa. In questa prova 1,5 µl del prodotto della digestione è stato miscelato con 1,5 µl di matrice. Il campione è stato caricato nel target e sottoposto all'analisi su uno ionizzatore di tipo MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*).

Saggi enzimatici

Nei saggi enzimatici è stata valutata l'attività aminopeptidasica, iminopeptidasica, di- e tri-peptidasica e dipeptidil-peptidasica. Le fasi preliminari per la preparazione dell'analisi enzimatica sono state:

- i substrati, per valutare l'attività aminopeptidasica, iminopeptidasica e dipeptidil-peptidasica sono stati risospesi in metanolo 100% alla concentrazione di 20mM, mentre i substrati per valutare l'attività di- e tri-peptidasica sono stati risospesi in dimetilsolfossido (DMSO) alla stessa concentrazione di 20mM.
- i batteri sono stati fatti crescere in Gluten Media per 24 ore a 37°C, sono stati centrifugati a 10.000 x g per 20 minuti, lavati con un tampone fosfato 50 mM pH 7, centrifugati e risospesi in un tampone Tris-HCl 5mM pH 7,5. La concentrazione delle cellule è stata 10⁹ UFC/ml. Per questa analisi si può utilizzare l'estratto cellulare ottenuto come descritto precedentemente.

Per l'attività aminopeptidasica e iminopeptidasica sono stati usati i seguenti substrati Pro-pNa e Leu-pNa e si è proceduto con la preparazione di 3 mix di reazione.

Nella prima mix sono stati aggiunti:

- 20 µl di substrato enzimatico
- 80 µl di tampone fosfato 50 mM pH 7
- 100 µl di cellule (o estratto cellulare):

Nella seconda mix è stato preparato il bianco B1 costituito da:

1. 100 µl di cellule (o estratto cellulare):
2. 100 µl tampone fosfato 50 mM pH 7

Nella terza mix è stato preparato il bianco B2 costituito da:

- o 180 µl di tampone fosfato 50 mM pH 7
- o 20 µl di substrato

Le mix sono state incubate in agitazione a 150 rpm a 37°C per 30 minuti.

Successivamente, sulla base della torbidità o, dell'intensità del colore giallo della reazione, sono stati aggiunti 500 µl di acido acetico al 10%, e, dopo aver centrifugato a 10.000 rpm per 10 minuti, è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro a 410 nm azzerando contro il controllo B2.

Per l'attività di- e tri-peptidasica sono stati utilizzati i seguenti substrati: Leu-Leu-Leu, Val-Pro, Val-Leu, Leu-Leu, Pro-Gly. Le mix di reazione sono state preparate utilizzando la stessa metodica dei saggi enzimatici per l'attività aminopeptidasica e iminopeptidasica.

Le mix sono state incubate in agitazione a 150 rpm a 37°C per 2 ore.

Successivamente, sulla base della torbidità o, dell'intensità del colore giallo della reazione, sono stati aggiunti 750 µl di Cd-ninidrina preparata miscelando due soluzioni, A e B:

- o 0,8 g ninidrina, 80 ml di etanolo, 10 ml di acido acetico
- o 1 g di Cadmio, 1 ml di H₂O

La soluzione è stata incubata a 80°C per 5 minuti, centrifugata a 12.000 rpm per 5 minuti ed è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro a 570 nm azzerando contro il controllo B2.

Per l'attività dipeptidil-peptidasica sono stati usati i substrati Z-Gly-Gly-Leu-pNa, Gly-Pro-pNa e sono state preparate due mix di reazione.

Nella prima mix sono stati aggiunti:

1. 50 µl di substrato
2. 600 µl di tampone fosfato 50 mM pH 7
3. 50 µl di cellule (o estratto cellulare):

Nella seconda mix è stato preparato il bianco B1:

1. 50 µl di substrato
2. 650 µl di tampone fosfato 50 mM pH 7

Le mix sono state incubate in agitazione a 150 rpm a 37°C per 20 minuti.

Successivamente, sulla base della torbidità o, dell'intensità del colore giallo della reazione, sono state centrifugate a 10.000 rpm per 10 minuti ed è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro a 410

RISULTATI E DISCUSSIONE

Determinazione della variazione del pH durante la fermentazione dell'impasto inoculato con i batteri lattici

Durante la fermentazione, gli impasti preparati come descritto in materiali e metodi sono stati sottoposti alla misura della variazione di pH.

Il pH è stato misurato sia negli impasti fermentati con i lattobacilli sia negli impasti di controllo.

Negli impasti inoculati con i lattobacilli il pH decresce da 5,5 al tempo zero, a 4 nell'arco delle 24 ore. Dopo le 24 ore, quando i lattobacilli iniziano la fase stazionaria di crescita, la produzione di acido lattico causa una diminuzione del pH sino a raggiungere un valore di 3,4 alle 48 ore che rimane costante sino alle 72 ore di fermentazione.

Nell'impasto fermentato con il lievito commerciale di *S. cerevisiae* il pH diminuisce raggiungendo alle 48 ore un valore di circa 4,9 costante sino alle 72 ore di fermentazione.

Nell'impasto senza inoculo batterico l'andamento del pH dopo le 24 ha raggiunto lo stesso valore di pH degli impasti fermentati con i lattobacilli (3,8), probabilmente per la presenza di fermenti lattici provenienti o dalla farina o dall'ambiente (Fig.19).

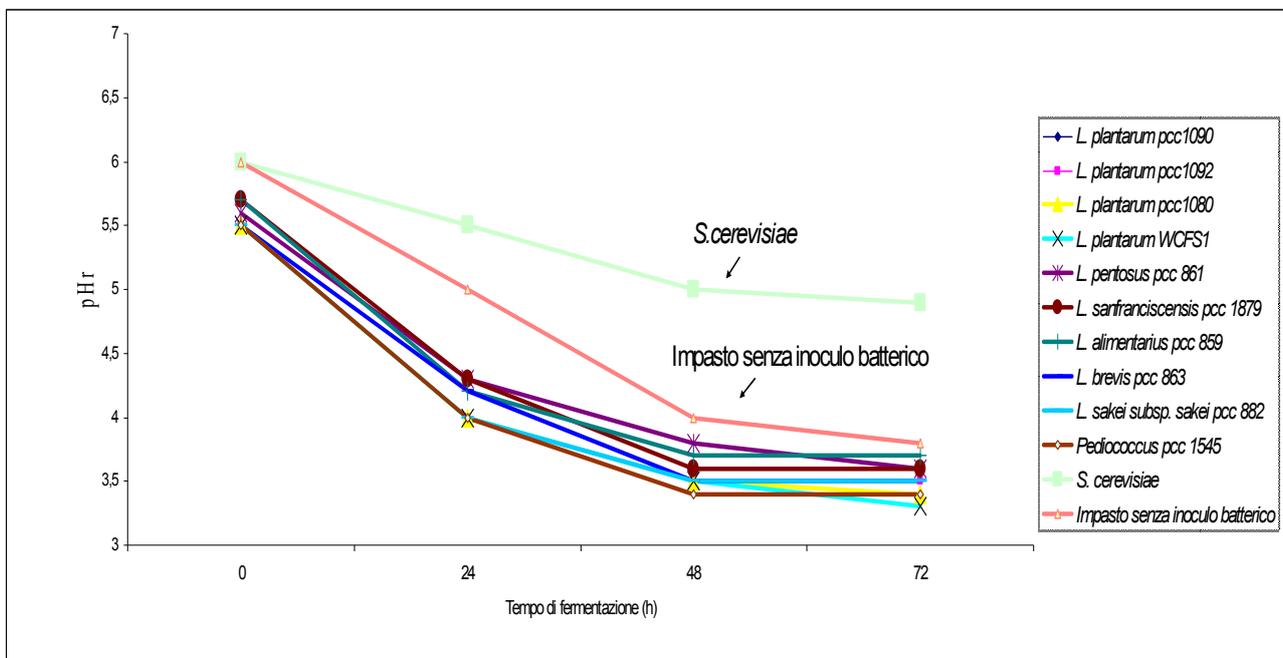


Fig. 19. Evoluzione del pH in impasti fermentati con Lattobacilli e Lievito di birra commerciale.

Valutazione dell'attività proteolitica dei batteri lattici durante la fermentazione dell'impasto.

Le frazioni proteiche sono state estratte e separate utilizzando gel di poliacrilamide in Tricina con gradiente al 10% con un tampone Tris/tricina (Di Cagno *et al.*, 2002, 2004) e gel di poliacrilamide in A-Page con gradiente al 7% con un tampone acido lattico/alluminio lattato a pH 3.1.

Dopo colorazione in Coomassie le bande proteiche sono state ritagliate dal gel e preparate per l'analisi al nanoHPLC-nanoESI-Q-TOF.

L'identificazione delle bande proteiche è stata condotta inizialmente attraverso la tecnica del Peptide Mass Fingerprinting (PMF), è stato anche necessario ricorrere al sequenziamento diretto delle gliadine in quanto il PMF si è dimostrato scarsamente efficace per via della notevole abbondanza di residui di prolina che comporta l'inibizione delle endoproteasi richieste dalla digestione enzimatica. La metodica di estrazione è risultata essere efficace (Fig. 20 e Tab. 9).

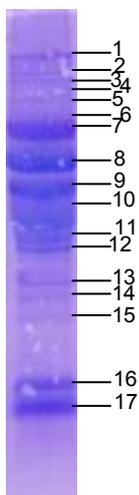


Fig. 21. TRICINA SDS-PAGE (10%) colorato in coomassie. Gliadine estratte da impasto costituito da acqua e farina al tempo 24 ore di fermentazione, i numeri a fianco al gel identificano le bande tagliate per l'analisi in spettrometria di massa

SLICES	ACCESSION NUMBER	IDENTIFICATION	SEQUENCES
1	P17314	(IAAC3_WHEAT) Alpha amylase/trypsin inhibitor CM3 precursor	YFIALPVPSQPVDPR
2	P10385	GLTA_WHEAT Glutenin, low molecular weight subunit precursor	LGQQPQQQLAH
	P04730	GDB3_WHEAT Gamma-gliadin (Gliadin B-III)	LGQQPQQQLAH
3	P10386	GLTB_WHEAT Glutenin, low molecular weight subunit 1D1 precursor	QQLPQIPQQSR
	P04730	GDB3_WHEAT Gamma-gliadin (Gliadin B-III)	QQLPQIPQQSR
4	P08453	GDB2_WHEAT Gamma-gliadin precursor	R.APFASIVAGIGGQ
5	P08454	GDB2_WHEAT Gamma-gliadin precursor	PFIQPSLQQQ
6	P18573	Alpha/Beta-gliadin A-IV precursor (Prolamin)	QQLPQPPQ
7	P18573	Alpha/Beta-gliadin MM1 precursor (Prolamin)	VQPQQLPQFEELR
8	P04727	Alpha/Beta-gliadin clone PW8142 precursor (Prolamin)	KPQQLPKFEELR
9	P35527	Keratin, type cytoskeletal 9	LQKQQQQQLKQR
10	P04729	Gamma-gliadin B-I precursor	FSSSSGYGGGSSR
11	P04721	GDA1-WHEAT Alpha/Beta gliadin A-I precursor	QQLSQLPEKSR
12	P10385	Glutenin, low molecular weight subunit precursor	QQPLQQYPLGQGSFR
	P18573	Alpha/Beta-gliadin MM1 precursor (Prolamin)	IILQQQQQQQQQ
13	P02863	GDA0_WHEAT Alpha/Beta gliadin precursor	PQPQPFPSQ
14	P10386	GLTB_WHEAT Glutenin, low molecular weight subunit 1D1 precursor	QQQLAQGT
15	P04730	GDB3_WHEAT Gamma-gliadin (Gliadin B-III)	LPQIPQQSR
16	P17314	(IAAC3_WHEAT) Alpha amylase/trypsin inhibitor CM3 precursor	R.SGNVGESGLIDLPGCPR.E
	P02863	(IAAC3_WHEAT) Alpha amylase/trypsin inhibitor CM3 precursor	R.YFIALPVPSQPVDPR.S
17	P02863	GDA0_WHEAT Alpha/Beta gliadin precursor	QQKQQQQ

Tab. 9. Identificazione e sequenze

Una volta in possesso di informazioni certe sulla natura delle proteine estratte, il passo successivo è consistito nel mettere a confronto l'attività proteolitica direttamente in impasto, sviluppata dai diversi batteri lattici isolati da impasti della Sardegna: *L. plantarum* pcc 1090, *L. plantarum* pcc 1092, *L. pentosus* pcc 861, *L. sanfranciscensis* pcc 1879, *L. alimentarius* pcc 859, *L. brevis* pcc 863, *L. sakei* subsp. *sakei* pcc 882, *Pediococcus pentosaceus* pcc 1545, *L. plantarum* pcc 1080.

Per questa prova è stato utilizzato anche il ceppo di *L. plantarum* WCFS1 isolato da saliva (Kleerezebezem *et al.*, 2003) e gentilmente fornito dall'Università di Bari.

Le proteine sono state estratte a diversi tempi di fermentazione, utilizzando il protocollo di Osborne e modificato da Weiss *et al.* (1993), la frazione proteica da noi utilizzata è stata quella contenente le gliadine risospese in Etanolo al 75%.

Il risultato ottenuto dall'analisi elettroforetica, (Figg. 23, 24, 25), ci ha permesso di dimostrare come tutti i ceppi analizzati possiedono una attività proteolitica nei confronti della gliadina. Negli impasti dove si è utilizzato il lievito di birra e dove non è avvenuta nessuna fermentazione non si è avuta proteolisi (Fig. 22).

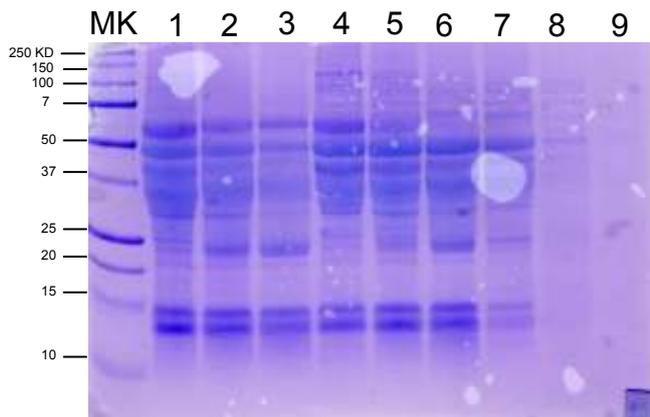


Fig. 22. TRICINA SDS-PAGE (10%) colorato in coomassie.
Cinetica dell' attività proteolitica di differenti ceppi batterici su gliadine estratte con il metodo di Osborne.
MW Ladder BioRAD,

- 1: gliadine estratte da impasto costituito da acqua e farina alle 24 ore (controllo 1),
- 2: gliadine estratte da impasto costituito da acqua e farina alle 48 ore (controllo 1),
- 3: gliadine estratte da impasto inoculato costituito da acqua e farina alle 72 ore (controllo 1),
- 4: Lievito di birra commerciale (*S. cerevisiae*) alle 24 ore (controllo 2),
- 5: Lievito di birra commerciale (*S. cerevisiae*) alle 48 ore (controllo 2),
- 6: Lievito di birra commerciale (*S. cerevisiae*) alle 72 ore (controllo 2),
- 7: *L. plantarum* pcc 1090 alle 24 ore,
- 8: *L. plantarum* pcc 1090 alle 48 ore,
- 9: *L. plantarum* pcc 1090 alle 72 ore.



Fig. 23. TRICINA SDS-PAGE (10%) colorato in coomassie.
Cinetica dell' attività proteolitica di differenti ceppi batterici su gliadine estratte con il metodo di Osborne.

- 1: *L. plantarum* pcc 1092 alle 24 ore,
 - 2: *L. plantarum* pcc 1092 alle 48 ore,
 - 3: *L. plantarum* pcc 1092 alle 72 ore,
 - 4: *L. pentosus* pcc 861 alle 24 ore,
 - 5: *L. pentosus* pcc 861 alle 48 ore,
 - 6: *L. pentosus* pcc 861 alle 72 ore,
 - 7: *L. sanfranciscensis* pcc 1879 alle 24 ore,
 - 8: *L. sanfranciscensis* pcc 1879 alle 48 ore,
 - 9: *L. sanfranciscensis* pcc 1879 alle 72 ore,
- MW Ladder BioRAD.



Fig. 24. TRICINA SDS-PAGE (10%) colorato in coomassie.
Cinetica dell' attività proteolitica di differenti ceppi batterici su gliadine estratte con il metodo di Osborne.
1: *L. alimentarius* pcc 859 alle 24 ore,
2: *L. alimentarius* pcc 859 alle 48 ore,
3: *L. alimentarius* pcc 859 alle 72 ore,
4: *L. brevis* pcc 863 alle 24 ore,
5: *L. brevis* pcc 863 alle 48 ore,
6: *L. brevis* pcc 863 alle 72 ore,
7: *L. sakei* subsp. *sakei* pcc 882 alle 24 ore,
8: *L. sakei* subsp. *sakei* pcc 882 alle 48 ore,
9: *L. sakei* subsp. *sakei* pcc 882 alle 72 ore,
MW Ladder BioRAD.

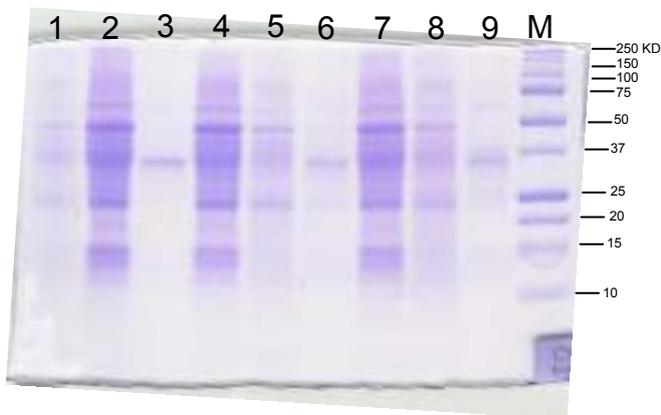


Fig. 25. TRICINA SDS-PAGE (10%) colorato in coomassie.
Cinetica dell' attività proteolitica di differenti ceppi batterici su gliadine estratte con il metodo di Osborne.
1: *Pediococcus pentosaceus* pcc 1545 alle 48 ore,
2: *Pediococcus pentosaceus* pcc 1545 alle 24 ore,
3: *Pediococcus pentosaceus* pcc 1545 alle 72 ore,
4: *L. plantarum* WCFS1 alle 24 ore,
5: *L. plantarum* WCFS1 alle 48 ore,
6: *L. plantarum* WCFS1 alle 72 ore,
7: *L. plantarum* pcc 1080 alle 24 ore,
8: *L. plantarum* pcc 1080 alle 48 ore,
9: *L. plantarum* pcc 1080 alle 72 ore,
MW Ladder BioRAD.

Nella tecnica dell'A-PAGE o Sistema Potassio Lattato, le proteine sono state estratte dagli impasti fermentati utilizzando la dimetilformammide (DMF 1,5 M) e non sono state sottoposte ad azione di agenti riducenti. Tale tecnica, (Metakovsky *et al.* 1993, Rumbo *et al.* 1997; Ram *et al.*, 2005), consente una migliore risoluzione e separazione delle bande proteiche gliadiniche grazie all'effetto combinato di un gel con un pH acido e un tampone discontinuo (Figg. 26 ,27, 28).

In questa prova è stato aggiunto un terzo controllo costituito da un impasto di farina e acqua acidificato con acido lattico (Fig.26).

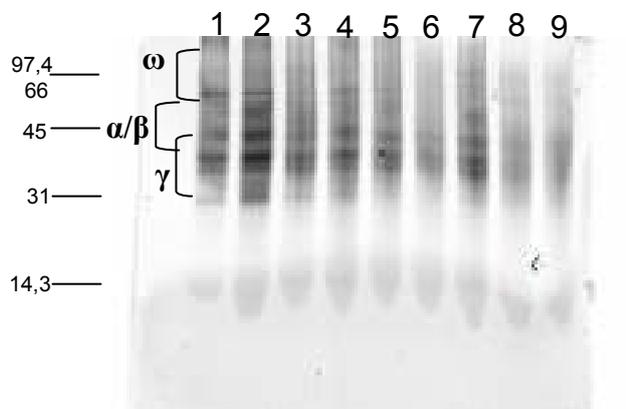


Fig. 26. Colorazione con Blue Coomassie di frazioni proteiche di gliadina, estratte con la DMF, separate mediante A-Page in gradiente 7%.

- 1: gliadine estratte da impasto inoculato con *S. cerevisiae* alle 24 ore (controllo 2),
- 2: *S. cerevisiae* alle 48 ore (controllo 2),
- 3: *S. cerevisiae* alle 72 ore (controllo 2),
- 4: gliadine estratte da impasto costituito da acqua e farina alle 24 ore (controllo 1),
- 5: controllo 1 alle 48 ore,
- 6: controllo 1 alle 72 ore,
- 7: gliadine estratte da impasto acidificato con acido lattico (controllo 3) alle 24 ore,
- 8: controllo 3 alle 48 ore,
- 9: controllo 3 alle 72 ore.

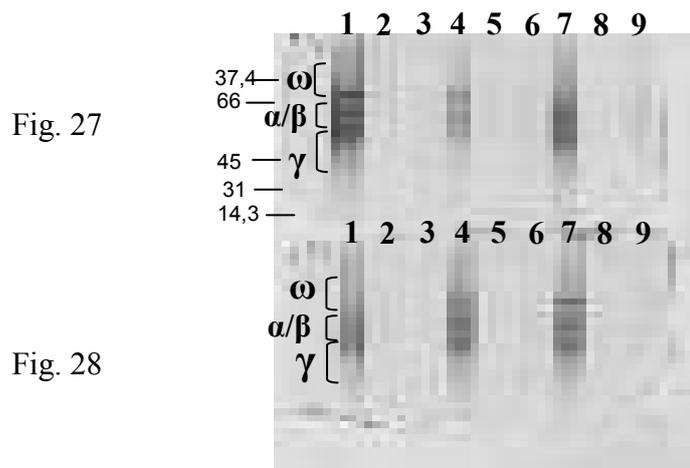


Fig. 27

Fig. 28

Fig. 27.- Colorazione con Blue Coomassie di frazioni proteiche di gliadina, estratte con la DMF, separate mediante A-Page in gradiente 7%.

- 1: *L. plantarum* pcc 1092 alle 24 ore,
- 2: *L. plantarum* pcc 1092 alle 48 ore,
- 3: *L. plantarum* pcc 1092 alle 72 ore,
- 4: *L. pentosus* pcc 861 alle 24 ore,
- 5: *L. pentosus* pcc 861 alle 48 ore,
- 6: *L. pentosus* pcc 1090 alle 72 ore,
- 7: *L. sanfranciscensis* pcc 1879 alle 24 ore,
- 8: *L. sanfranciscensis* pcc 1879 alle 48 ore,
- 9: *L. sanfranciscensis* pcc 1879 alle 72 ore.

Fig. 28. Colorazione con Blue Coomassie di frazioni proteiche di gliadina, estratte con la DMF, separate mediante A-Page in gradiente 7%.

- 1: *L. alimentarius* pcc 859 alle 24 ore,
- 2: *L. alimentarius* pcc 859 alle 48 ore,
- 3: *L. alimentarius* pcc 859 alle 72 ore,
- 4: *L. brevis* pcc 863 alle 24 ore,
- 5: *L. brevis* pcc 863 alle 48 ore,
- 6: *L. brevis* pcc 863 alle 72 ore,
- 7: *L. sakei* subsp. *sakei* pcc 882 alle 24 ore,
- 8: *L. sakei* subsp. *sakei* pcc 882 alle 48 ore,
- 9: *L. sakei* subsp. *sakei* pcc 882 alle 72 ore.

Entrambe le tecniche di estrazione hanno confermato la capacità dei batteri lattici di degradare la gliadina nel tempo.

Infatti come è immediatamente percepibile dall'analisi elettroforetica le bande proteiche tendono a scomparire alle 72 ore di fermentazione mentre negli impasti di controllo non si è avuta proteolisi (Fig. 22 e 26).

Un dato importante è dato anche dal valore dell'acidità, infatti in impasti inoculati con i lattobacilli la produzione di acido lattico causa una diminuzione del pH sino a raggiungere un valore di 3,4. Probabilmente il basso pH influenza positivamente l'attività proteolitica dei fermenti lattici.

Questi dati confermano la capacità dei batteri lattici di degradare i peptidi tossici della gliadina, capacità che in un primo tempo era stata attribuita alla presenza di enzimi proteolitici quali aminopeptidasi e carbossi-peptidasi provenienti per lo più da farine ma non confermata dai risultati ottenuti e visibili nelle figg.22 e 26 (impasti di controllo).

Analisi Immunologica delle gliadine dopo l'azione proteolitica dei batteri lattici utilizzando sieri di Pazienti Celiaci e Pazienti Sani

Questa fase di lavoro è stata completata mediante l'applicazione di tecniche immunoenzimatiche per la caratterizzazione della reattività delle gliadine, estratte dai differenti impasti descritti precedentemente, nei confronti di differenti sieri provenienti da soggetti affetti da Celiachia.

I Sieri di pazienti celiaci sono stati gentilmente forniti dalle Facoltà di Medicina di Verona e Torino.

E' stata confrontata la reattività dei sieri provenienti da individui sani con quelli di pazienti celiaci, con le gliadine estratte. Come atteso si è riscontrata una marcata differenza nella reattività alle anti IgA (Figg. 29-32).

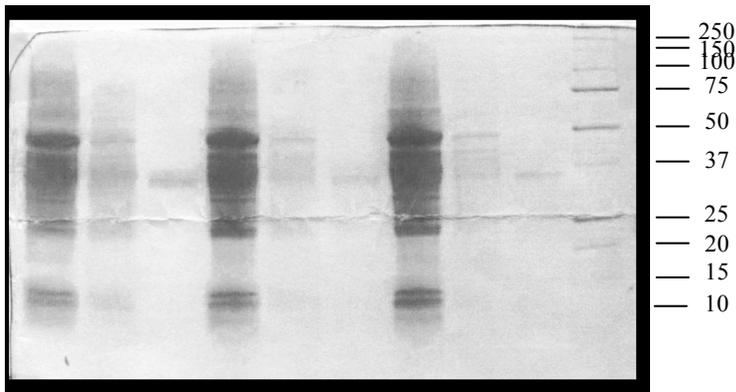


Fig. 29. Gliadine separate mediante TRICINA SDS-PAGE (10%).
1: gliadine estratte da impasto inoculato con *L. plantarum* pcc 1092 alle 24 ore,
2: *L. plantarum* pcc 1092 alle 48 ore,
3: *L. plantarum* pcc 1092 alle 72 ore,
4: *L. pentosus* pcc 861 alle 24 ore,
5: *L. pentosus* pcc 861 alle 48 ore,
6: *L. pentosus* pcc 1090 alle 72 ore,
7: *L. sanfranciscensis* pcc 1879 alle 24 ore,
8: *L. sanfranciscensis* pcc 1879 alle 48 ore,
9: *L. sanfranciscensis* pcc 1879 alle 72 ore,
MW Ladder BioRAD.

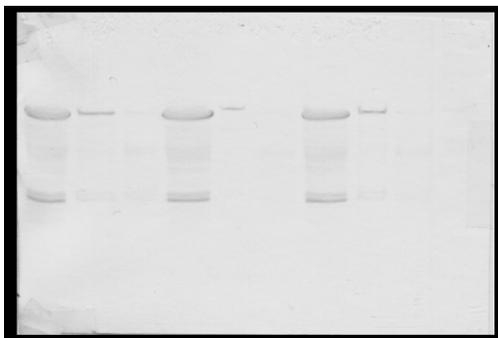


Fig. 30. Riconoscimento delle frazioni proteiche separate in TRICINA SDS-PAGE (10%) con Sieri di pazienti celiac a sinistra e sieri di controllo a destra

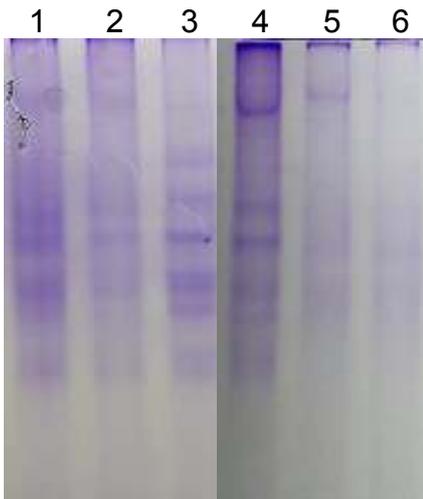


Fig. 31. Gliadine separate mediante A-PAGE (7%).
1: gliadine estratte da impasto inoculato con *S. cerevisiae* alle 24 ore,
2: *S. cerevisiae* alle 48 ore,
3: *S. cerevisiae* alle 72 ore,
4: *L. pentosus* pcc 861 alle 24 ore,
5: *L. pentosus* pcc 861 alle 48 ore,
6: *L. pentosus* pcc 861 alle 72 ore

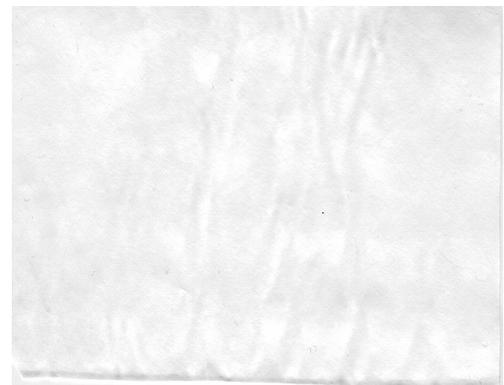
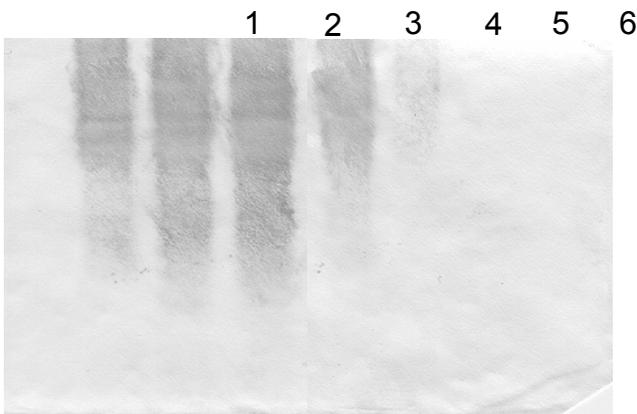
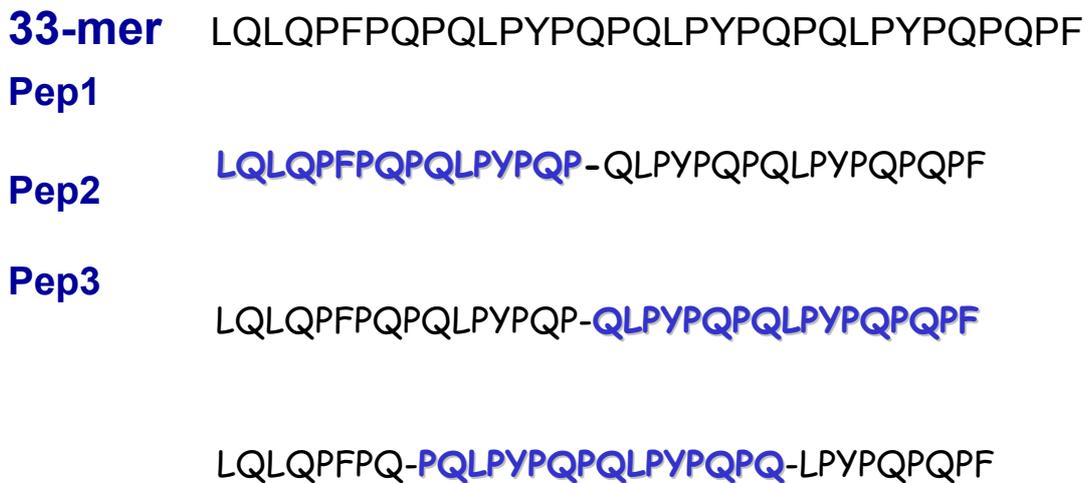


Fig. 32. Riconoscimento delle frazioni proteiche separate in A-PAGE (7%) con Sieri di pazienti celiaci a sinistra e sieri di controllo a destra.

Verifica dell'attività peptidasica utilizzando peptidi antigenici nella celiachia

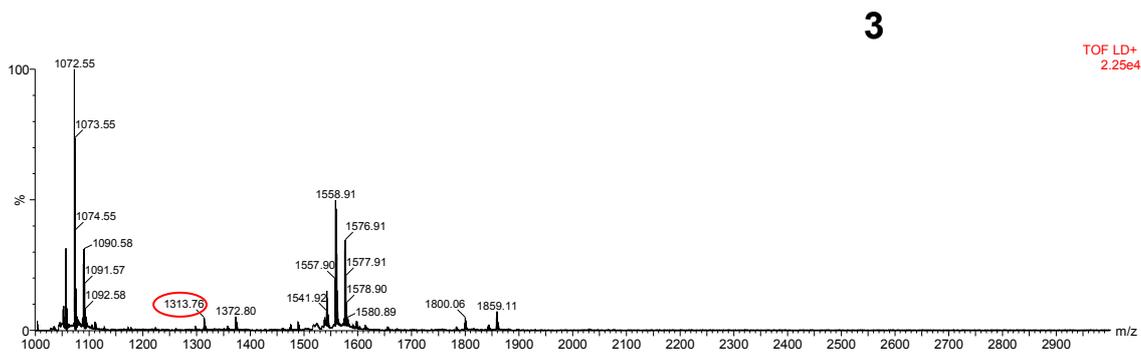
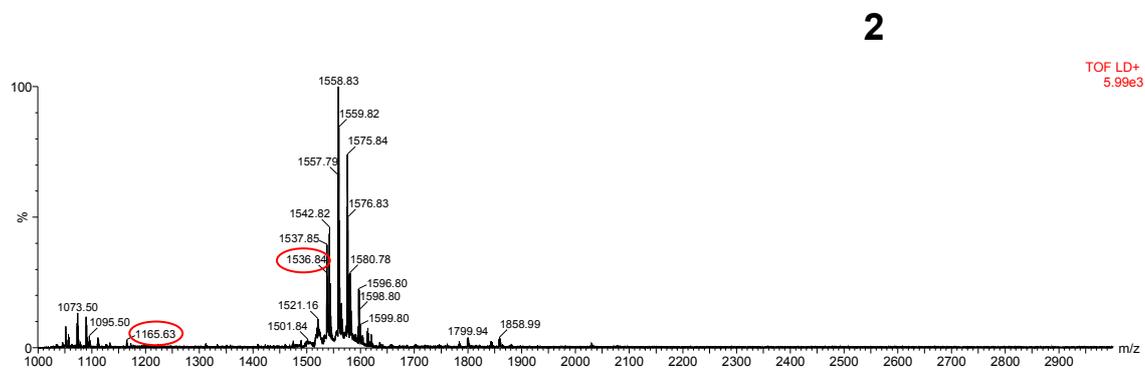
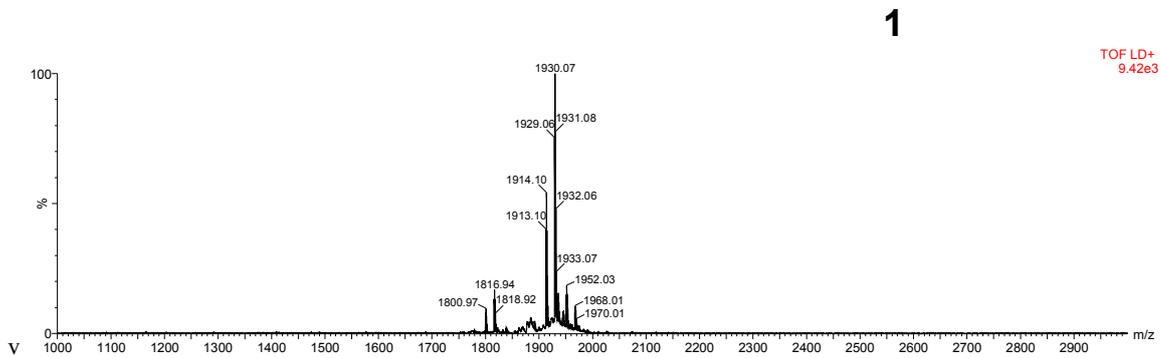
La reazione di idrolisi è stata studiata mettendo a contatto l'estratto cellulare dei Lattobacilli (*L. plantarum* pcc 1090, *L. plantarum* pcc 1092, *L. pentosus* pcc 861, *L. sanfranciscensis* pcc 1879, *L. plantarum* WCFS1), con Peptide 1, Peptide 2, Peptide 3 (frammenti del peptide immunogenico 33-mer frammento della regione 56-88 dell' $\alpha 2$ gliadina) (Schema 6).



Schema 6. Peptidi 1,2,3 “costituiti” sulla base della sequenza aminoacidica del peptide immunogenico 33-mer

I risultati ottenuti dopo la reazione di digestione sono riportati negli spettri 1-45.

Risultati ottenuti in Spettrometria di massa



Spettro Mal di Peptide 1 (*LQLQFPQPQLPYPQP*) prima della reazione;

2) Spettro Mal di peptide 1 dopo 24 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum* pcc 1090;

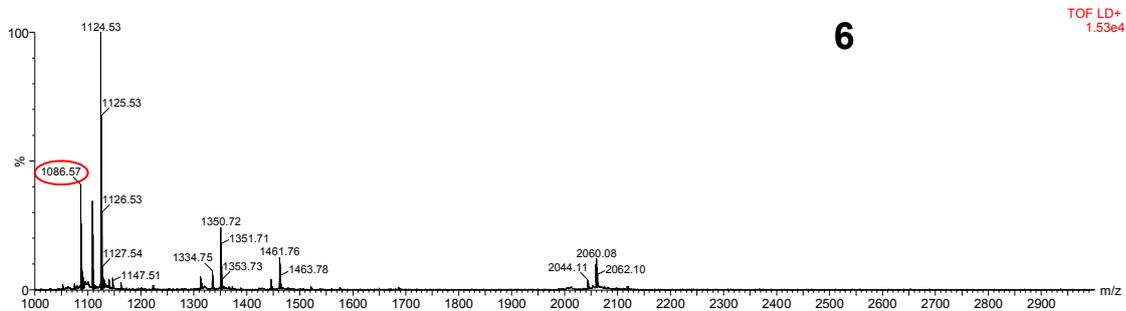
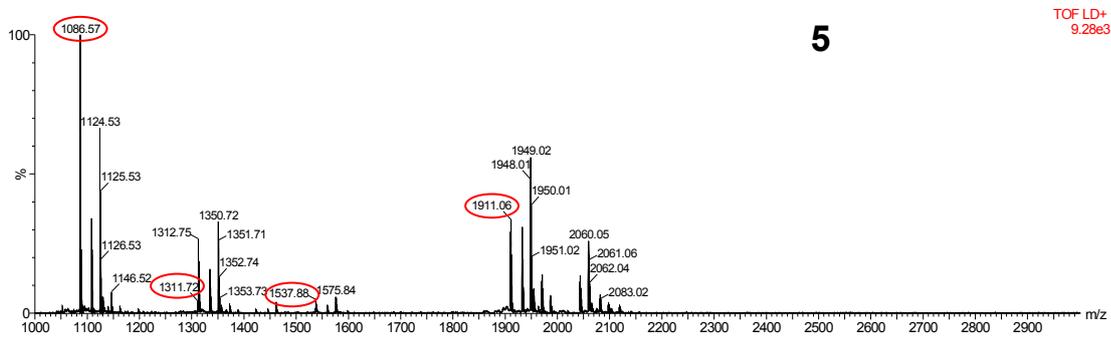
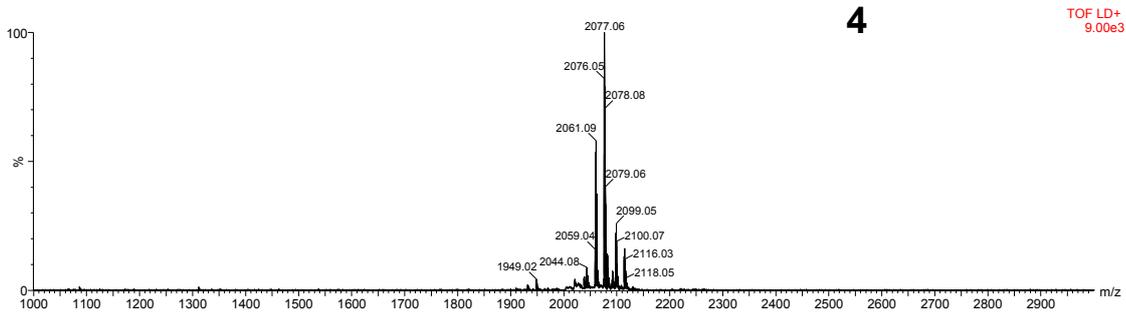
3) Spettro Mal di peptide 1 dopo 48 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum* pcc 1090.

Autore: Dr.ssa Mariangela Stefania Fiori

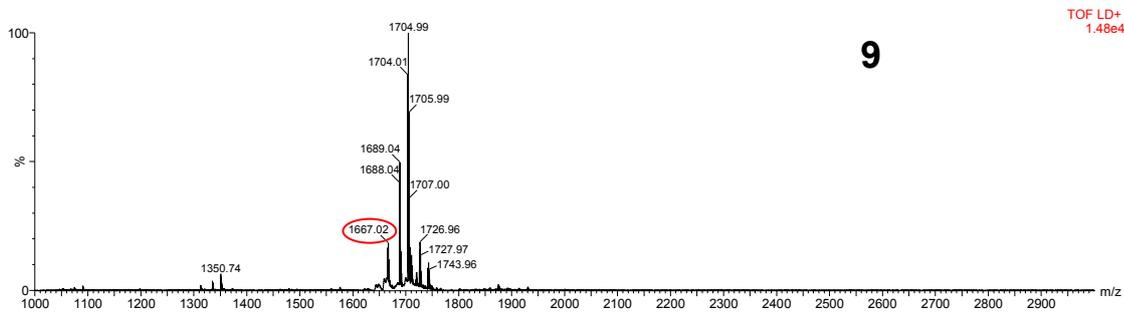
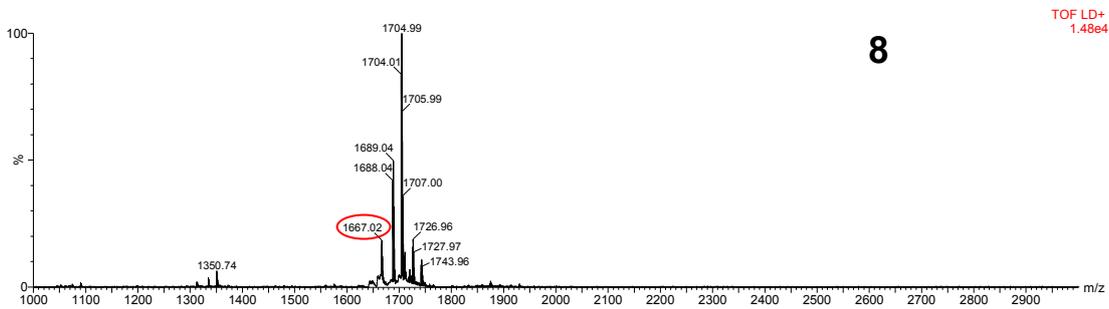
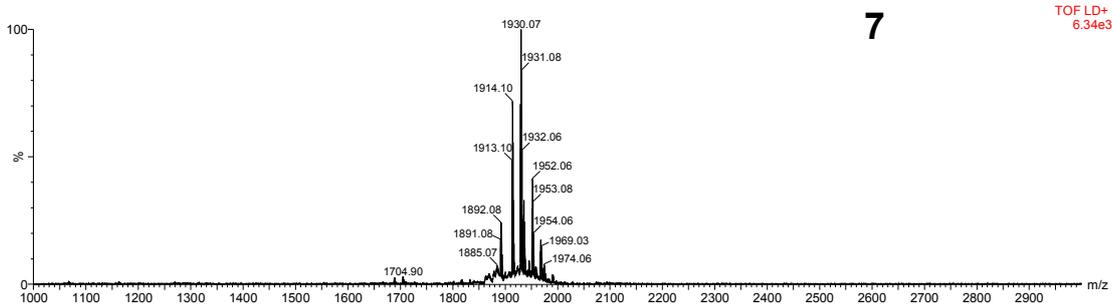
Titolo: Ruolo delle Peptidasi dei LAB nell'Idrolisi delle Gliadine Antigeniche e di Peptidi derivati dal 33-mer.

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

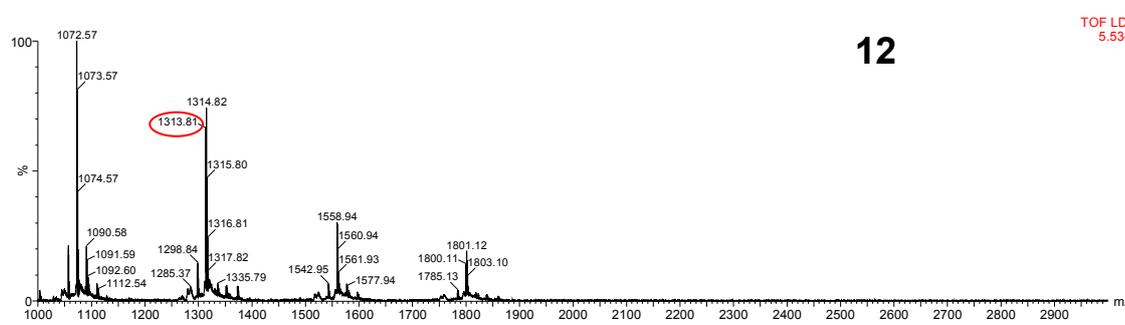
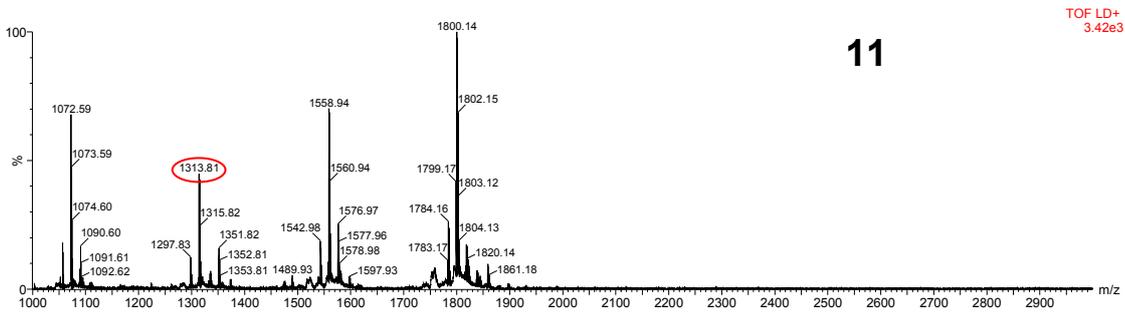
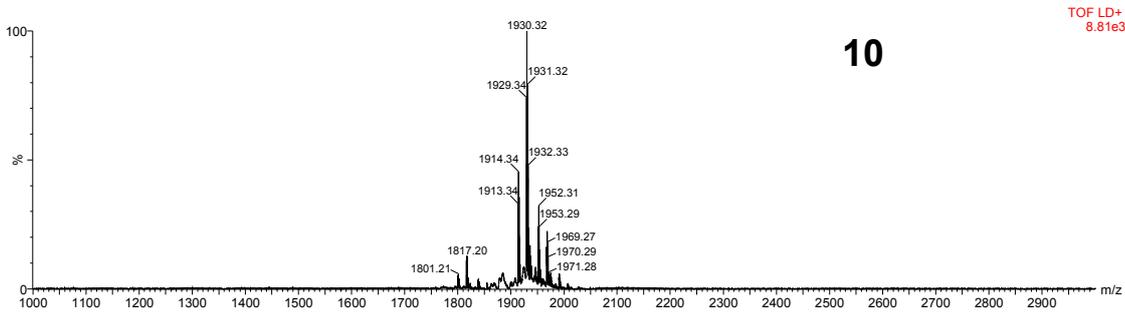
Università degli Studi di Sassari



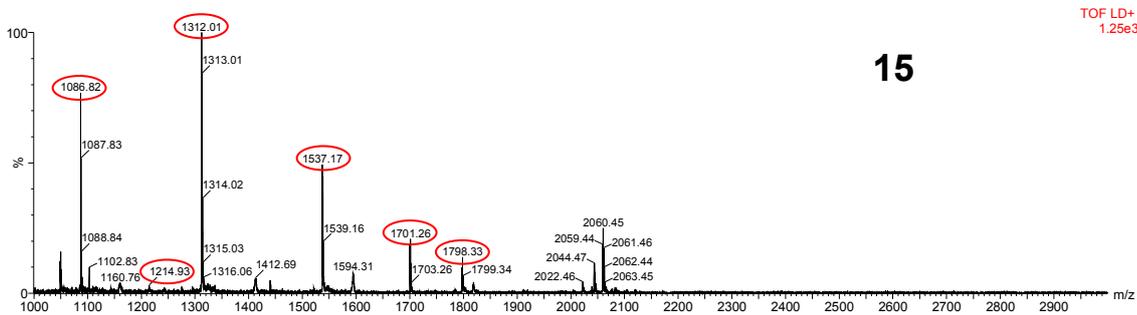
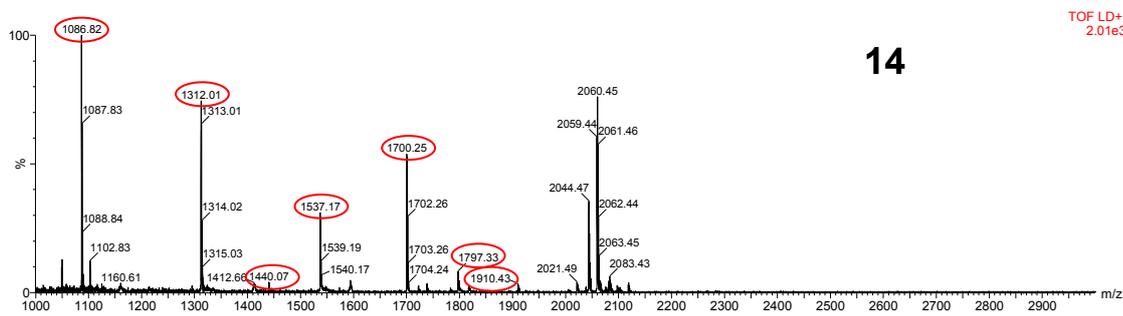
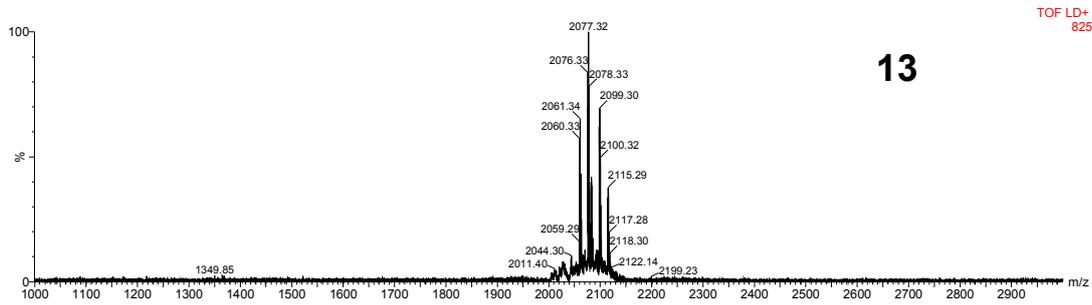
- 4) Spettro Maldi del peptide 2 (*PQLPYPQPQLPYPQPQ*) prima della reazione;
- 5) Spettro Maldi del peptide 2 dopo 24 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum* pcc 1090;
- 6) Spettro Maldi del peptide 2 dopo 48 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum* pcc 1090.



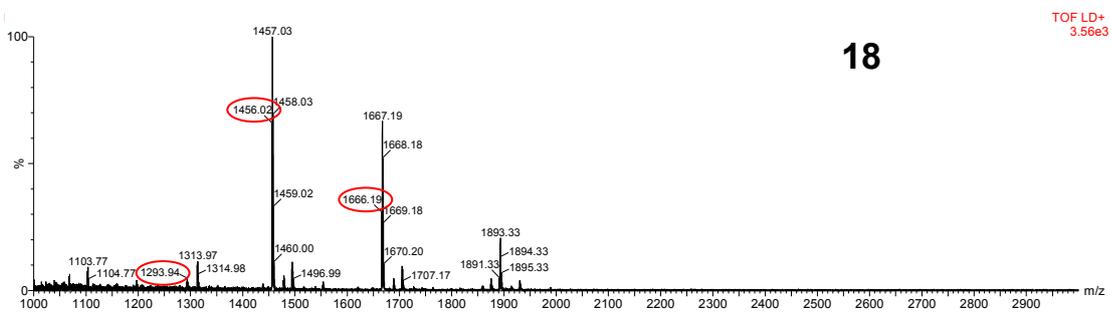
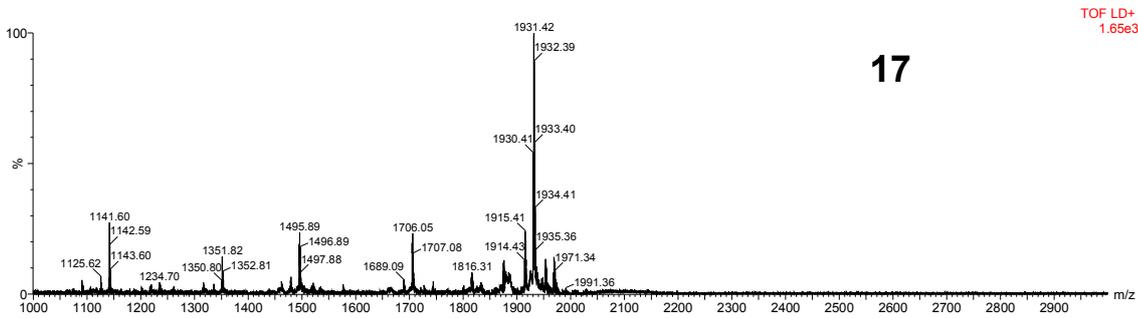
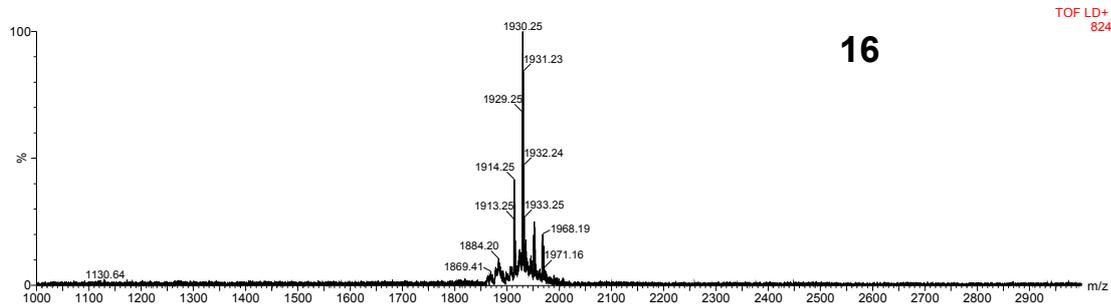
- 7) Spettro Maldi del peptide 3 (*QLPYPQQLPYPQPF*) prima della reazione;
- 8) Spettro Maldi del peptide 3 dopo 24 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum* pcc 1090;
- 9) Spettro Maldi del peptide 3 dopo 48 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum* pcc 1090.



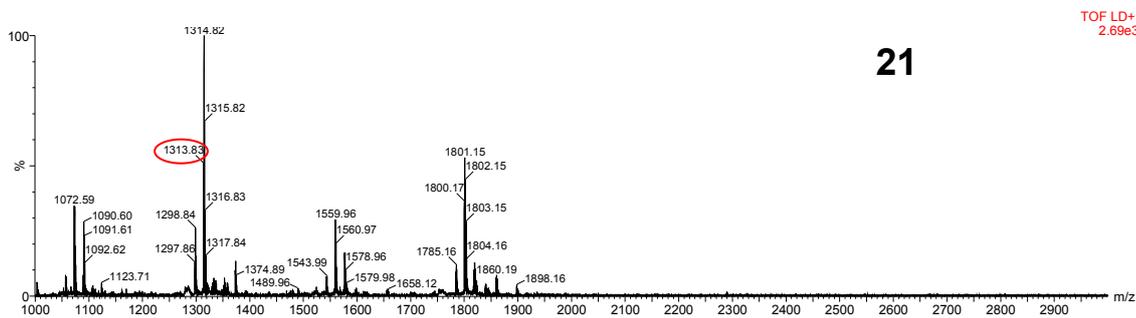
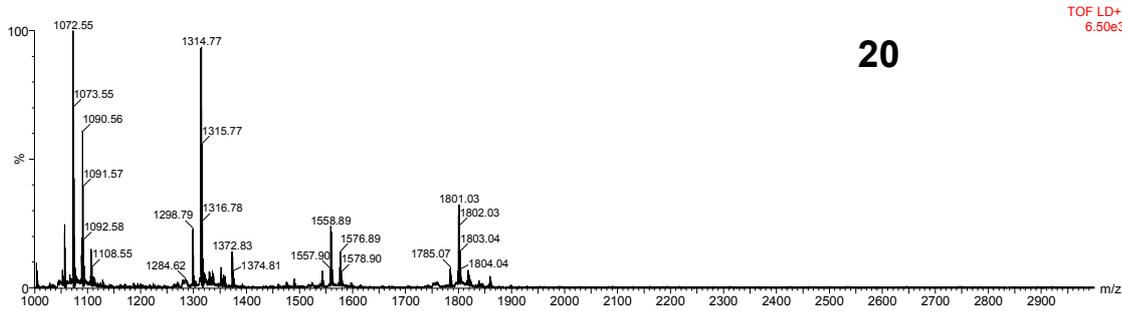
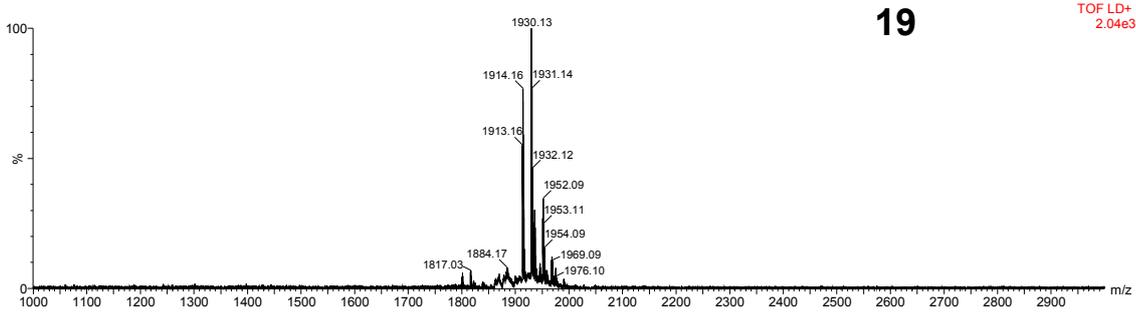
- 10) Spettro Maldi del peptide 1 (*LQLQPFQQLPYPQP*) prima della reazione;
- 11) Spettro Maldi del peptide 1 dopo 24 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. pentosus* pcc 861;
- 12) Spettro Maldi del peptide 1 dopo 48 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. pentosus* pcc 861.



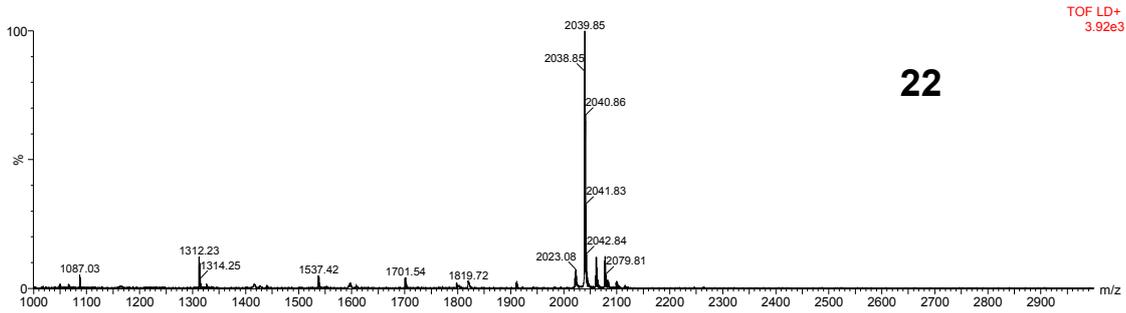
- 13) Spettro Maldi del peptide 2 (*PQLPYPQQLPYPQQL*) prima della reazione;
- 14) Spettro Maldi del peptide 2 dopo 24 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. pentosus* pcc 861;
- 15) Spettro Maldi del peptide 2 dopo 48 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. pentosus* pcc 861.



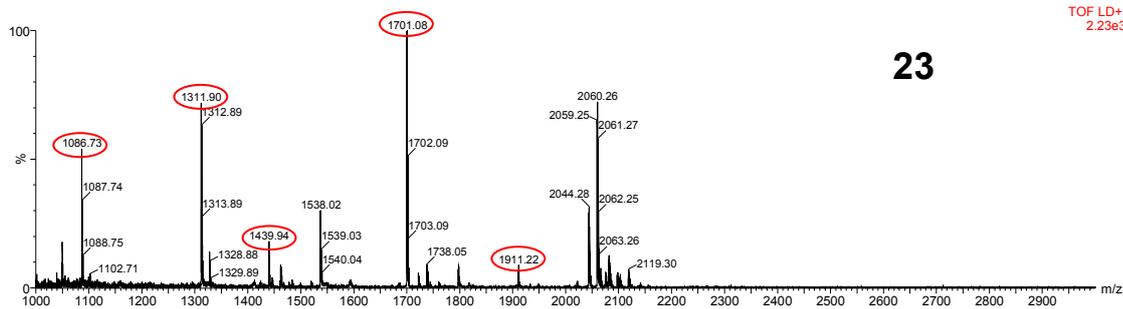
- 16) Spettro Maldi del peptide 3 (*QLPYPQPQLPYPQPQPF*) prima della reazione;
 17) Spettro Maldi del peptide 3 dopo 24 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. pentosus* pcc 861;
 18) Spettro Maldi del peptide 3 dopo 48 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. pentosus* pcc 861.



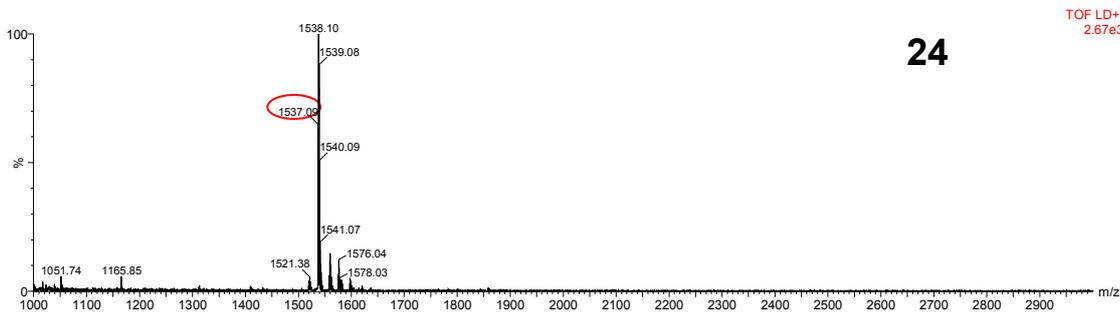
- 19) Spettro Maldi del peptide 1 (*LQLQFPQPQLPYPQP*) prima della reazione;
 20) Spettro Maldi del peptide 1 dopo 24 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum* WCFS1;
 21) Spettro Maldi del peptide 1 dopo 48 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum* WCFS1.



22



23

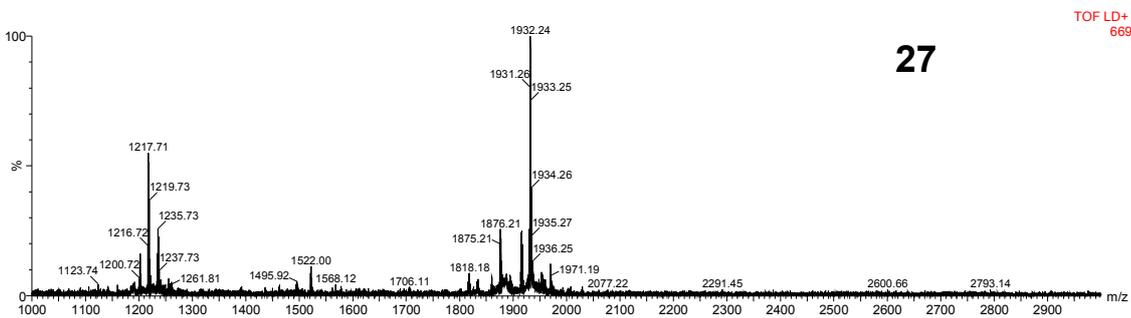
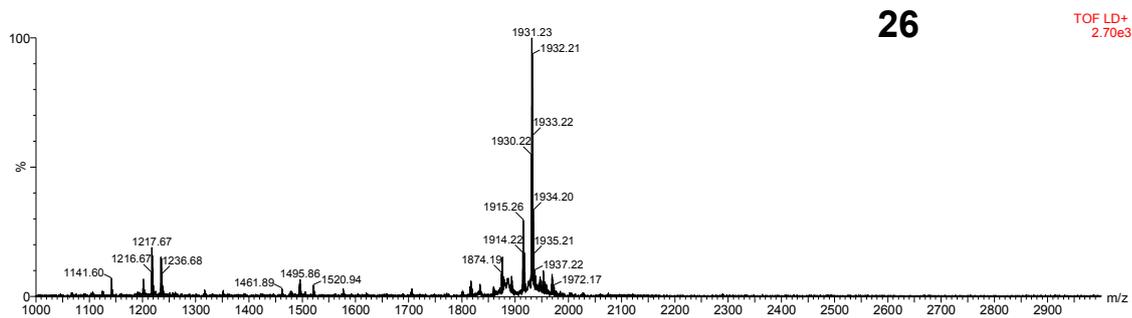
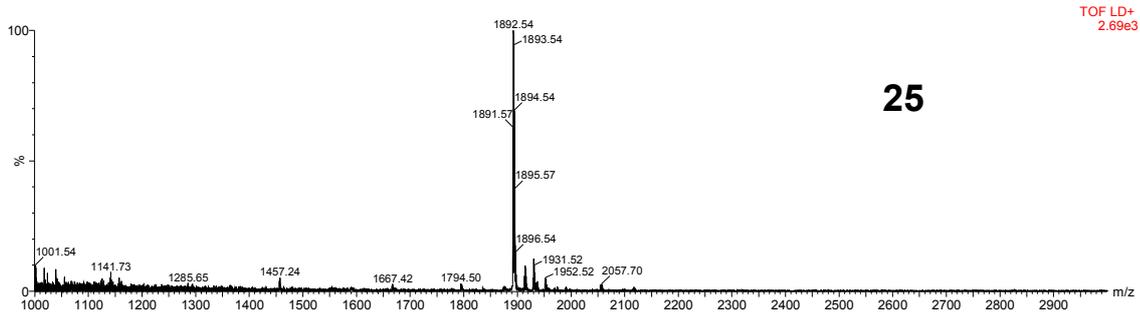


24

22) Spettro Maldi del peptide 2 (*PQLPYPQQLPYPQPQ*) prima della reazione;

23) Spettro Maldi del peptide 2 dopo 24 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum WCFS1*;

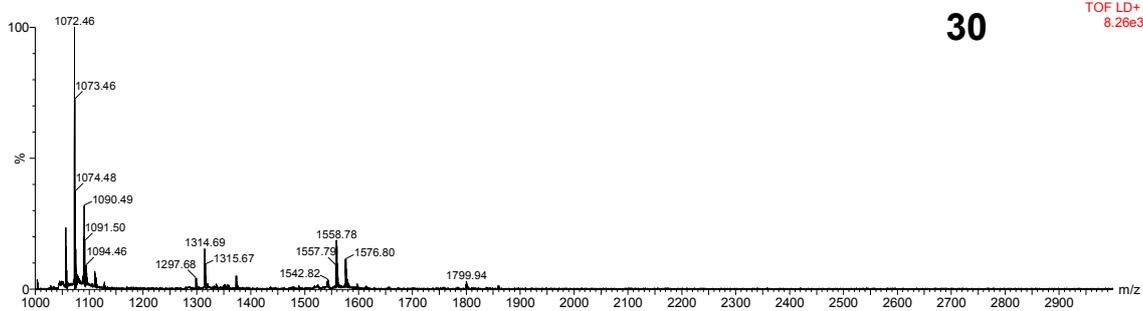
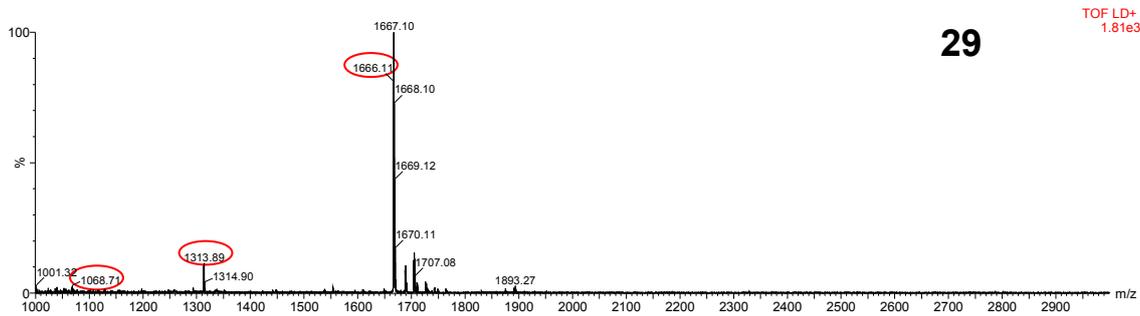
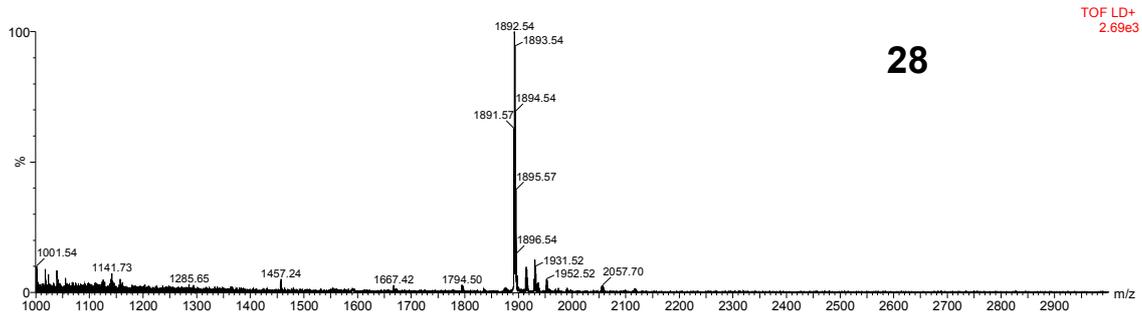
24) Spettro Maldi del peptide 2 dopo 48 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum WCFS1*.



25) Spettro Maldi del peptide 3 (*QLYPQPQLYPQPQPF*) prima della reazione;

26) Spettro Maldi del peptide 3 dopo 24 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum WCFS1*;

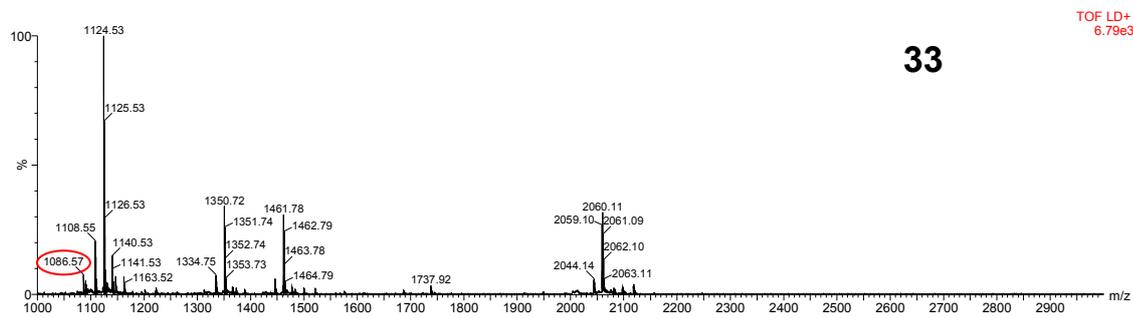
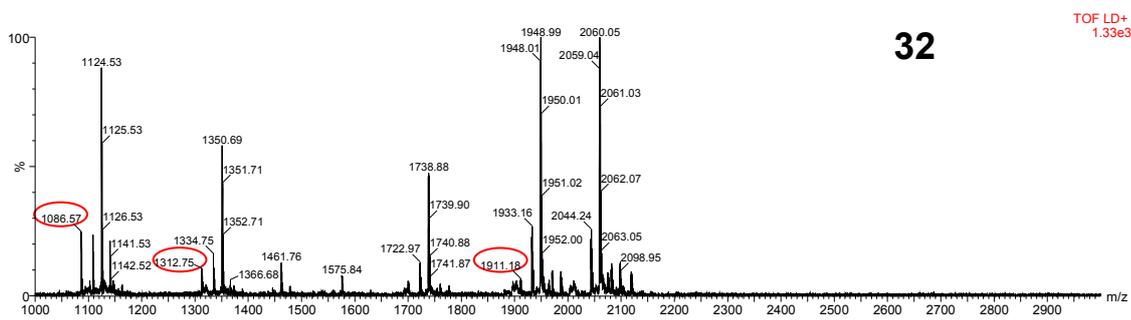
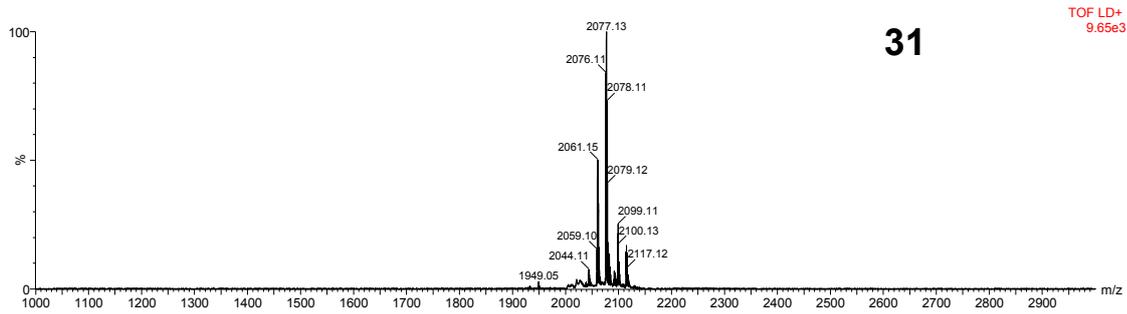
27) Spettro Maldi del peptide 3 dopo 48 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum WCFS1*.



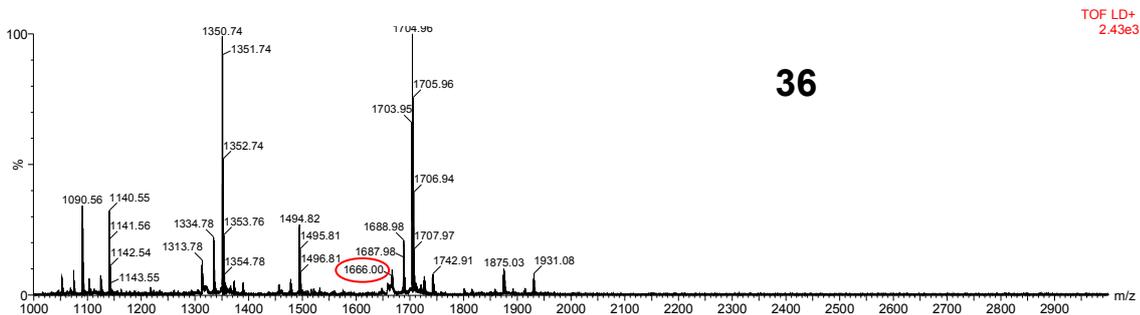
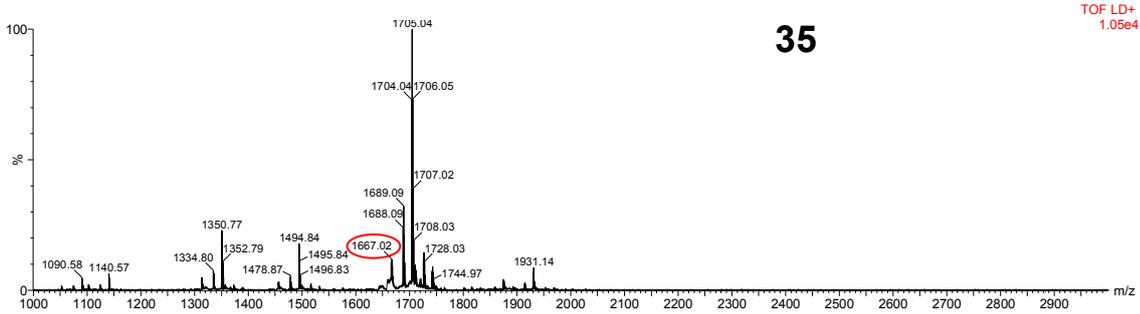
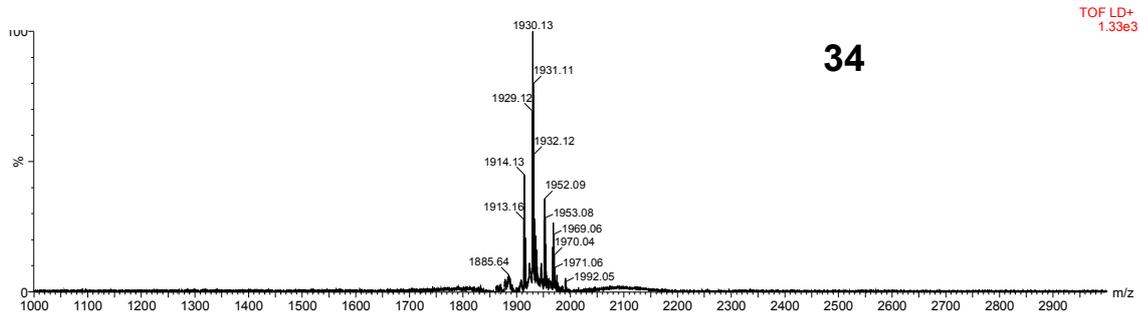
28) Spettro Maldi del peptide 1 (*LQLQFPQPQLPYQP*) prima della reazione;

29) Spettro Maldi del peptide 1 dopo 24 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. sanfranciscensis* pcc 1879;

30) Spettro Maldi del peptide 1 dopo 48 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. sanfranciscensis* pcc 1879.



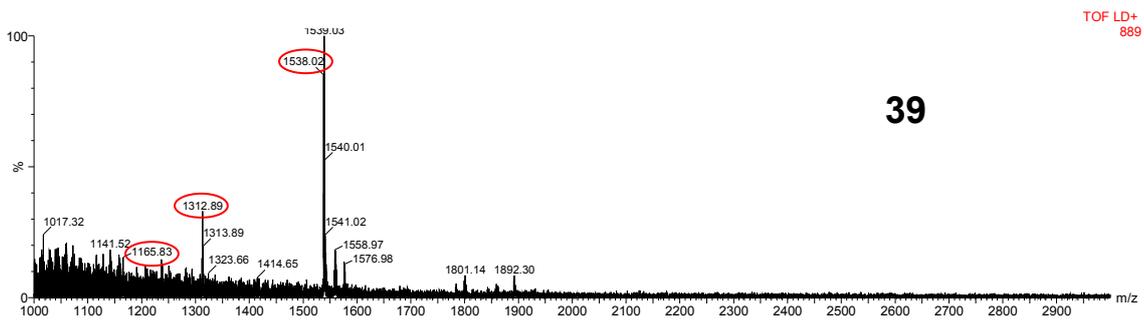
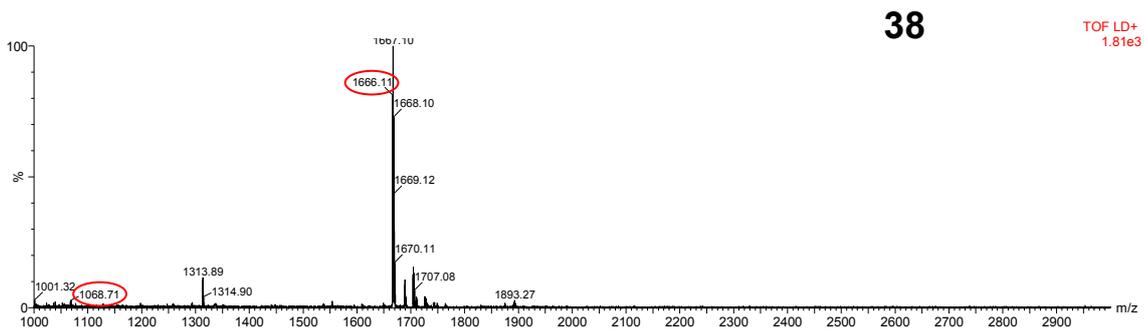
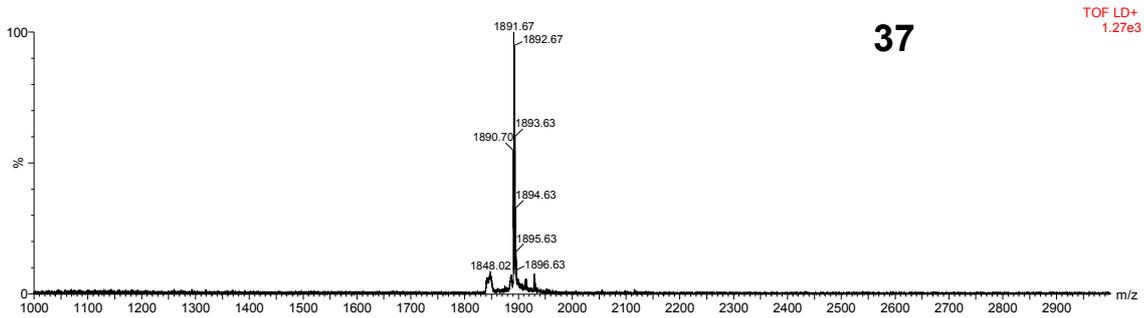
- 31) Spettro Maldi del peptide 2 (*PQLPYPQQLPYPQPQ*) prima della reazione;
- 32) Spettro Maldi del peptide 2 dopo 24 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. sanfranciscensis* pcc 1879;
- 33) Spettro Maldi del peptide 2 dopo 48 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. sanfranciscensis* pcc 1879.



(34) Spettro Maldi del peptide 3 *QLPYPQPQLPYPQPQPF* prima della reazione;

35) Spettro Maldi del peptide 3 dopo 24 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. sanfranciscensis* pcc 1879;

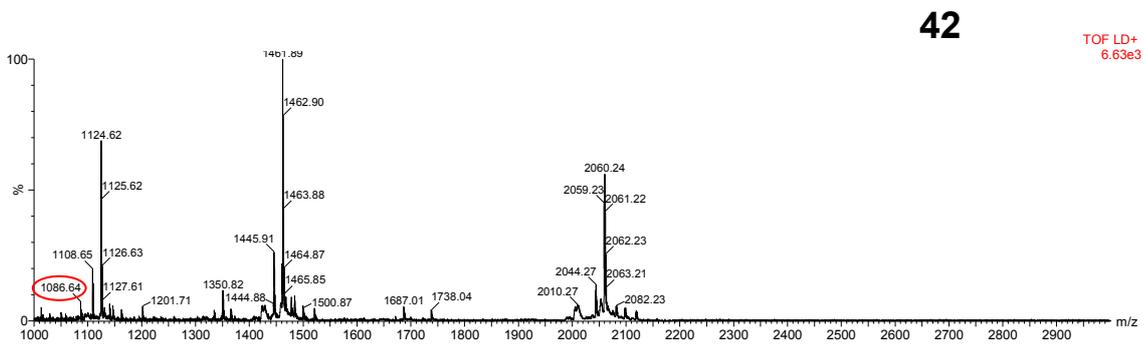
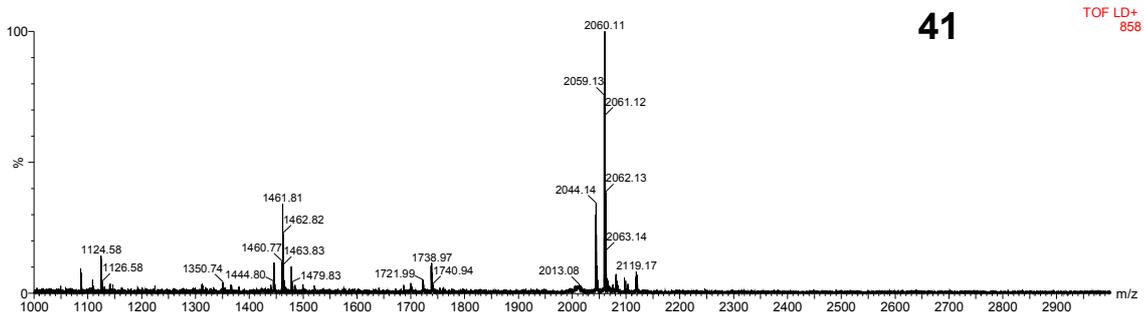
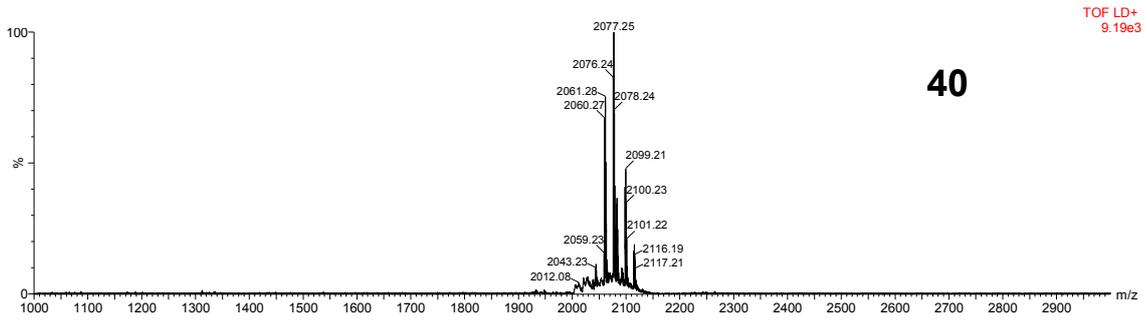
36) Spettro Maldi del peptide 3 dopo 48 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. sanfranciscensis* pcc 1879.



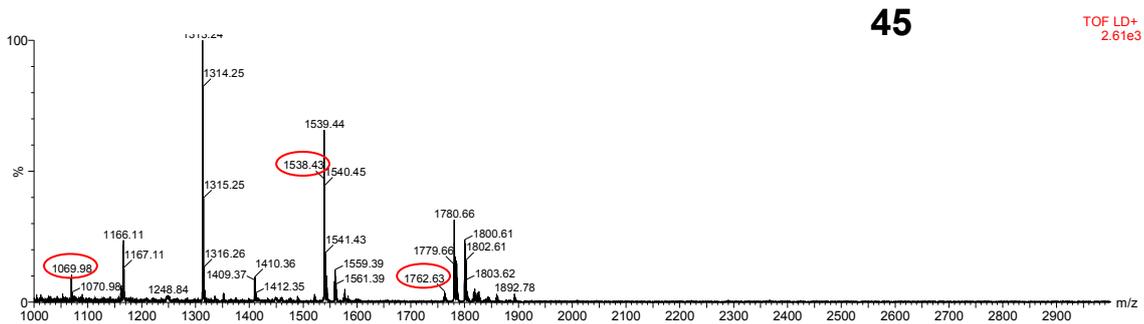
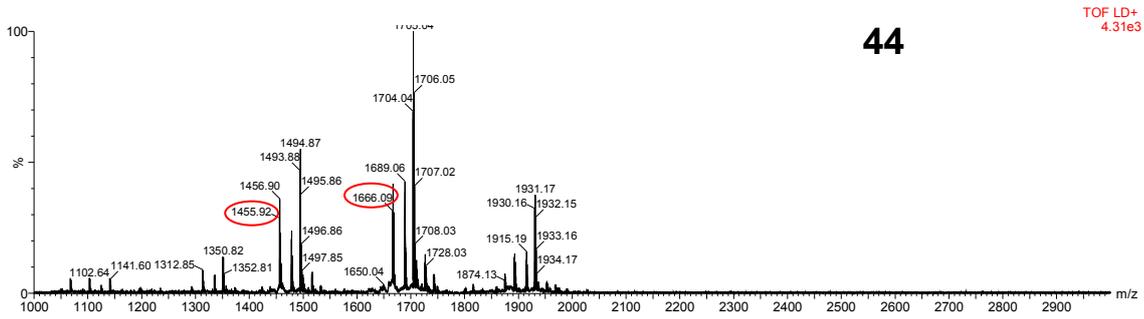
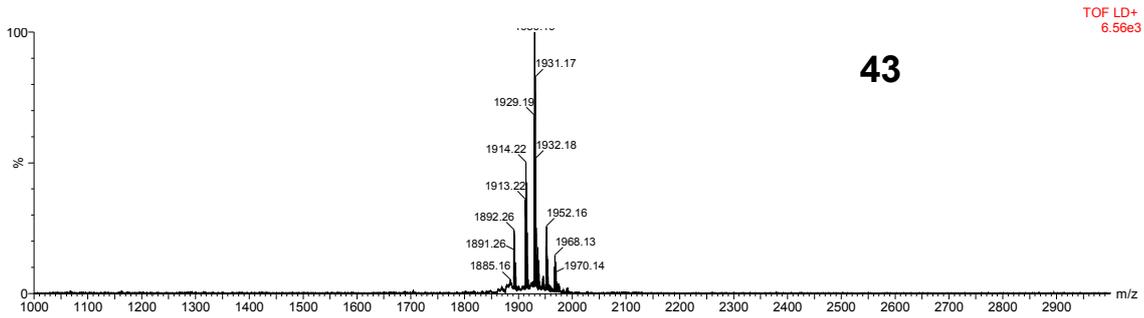
37) Spettro Maldi del peptide 1 (*LQLQFPQPQLPYPQP*), prima della reazione;

38) Spettro Maldi del peptide 1 dopo 24 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum* pcc 1092;

39) Spettro Maldi del peptide 1 dopo 48 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum* pcc 1092.



- 40) Spettro Maldi del peptide 2 (*PQLPYPQQLPYPQPQ*) prima della reazione;
 41) Spettro Maldi del peptide 2 dopo 24 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L.plantarum* pcc 1092;
 42) Spettro Maldi del peptide 2 dopo 48 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L.plantarum* pcc 1092.



- 43) Spettro Maldi del peptide 3 (*QLPYPQPQLPYPQPQPF*) prima della reazione;
- 44) Spettro Maldi del peptide 3 dopo 24 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum* pcc 1092;
- 45) Spettro Maldi del peptide 3 dopo 48 ore di incubazione con l'estratto cellulare del *L. plantarum* pcc 1092.

Dagli spettri di massa ottenuti si evince la capacità delle proteasi batteriche di degradare i peptidi 1,2 e 3 derivanti dal frammento 56-88 dell' α -2 -gliadina. Infatti già alle 24 ore tutti i batteri analizzati per l'attività peptidasi hanno la capacità di degradare i peptidi portando alla formazione di frammenti peptidici di più piccole dimensioni.

Alle 48 ore alcuni peptidi sono stati completamente degradati.

Lo studio è stato condotto con l'ausilio del server EXPASY PROTEOMIC (Peptide Mass), il quale ha permesso di calcolare la massa molecolare dei peptidi, simulando i tagli nei singoli aminoacidi sia partendo dalla porzione C-Terminale che da quelle N-Terminale della sequenza aminoacidica.

Sulla base dei pesi molecolari ottenuti è stato possibile identificare negli spettri, i peptidi (cerchiati di rosso), derivati dalla digestione enzimatica e riportati nelle Tab. 9-11.

CEPPI	Sito di taglio del Peptide 1- LQLQPFQPQLPYPQP
<i>L. plantarum</i> pcc 1092, <i>L. sanfranciscensis</i> pcc 1879	LQLQPFQPQLPYP - QP
<i>L. plantarum</i> pcc 1092	LQL - QPFQPQLPYPQP
<i>L. plantarum</i> pcc 1090, <i>L. pentosus</i> pcc 861, <i>L. plantarum</i> WCFS1, <i>L. sanfranciscensis</i> pcc 1879, <i>L. plantarum</i> pcc 1092	LQLQP - FPQPQLPYPQP
<i>L. plantarum</i> pcc 1090, <i>L. plantarum</i> pcc 1092	LQLQPF - PQPQLPYPQP
<i>L. plantarum</i> pcc 1092, <i>L. sanfranciscensis</i> pcc 1879	LQLQPFQP - QLPYPQP

Tab. 9. Siti di taglio dei peptidi derivati dalla digestione enzimatica del Peptide1 (LQLQPFQPQLPYPQP) da parte di *L. plantarum* pcc 1090, *L. plantarum* pcc 1092, *L. pentosus* pcc 861, *L. sanfranciscensis* pcc 1879, *L. plantarum* WCFS1

CEPPI	Sito di taglio del Peptide 2- QLPYPQPQLPYPQPQPF
<i>L. plantarum</i> pcc 1090, <i>L. pentosus</i> pcc 861, <i>L. plantarum</i> WCFS1, <i>L. sanfranciscensis</i> pcc 1879	Q -LPYPQPQLPYPQPQPF
<i>L. pentosus</i> pcc 861	QLP - YPQPQLPYPQPQPF
<i>L. pentosu</i> pcc 861, <i>L. plantarum</i> WCFS1	QLPY - PQPQLPYPQPQPF
<i>L. plantarum</i> pcc 1090, <i>L. pentosus</i> pcc 861, <i>L. plantarum</i> WCFS1	QLPYP - QPQLPYPQPQPF
<i>L. pentosus</i> pcc 861, <i>L. plantarum</i> wcfsl	QLPYP - QPQLPYPQPQPF
<i>L. plantarum</i> pcc 1090, <i>L. pentosus</i> pcc 861, <i>L. plantarum</i> WCFS1, <i>L. sanfranciscensis</i> pcc 1879	QLPYPQPQ - LPYPQPQPF
<i>L. pentosus</i> pcc 861	QL - PYPQPQLPYPQPQPF
<i>L. pentosus</i> pcc 861, <i>L. plantarum</i> WCFS1	QLPYPQPQLPYP - QPQPF

Tab. 10. Siti di taglio dei peptidi derivati dalla digestione enzimatica del Peptide 2 (QLPYPQPQLPYPQPQPF) da parte di *L.plantarum* pcc 1090, *L. plantarum* pcc 1092, *L. pentosus* pcc 861, *L. sanfranciscensis* pcc 1879, *L.plantarum* WCFS1

CEPPI	Sito di taglio del Peptide 3- PQLPYPQPQLPYPQPQ
<i>L. plantarum</i> pcc 1092	PQLPYPQPQLPYPQP - Q
<i>L. plantarum</i> pcc 1090, <i>L. pentosus</i> pcc 861, <i>L. sanfranciscensis</i> pcc 1879 <i>L. plantarum</i> pcc 1092	PQLPYPQPQLPYPQ - PQ
<i>L. plantarum</i> pcc 1092	PQLPYPQPQLPYP - QPQ
<i>L. plantarum</i> pcc 1092, <i>L. plantarum</i> pcc 1090, <i>L. pentosus</i> pcc 861, <i>L. sanfranciscensis</i> pcc 1879	PQ - LPYPQPQLPYPQPQ
<i>L. pentosus</i> pcc 861, <i>L. plantarum</i> pcc 1092	PQLP - YPQPQLPYPQPQ
<i>L. pentosus</i> pcc 861	PQLPYP - QPQLPYPQPQ
<i>L. plantarum</i> pcc 1092	PQLPYPQ - PQLPYPQPQ
<i>L. plantarum</i> pcc 1092	PQLPYPQPQ - LPYPQPQ

Tab. 11 Siti di taglio dei peptidi derivati dalla digestione enzimatica del Peptide 3 (PQLPYPQPQLPYPQPQ) da parte di *L.plantarum* pcc 1090, *L. plantarum* pcc 1092, *L. pentosus* pcc 861, *L. sanfranciscensis* pcc 1879, *L.plantarum* WCFS1

Appare chiaro che i batteri lattici analizzati per l'attività peptidasica hanno delle proteasi attive che agiscono degradando i peptidi 1, 2 e 3 e portando alla formazione di frammenti di più piccole dimensioni.

Questo dato è molto importante perché ha permesso di confermare come i batteri lattici riescono a degradare sia la gliadina completa che alcuni suoi peptidi tossici.

Un importante dato riportato nelle Tabb. 9-11 riguarda la specificità dell'azione delle proteasi, identificata nei differenti siti di taglio tra gli aminoacidi.

Sulla base dei siti di taglio è stata condotta un'analisi in silico utilizzando i server informatici ExPASy proteomic server, Brenda, NCBI. Tale analisi ha permesso, grazie anche ai dati presenti in bibliografia (Sasaki *et al.* 1995, Christensen J.E. *et al.* 1999, 2003) di associare ad ogni sito di taglio l'enzima specifico come mostrato in Tab. 12.

I batteri lattici vivono in ambienti ricchi di proteine per cui sono dotati di un corredo enzimatico adatto allo sfruttamento di differenti fonti azotate. Inoltre possiedono un sistema di *uptake* che consente ai peptidi di penetrare all'interno della cellula ed essere successivamente degradati dalle peptidasi intracellulari.

Enzima	Sigla	Sito di Taglio
TRIPLEPTIDASE	Pep T	P/Q
ENDOPEPTIDASE	Pep O	L/Q
ENDOPEPTIDASE	Pep F	P/F
X-PROLYL DIPEPTIDYL AMINOPEPTIDASE	Pep X	F/P
PROLINASE	Pep R	Q/L
PROLIDASE O ENDOPEPTIDASE	PepQ o Pep F	P/Y
X-PROLYL DIPEPTIDYL AMINOPEPTIDASE	Pep X	Y/P
PRO-IMINOPEPTIDASE	Pep I	Q/P
PROLIDASE	Pep Q o Pep N	L/P

Tab. 12. Identificazione delle proteasi mediante analisi in silico

Caratterizzazione delle proteasi dei batteri lattici mediante substrati enzimatici

Per confermare il risultato ottenuto dall'analisi in silico sono stati fatti dei saggi enzimatici utilizzando i seguenti substrati:

- per l'attività aminopeptidasica e iminopeptidasica sono stati usati i substrati Leu- ρ Na, Pro- ρ Na,
- per l'attività di- e tri- peptidasica sono stati usati i substrati Leu-Leu-Leu, Val-Pro, Val-Leu, Leu-Leu, Pro-Gly
- per l'attività dipeptidil-peptidasica sono stati usati i substrati Z-Gly-Gly-Leu- ρ Na, Gly-Pro- ρ Na.

I valori ottenuti dalle misure delle assorbanze a 410 nm per i substrati Z-Gly-Gly-Leu- ρ Na, Gly-Pro- ρ Na, Leu- ρ Na, Pro- ρ Na , e 570 nm per i substrati Leu-Leu-Leu, Val-Pro, Val-Leu, Leu-Leu, Pro-Gly, sono stati espressi come unità per milligrammo di proteina.

Tale valore è stato attribuito considerando una unità di attività enzimatica come la quantità di enzima che ha prodotto un aumento di assorbanza a 410 nm o 570 nm, di 0,01 unità di enzima al minuto (Gobbetti M. *et al.*, 1996, Gerez C.L. *et al.*, 2008). I risultati sono riportati nelle Tabb. 13-15.

Per l'analisi enzimatica sono state scelte le cellule dei ceppi di *L. plantarum* pcc 1090, *L. plantarum* WCFS1 e *L. sanfranciscensis* pcc 1879.

Tempo di incubazione	Attività dipeptidil-peptidasica			
	Z-Gly-Gly-Leu- ρ Na		Gly-Pro- ρ Na	
	20 minuti	2 ore	20 minuti	2 ore
<i>L.plantarum</i> pcc 1090	50	231	177	95
<i>L.plantarum</i> WCFS1	73	170	340	161
<i>L. sanfranciscensis</i> pcc1879	48	230	170	227

Tab. 13. Attività enzimatica espressa in unità/mg di proteina

Tempo di incubazione	Attività aminopeptidasica e iminopeptidasica			
	Leu-pNa		Pro-pNa	
	30 minuti	2 ore	30 minuti	2 ore
<i>L.plantarum</i> pcc 1090	240	200	5	2
<i>L.plantarum</i> WCFS1	254	184	5	2,5
<i>L. sanfranciscensis</i> pcc 1879	352	213	21	7,2

Tab. 14. Attività enzimatica espressa in unità/mg di proteina

Tempo di incubazione	Attività di- e tri- peptidasica					
	Leu-Leu-Leu	Val-Pro	Val-Leu	Leu-Leu	Pro-Gly	Gly-Pro-Ala
	2 ore	2 ore	2 ore	2 ore	2 ore	2 Ore
<i>L.plantarum</i> pcc 1090	320	90	260	220	150	100
<i>L.plantarum</i> WCFS1	320	142	250	310	120	110
<i>L. sanfranciscensis</i> pcc 1879	300	137	250	240	120	110

Tab. 15. Attività enzimatica espressa in unità/mg di proteina

Lo stesso esperimento è stato eseguito utilizzando però l'estratto cellulare del *L. plantarum* pcc 1090. L'attività è stata rilevata ad un solo tempo d'incubazione nei diversi substrati. I dati ottenuti sono riportati nella Tab. 16-18.

Tempo d'incubazione	Attività dipeptidil-peptidasica	
	Z-Gly-Gly-Leu-pNa	Gly-Pro-pNa
	20 minuti	20 minuti
<i>L.plantarum</i> pcc 1090	3,2	12,6

Tab. 16. Attività enzimatica espressa in unità/mg di proteina

Tempo d'incubazione	Attività aminopeptidasica e iminopeptidasica	
	Leu-pNa	Pro-pNa
	30 minuti	30 minuti
<i>L.plantarum</i> pcc 1090	2,4	3

Tab. 17. Attività enzimatica espressa in unità/mg di proteina

Tempo di incubazione	Attività di- e tri- peptidasica					
	Leu-Leu-Leu	Val-Pro	Val-Leu	Leu-Leu	Pro-Gly	Gly-Pro-Ala
2 ore	2 ore	2 ore	2 ore	2 ore	2 ore	2 Ore
<i>L.plantarum</i> pcc 1090	336	52,8	554	88	66	70

Tab. 18. Attività enzimatica espressa in unità/mg di proteina

I risultati ottenuti sono in accordo con le precedenti osservazioni, il livello relativamente alto delle attività sopra descritte, sia utilizzando le cellule batteriche sia utilizzando l'estratto cellulare ottenuto dopo trattamento con l'omogenizzatore Emulsi-Flex C5 , anche se con differenze nel risultato dell'attività enzimatica nei diversi substrati, ci ha permesso di confermare l'efficiente sistema proteolitico dei batteri lattici che coinvolge, aminopeptidasi, X-prolyl-dipeptidil aminopeptidasi, endopeptidasi-proteinasi, dipeptidasi, tripeptidasi, proline iminopeptidasi e carbossipeptidasi. La minore attività manifestata dal risultato ottenuto utilizzando l' estratto cellulare, può essere attribuito alla difficoltà di estrarre una quantità nota di enzimi attraverso le metodologie meccaniche.

Alla luce dei risultati ottenuti, si potrebbe proporre di isolare singolarmente, purificandoli e caratterizzandoli, i vari enzimi dei batteri lattici responsabili della proteolisi della gliadina.

Valutare, quindi, l'azione, sia singola che in sinergia, dei diversi enzimi nei confronti dei diversi peptidi tossici compreso il 33-mer, con l'obiettivo di individuare quali tra gli enzimi sono quelli direttamente interessati alla loro degradazione.

A questo punto dello studio, (con la collaborazione di biochimici, clinici, immunologi, ecc.), si potrebbe ipotizzare l' utilizzo degli enzimi direttamente nei pazienti celiaci.

CONCLUSIONI

Autore: D.ssa Mariangela Stefania Fiori

Titolo: Ruolo delle Peptidasi dei LAB nell'Idrolisi delle Gliadine Antigeniche e di Peptidi derivati dal 33-mer.

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

In Sardegna, così come in tutto il Mediterraneo, il pane è stato per secoli un alimento base. Le paste acide hanno costituito, e in alcune produzioni artigianali continuano a costituire, lo starter utilizzato nei processi di panificazione, senza che per lungo tempo fossero noti la presenza e il ruolo svolto dai microrganismi.

Le paste acide costituiscono un complesso ecosistema formato da diversi microrganismi, sia lieviti (*S. cerevisiae*, *S. exiguus*, *Torulaspota delbrueckii*, *Candida* sp., ecc.) che batteri lattici omo ed eterofermentanti (*L. plantarum*, *L. brevis*, *L. sanfranciscensis*, *L. pentosus*, ecc.). In particolare, il ruolo dei lieviti è essenziale per il processo di lievitazione; grazie alla fermentazione alcolica, infatti, si ha la produzione di anidride carbonica; d'altra parte i batteri lattici sembrerebbero importanti per le caratteristiche strutturali e sensoriali del prodotto finito, probabilmente dovute sia all'abbassamento del pH, in seguito alla produzione di acido lattico, che ai prodotti secondari del metabolismo batterico.

Le differenti specie presenti nella pasta acida e le relazioni che intervengono a regolare il loro sviluppo e le loro funzioni, possono influire in modo determinante sulla qualità del prodotto, giustificando, almeno in parte, le peculiari caratteristiche sensoriali e nutrizionali che spesso accompagnano i prodotti ottenuti da paste acide differenti.

Lo scopo di questa tesi di dottorato è stato quello di verificare se i batteri lattici, isolati da paste acide della Sardegna, fossero in grado di idrolizzare sia la gliadina che i peptidi della gliadina coinvolti nella patogenesi della malattia celiaca.

La celiachia è definibile come uno stato infiammatorio della mucosa del piccolo intestino (più marcato a livello prossimale) che si sviluppa in soggetti geneticamente predisposti in seguito all'ingestione di una proteina costituente del frumento, la gliadina, e di proteine ad essa correlate (dette prolamine) presenti anche in altri cereali quali orzo e segale, tanto che generalmente ci si riferisce a questa patologia come ad un'enteropatia glutine dipendente.

La malattia è il risultato di complesse interazioni tra fattori intrinseci (genetici) e fattori estrinseci (ambientali) responsabili del danno flogistico alla mucosa intestinale che porta ad ipertrofia delle cripte, fino a raggiungere un grado estremo che si presenta con l'atrofia totale dei villi

La grande sfida nel campo della ricerca scientifica sulla malattia celiaca è tutta incentrata sulla identificazione di una terapia alternativa ad una dieta priva di glutine.

Sono già presenti in letteratura alcuni studi che attribuiscono molta attenzione al ruolo cardine di un particolare gruppo di batteri, i lattobacilli, ed un loro utilizzo come starter in impasti fatti in modo tradizionale (acqua farina e sale), per la produzione dei prodotti da forno, in particolare per la produzione del pane.

Tale importanza è dovuta alla capacità dei batteri lattici di degradare i peptidi tossici della gliadina. In un primo tempo l'effetto proteolitico dei batteri lattici era stato attribuito alla presenza di enzimi proteolitici quali aminopeptidasi e carbossi-peptidasi provenienti per lo più da farine. Solo successivamente è stato riconosciuto l'effetto predominante delle proteasi di origine batterica.

Infatti nella prima fase del lavoro dopo un'accurata ricerca bibliografica, il nostro studio ha confermato che il livello della proteolisi riscontrata in impasti fermentati da batteri lattici è maggiore rispetto a paste acide non fermentate o a quelle fermentate da soli lieviti, dove non si riscontra nessuna attività proteolitica. Gli enzimi proteolitici batterici contribuiscono ad idrolizzare i peptidi immunotossici degradandoli a livello dei singoli aminoacidi. I batteri lattici vivono in ambienti ricchi di proteine per cui sono dotati di un corredo enzimatico adatto allo sfruttamento di differenti fonti azotate. Inoltre possiedono un sistema di *uptake* che consente ai peptidi di penetrare all'interno della cellula ed essere successivamente degradati dalle peptidasi intracellulari.

Nel presente studio è stata valutata la capacità dei batteri lattici di degradare la gliadina sia inoculando i lattobacilli in impasto sia mettendo a contatto direttamente le peptidasi batteriche con i peptidi tossici della gliadina. Lo studio è stato organizzato in diverse fasi :

Nella prima fase sono stati inoculati i lattobacilli direttamente in impasto ed è stato monitorato l'andamento dell'attività proteolitica nel tempo, alle 24, 48 e 72 ore di fermentazione, utilizzando come controlli due impasti costituiti, il primo, inoculando lievito commerciale di *Saccharomyces cerevisiae* e il secondo un impasto di soli farina e acqua.

Ad ogni tempo di fermentazione sono state estratte le gliadine e misurato il pH. Le α -, β -, γ - e ω -gliadine estratte sono state separate sulla base del loro peso molecolare mediante analisi elettroforetica in Tricina SDS-Page e A-Page, confermando la capacità delle proteasi batteriche di degradare quasi completamente la gliadina.

Nella seconda fase di lavoro è stata valutata l'azione delle proteasi batteriche direttamente sui i peptidi tossici della gliadina.

Tra i peptidi tossici è stato scelto di utilizzare il 33-mer, frammento 56-88 dell' α 2-gliadina noto per essere il più immunogenico e quindi il più tossico per i pazienti celiaci. Sulla base della sequenza aminoacidica del frammento 56-88 dell' α 2-gliadina sono stati disegnati 3 peptidi, Peptide 1 corrispondente alla frazione 56-71 dell' α 2-gliadina, Peptide 2 corrispondente alla frazione 72-88 dell' α 2-gliadina e Peptide 3 corrispondente alla frazione 64-79 dell' α 2-gliadina. I tre Peptidi così disegnati sono stati sintetizzati dalla Sigma Genosis di Milano e sottoposti all'azione delle proteasi batteriche contenute nell'estratto cellulare di diversi lattobacilli, ottenuto dopo trattamento con l'Omogenizzatore Emulsi-Flex C5. Il prodotto della digestione dopo 24 e 48 ore di incubazione è stato analizzato in spettrometria di massa.

I risultati degli spettri di massa ottenuti sono stati sottoposti ad elaborazione mediante analisi in silico, la quale ci ha permesso di confermare la capacità delle proteasi dei lattobacilli di degradare i peptidi 1, 2, e 3.

Tutti i batteri analizzati hanno la capacità di degradare i peptidi portando alla formazione di frammenti peptidici di più piccole dimensioni. Alle 48 ore alcuni peptidi sono stati completamente degradati.

Nella fase finale è stato possibile associare a ciascun sito di taglio l'enzima specifico, sia attraverso analisi in silico sia attraverso l'ausilio dei saggi enzimatici.

I risultati ottenuti hanno permesso di confermare l'efficiente sistema proteolitico dei batteri lattici che coinvolge, aminopeptidasi, X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidasi, endopeptidasi-proteinasi, dipeptidasi, tripeptidasi, proline iminopeptidasi e carbossipeptidasi.

Alla luce dei risultati ottenuti, si potrebbe proporre di isolare singolarmente, purificandoli e caratterizzandoli, i vari enzimi dei batteri lattici responsabili della proteolisi della gliadina.

Valutare, quindi, l'azione, sia singola che in sinergia, dei diversi enzimi nei confronti dei diversi peptidi tossici compreso il 33-mer, con l'obiettivo di individuare quali tra gli enzimi sono quelli direttamente interessati alla loro degradazione.

A questo punto dello studio, (con la collaborazione di biochimici, clinici, immunologi, ecc.), si potrebbe ipotizzare l' utilizzo degli enzimi direttamente nei pazienti celiaci.

BIBLIOGRAFIA

*Autore: Dr.ssa Mariangela Stefania Fiori
Titolo: Ruolo delle Peptidasi dei LAB nell'Idrolisi delle Gliadine Antigeniche e di Peptidi derivati dal 33-mer.
Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari
Università degli Studi di Sassari*

- Acerini C.L., Ahmed M.L., Ross K.M., (1998). Celiac disease in children and adolescents with IDDM: clinical characteristics and response to gluten-free diet. *Diabetic Medicine*, **15**, 38-44.
- Anderson R.P., Degano P., Godkin A.J., Jewell D.P. and Hill A.V.S. (2000). In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nature Medicine*, **6**, 337-342.
- Anderson R.P., van Heel D.A., Tye-Din J.A., Barnardo M., Salio M., Jewell D.P. and Hill A.V.S. (2007) T cells in peripheral blood after gluten challenge in coeliac disease. *Gut*, **54**, 1217-1223.
- Arendt E. K., Ryan L. A. M., Dal Bello F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, **24**, 165–174.
- Arentz-Hansen H., Fleckenstein B., Molberg O., Scott H., Koning F., Jung G., Roepstorff P., Lunidin K.E., Sollid L.M. (2004). The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Medicine*, **1**, e1
- Arentz-Hansen H., McAdam S.N., Molberg O., Fleckenstein B., Lundin K.E., Jorgensen T.J., Jung G., Roepstorff P., Sollid L.M. (2002). Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*, **123**, 803-809.
- Arentz-Hansen, H., Korner R., Molberg O., Quarsten H., Vader W., Kooy Y.M., Lunidin K.E., Koning F., Roepstorff P., Sollid L.M., McAdam S.N. (2000). The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J. of Exp. Medicine*, **191**, 603-612.
- Auricchio S, Greco L, Troncone R. (1988).Gluten-sensitive enteropathy in childhood. *Pediatric.Clinical.North America*, **35**, 157-187.
- Auricchio S. (1997). Gluten sensivity and neurological illness. *Journal of Pediatric Gastroenterol and Nutrition*, **25**, S7-S8.
- Auricchio S., Barone M.V., Troncone R. (2004). Dietary proteins and mechanisms of gastrointestinal diseases: gliadin as a model. *J. Pediatr Gastroenterol Nutrition*, **39**, 738-739.

Autore:Dr.ssa Mariangela Stefania Fiori

Titolo: Ruolo delle Peptidasi dei LAB nell'Idrolisi delle Gliadine Antigeniche e di Peptidi derivati dal 33-mer.

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

- Axelsson L., Salminen S., von Wright A. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In *Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc.*, 1-65.
- Barera G., Bianchi C., Calisti L., (1991). Screening of diabetic children for coeliac disease with antigliadin antibodies and HLA typing. *Archive of Disease in Childhood*, **66**, 491-494.
- Bateman E.A., Ferry B.L., Hall A., Misbah S.A., Anderson R., Kelleher P. (2004). IgA antibodies of coeliac disease patients recognise a dominant T cell epitope of A-gliadin. *Gut*, **53**, 1274-1278.
- Beißbarth T., Tye-Din J.A., Smyth G., Speed T.P., and Anderson R.P. (2005). A systematic approach for comprehensive T-cell epitope discovery using peptide libraries. *Bioinformatics*, **21**, 29-37.
- Berti I., Horvath K., Green P.H.R., (2000). Prevalence of celiac disease among risk groups and the general population in U.S.A. *J. of Medical Investigation*, **48**, 206-220.
- Bertini M, Capelli P, Chilosi M, Valletta E, (2000). La celiachia. *Dialogo sui farmaci*; **3**, 212-222
- Blatter R.H., Jacomet S., Schlumbaum A. (2004). About the origin of European spelt (*Triticum spelta* L.): allelic differentiation of the HMW Glutenin B1-1 and A1-2 subunit genes. *Theor. and Applied Gen.*, **108**, 360-367.
- Boraam F., Faid M., Larpent J. P., Breton A. (1993). Lactic acid bacteria and yeast associated with traditional moroccan sous dough bread fermentation. *Sci. Alimentis*, **13**, 501-509.
- Boskov-Hansen H., Andersen M. F., Nielsen L. M., Back-Knudsen K.E., Meyer A. S., Christensen L. P., Hansen A. (2002). Changes in dietary fibre, phenolic acids and activity of endogenous enzymes during rye bread making. *Eur. of Food Res. and Tech.*, **214**, 33–42.
- Bradford M.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**, 248–254.
- Brusco G, Biagi F, Di Stefano M, (1999). Celiachia dell’adulto. *Aggiornamento medico*, **23**, 81-93.

- Buonocore F. (1996). Purification and characterisation of high Mr glutenin subunit 20 and its linked γ -type subunit from durum wheat. *J. of Cereal Science*, **23**, 195-201.
- Cataldo F., Marino V., Ventura A., Bottaro G., Corazza G.R. (1998). Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in celiac disease: an italian multicentre study. Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) and "Club del Tenue working groups on coeliac disease". *Gut*, **42**, 362-365.
- Cerf-Bensussan N., Cellier C., Heyman M. (2003). Coeliac disease: an update on facts and questions Based on the 10th International Symposium on Coeliac Disease. *J. of Ped. Gastr. and Nut.*, **37**, 412-421.
- Chen J., Lan P., Tarr A., Yan Y.M., Francki M., Appels R., Ma W. (2007). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight based wheat gliadin protein peaks are useful molecular markers for wheat genetic study. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **21**, 2913-2917.
- Chen Yo-Shen, Christensen J.E, Broadbent J.R., Steele J.L. (2003). Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, an Endopeptidase with post-proline specificity. *App. and Envir. Microbiol.*, **69**, 1276-1282.
- Christensen J. E., Lin D., Palva A., Steele J. L. (1995): Sequence analysis, distribution and expression of an aminopeptidase N-encoding gene from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Gene* **155**, 89-93.
- Christensen J.E., Broadbent J.R., Steele J.L. (2002). Hydrolysis of Casein-Derived Peptides α_{s1} - Casein (f1-9) and β -casein (f193-209) by *Lactobacillus helveticus* peptidase deletion mutants indicates the presence of a previously undetected endopeptidase. *App. and Envir. Microbiol.*, **69**, 1283-1286.
- Christensen J.E., Dudley E.G., Pederson J.A., Steele J.L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **76**, 217-246.
- Ciacci C., Cirillo M., Auriemma G., Di Dato G., Sabbatini F., Mazzacca G., (1996). Celiac disease and pregnancy outcome. *American J. Gastr.*, **91**, 718-722.

- Ciccocioppo R., Di Sabatino A., Ara C., Biagi F., Perilli M., Amicosante G., Cifone M.G., Corazza G.R. (2003). Gliadin and tissue transglutaminase complexes in normal and coeliac duodenal mucosa. *Clin. and Exper. Immunol.*, **134**, 516-524.
- Ciccocioppo R., Di Sabatino A., Corazza G.R. (2005). The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin. and Exper. Immunol.*, **140**, 408-416.
- Cornell H., Wieser H., Belitz H.D. (1992). Characterization of the gliadin-derived peptides which are biologically active in coeliac disease. *Clinica Chimica Acta, International J. of Chim. Chemistry*, **213**, 37-50.
- Cronin C.C., Shanahan F. (1997). Insulin-dependent diabetes mellitus and celiac disease. *Lancet*, **349**, 1096-1097.
- Cummings J., Frolich W. (1993). Food technology, dietary intake in Europe a survey of the Cost 92 concerted action on 'metabolic and physiological aspects of dietary fibre in food' commission of the European communities. DG XII, B-1049 *Rue de la Loi, Brussels*, **200**, 11-19.
- D'ovidio R., Masci S. (2003). The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *J. of Cer. Science*, **39**, 321-339.
- Dako E., El Soda M., Vuilleumard J.-C., Simard R. E (1995). Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria. *Food Research Intern.*, **28**, 503-509.
- De Angelis M, Di Cagno R, Gallo G., Curci M., Siragusa S., Crecchio C., Parente E., Gobbetti M. (2007). Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdough. *Intern. J. of Food Microbiol.*, **114**, 69-82.
- De Angelis M., Gallo G., Corbo M.R., McSweeney P.L.H., Faccia M., Giovine M., Gobbetti M. (2003). Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Intern. J. of Food Microbiol.*, **87**, 259-270.
- De Angelis M., Mariotti L., Rossi J., Servili M., Fox P.F., Rollan G., Gobbetti M. (2002). Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of the Arginine Deiminase Pathways Enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *App. and Env. Microbiol.*, **68**, 6193-6201.

Autore: Dr.ssa Mariangela Stefania Fiori

Titolo: Ruolo delle Peptidasi dei LAB nell'Idrolisi delle Gliadine Antigeniche e di Peptidi derivati dal 33-mer.

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

- De Angelis M., Rizzello C. G., Fasano A., Clemente M. G., De Simone C., Silano M. et al. (2006b). VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue. *Bioch. and Biophys. Acta*, **1762**, 80–93.
- De Angelis M., Rizzello C.G., Scala E., De Simone C., Farris G.A., Turrini F., Gobbetti M. (2007). Probiotic preparation has the capacity to hydrolyze proteins responsible for Wheat allergy. *J. of Food protec.*, **70**, 135-144.
- De Vuyst L., Neysens P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science e Tech.*, **16**, 43-56.
- De Vuyst L., Vancanneyt M. (2007). Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiol.*, **24**, 120-127.
- Desmazeaud M.J., de Roissart H. Luquet F.M. (1994) Mètabolisme gènèral des bactèries lactiques. in: de *Bactéries Lactiques. Ed. Lorica*, **4**, 169-205.
- Detmers F.J.M., Kunji E.R.S., Lanfermeijer F.C., Poolman B., and Donings W.N. (1998). Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry*, **37**, 16671-16679.
- Devos K.M., Gale M.D., (2000). Genome relationships: the grass model in current research. *Plant Cell*, **12**, 637-646.
- Dewar D.H., Amato M., Ellis J.H., Pollock E. L.,Gonzales-Cinca N., Weiser H., Ciclitira P.J.(2006). The toxicity of high molecular weight glutenin subunit of wheat to patients with celiac disease. *Europ. J. Gastr. Hepat.*,**18**, 483-491.
- Di Cagno R., De Angelis M., Alfonsi G., De Vincenzi M., Silano M., Vincentini O., Gobbetti M. (2005). Pasta made from durum wheat semolina fermented with selected Lactobacilli as a tool for a potential decrease of the gluten intolerance. *J. of agric. and food bioch.*, **53**, 4393-4402.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Auricchio, S., Greco, L., Clarke, C., De Vincenzi, M., et al. (2004). Sourdough bread made from wheat and non toxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. *App. and Env. Microbiol.*, **70**(2): 1088–1096.
- Dieterich W. (1998). A significant step in the celiac puzzle. *Gastroenterology*, **114**, 1339-1340.

- Dieterich W., Ehnis T., Bauer M., Donner P., Volta U., Riecken E.O., Schuppan D. (1997). Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat. Med.*, **3**, 797-801.
- D'Ovidio R. (2004). The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *J. of Cereal Science*, **39**, 321-339.
- Elke S., Franka K., Ulrich S., Thomas R., Martin S., Karsten C., Klaus-P. Z., Thomas M. (2004). Serologic assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. *Clinical Chemistry*, **50**, 2370-2375.
- Elli L., Dolfini E., Bardella M.T. (2003). Gliadin cytotoxicity and in vitro cell cultures. *Toxicol Letters*, **146**, 1-8.
- Ellis H.J., Pollock E.L., Engel W., Fraser J.S., Rosen-Bronson Wieser H., Ciclitira P.J. (2003). Investigation of the putative immunodominant T cell epitopes in coeliac disease. *Gut*, **52**, 212-217.
- En-Ong S., Mann M. (2005). Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem.Biol.* **5**, 252-262.
- Fabiani E, Catassi C, Villari A, Gismondi P, Pierdomenico R., Ratsch I.M., Coppa G.V., Giorgi P.I. (1996). Dietary compliance in screening-detected coeliac disease adolescents. *Acta Paediatrica Supplement*, **412**, 65-67.
- Fadda S., Vignolo G., Aristoy M.C., Oliver G., Toldra F. (2001). Effect of curing conditions and *Lactobacillus casei* CRL 705 on the hydrolysis of meat proteins. *J. Appl.of Microbiol.*, **91**, 478-487.
- Fasano A. (2001). Celiac disease: the past, the present, the future. *Pediatrics*, **107**, 768-770.
- Fasano A., Catassi C. (2001) Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolvine spectrum. *Gastroenterology*, **120**, 636-651.
- Fasano A., Not T., Wang W., Uzzau S., Berti I. (2000). Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in celiac disease. *Lancet*; **358**, 1518-1519.
- Fasano, A. (2001). Intestinal zonulin: open sesame! *Gut*, **49**, 159-162.
- Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S, (1993). Clinical and pathological spectrum of coeliac disease active, silent, latent, potential. *Gut*; **34**, 150-151.

Autore: Dr.ssa Mariangela Stefania Fiori

Titolo: Ruolo delle Peptidasi dei LAB nell'Idrolisi delle Gliadine Antigeniche e di Peptidi derivati dal 33-mer.

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

- Ferrante P., Masci S., D'Ovidio R., Lafiandra D., Volpi C., Mattei B. (2006). A proteomic approach to verify in vivo expression of a novel gamma-gliadin containing an extra cysteine residue. *Proteomics*, **6**, 1908-1914.
- Ferranti P., Mamone G., Picariello G., Addeo F. (2007). Mass spectrometry analysis of gliadins in celiac disease. *J- of Mass Spectrometry*, **42**, 1531-1548.
- Field J.M., Tatham A.S., Shewry P.R. (1987). The structure of a high-Mr subunit of durum-wheat (*Triticum durum*) gluten. *Biochem Journal*, **247**, 215-221.
- Fleckenstein B., Molberg O., Qiao Shuo-Wang, Schmid D.G., von der Mulbe F., Elgstøen K., Jung G., and Sollid L.M. (2002). Gliadin T cell epitope selection by tissue transglutaminase in Celiac Disease. Role of enzyme specificity and pH influence on the transamidation versus deamidation. *The J. of Biol. Chem.* **277**, 34109-34116.
- Fleckenstein B., Qiao S.W., Larsen M.R., Jung G., Roepstorff P. and Sollid L.M. (2004). Molecular characterization of covalent complexes between tissue transglutaminase and gliadin peptides. *The J. of Biol. Chem*, **279**, 17607-17616.
- Fornaroli F., Drago S., Di Pierro M.R., Catassi C., Fasano A. (2003). Celiac Disease : a world in exploration. *Minerva Pediatric*, **55**, 23-31.
- Foschino R., Arrigoni C., Picozzi C., Mora D., Galli A. (2001). Phenotypic and genotypic aspects of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdough in Italy. *Food Microbiol.* **18**, 277-285.
- Foschino R., Galli A. (1997). Italian style of life: pane, amore e ... lievito naturale! *Tecnologie alimentari.* **1**, 42-59.
- Foschino R., Venturelli E., Picozzi C. (2005). Isolation and characterization of a virulent *Lactobacillus sanfranciscensis* Bacteriophage and its impact on microbial population in sourdough. *Springer Science.*, **51**, 413-418.
- Foucaud C., Kunji E.R.S., Hagting A., Richard J., Konings W.N., Desmazeaud M., Poolman B. (1995). Specificity of Peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: Evidence for a third system which transports hydrophobic Di- and Tripeptides. *J. of Bacteriology*, **177**, 4652-4657.
- Francki M., Appels R. (2002). Wheat functional genomics and engineering crop improvement. *Genome Biol.*, **3**, Reviews1013.

- Fukushima T., Kitajima T., Yamaguchi H., Ouyang Q., Furuhashi K., Yamamoto H., Shida T., and Sekiguchi J. (2008). Identification and characterization of novel cell wall hydrolase CwIT. A two domain autolysin exhibiting N-Acetylmuramidase and dl-Endopeptidase activities. *The J. of Chem.*, **283**, 11117-11125.
- Galal A. M., Johnson A., Varriano E. Mastron (1978). Lactic and volatile organic acids of San Francisco sourdoughs French bread. *Cereal Chemistry*, **55**, 461-468.
- Gerez C.L., De Valdez G.F., Rollan G.C. (2008). Functionality of lactic acid bacteria peptidase activities in the hydrolysis of gliadin-like fragments. *Letters in App. Microbiol.*, **47**, 427-432.
- Gerez C.L., Rollan G.C., De Valdez G.F. (2006). Gluten breakdown by lactobacilli and pediococci strains isolated from sourdough. *Letters in App. Microbiol*, **42**, 459-464.
- Gianfrani C., Auricchio S., Troncone R. (2005). Adaptive and innate immune responses in celiac disease. *Immunol Lett*, **99**, 141-145.
- Gianibelli M.C., Larroque O.R., MacRitchie F., and Wrigley C.W. (2001). Biochemical, genetics and Molecular characterization of wheat endosperm proteins. *Amer. Assoc. of Cereal Chemists*. REVIEW.
- Giroux M.J. Morris C.F. (1998). Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *Proceedings of the Nat. Acad. of Sciences of U S A*, **95**, 6262-6266.
- Gobbetti M., Corsetti A., De Vincenzi S. (1995). The sourdoughs microflora. Characterization of heterofermentative lactic acid bacteria based on acidification kinetics and impedance test. *Ital. J. of Food Science*, **2**, 103-111.
- Gobbetti M., Corsetti A., Rossi J., La Rosa F., S. De Vincenzi. (1994). Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeast from wheat sourdoughs of central Italy. *Ital. J. of Food Science*, **1**, 85-94.
- Gobbetti M., De Angelis M, Di Cagno R, Minervini F, Limitone A. (2007). Cell-Cell communication in food related bacteria. *Int. J. of Food Microbiol.*, **120**, 34-45.

Autore: Dr.ssa Mariangela Stefania Fiori

Titolo: Ruolo delle Peptidasi dei LAB nell'Idrolisi delle Gliadine Antigeniche e di Peptidi derivati dal 33-mer.

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

- Gobbetti M., E. Smacchi, A. Corsetti. (1996). The proteolytic system of *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. Purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase and an aminopeptidase. *App. Env. Microbiol.*, **62**, 3220-3226.
- Gobbetti M., E. Smacchi, P. Fox, L. Stepaniak, A. Corsetti. (1996). The sourdough microflora. Cellular localization and characterization of proteolytic enzymes in lactic acid bacteria. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **29**, 561-569.
- Gobbetti M., M.S. Simonetti, J. Rossi, L. Cossignani, A. Corsetti, P. Damiani. (1994). Free D- and L-amino acid evolution during sourdough fermentation and baking. *J. of Food Science*, **59**, 881-884.
- Gobbetti M., Rizzello C.G., Di Cagno R., De Angelis M. (2007). Sourdough lactobacilli and celiac disease. *Food Microbiol.*, **24**, 187-196.
- Gobbetti M., Simonetti M.S., Corsetti A., Santinelli F, Rossi J., Damiani P. (1995) Volatile compound and organic acid productions by mixed wheat sour dough starters: influence of fermentation parameters and dynamics during baking. *Food Microbiol.*, **12**, 497-507.
- Gobbetti M., Smacchi E., Corsetti A. (1996). The Proteolytic system of *Lactobacillus Sanfrancisco* CB1: Purification and Characterization of a proteinase, a Dipeptidase, and an Aminopeptidase. *App. and Env. Microbiol.*, **62**, 3220-3226.
- Gobbi G., Bouquet F., Greco L., Lambertini A., Tassinari C.A., Ventura A., Zaniboni M.G.(1992). Celiac disease, epilepsy and cerebral calcifications. *Lancet*, **340**, 439-443.
- Godkin A., Jewell D. (1998). The pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology*, **115**, 206-210.
- Guandalini S. (2000). Celiac disease in the New World. *Journal of Pediatric Gastroenterology Nut.*, **31**, 362-364.
- Guédon E.; Renault S.; Ehrlich S. D., Delorme C. (2001): Transcriptional Pattern of Genes Coding for the Proteolytic System of *Lactococcus lactis* and Evidence for Coordinated Regulation of Key Enzymes by Peptide Supply. *J. of Bact.*, **183**, 3614-3622.

- Guillot A., Gitton C., Anglade P., Yves Mistou M. (2003). Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *Proteomics*, **3**, 337-354.
- Hausch F., Shan L., Santiago N. A., Gray G. M., Khosla C. (2003). Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am. J. of Physiology*, **283**, 996–1003.
- Helin H., Mustonen J., Regnala T., Pasternack A. (1983). IgA nephropaty associated with coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Arch Pathol Lab Med.*, **107**, 324-327.
- Hierro E., de la Hoz. L., Ordonez J.A. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **39**, 329-367.
- Hill I., Fasano A. (2000). The prevalence of celiac disease in at risk groups of children in the United States. *J. of Pediatric*, **1**, 86-90.
- Holmes G. (2002). Screening for coeliac disease in type 1 diabetes. *Arch Disease Child*, **87**, 495-499.
- Holtmeier W., Caspary W.F. (2006). Celiac disease. *Orphanet J Rare Dis*, **1**, 1-3 Review.
- Holzapfel W. H., Geisen R., Schillinger U. (1995) Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food grade enzymes. *Int. J. of Food Microbiol.*, **24**, 343-362.
- Kariluoto, S., Vahteristo, L., Salovaara, H., Katina, K., Liukkonen, K.-H., & Piironen, V. (2004). Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. *Cereal Chemistry*, **81**, 134–139.
- Kasarda DD, Okita T.W., Bernardin J.E., Baecker P.A., Nimmo C.C., Lew E.J., Dietler M.D., Greene F.C. (1984). Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences of alphas type gliadins from wheat (*Triticum aestivum*). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 4712-4716.
- Katina K., Arendt E., Liukkonen K. H, Autio K., Flandera L., Poutanen K. (2005). Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends Food Sci. Technol.*, **16**, 1-9.
- Kawaura K., Mochida K., Ogihara Y. (2005). Expression profile of two storage protein gene families in hexaploid wheat revealed by large-scale analysis of expressed sequence tags. *Plant Physiol.*, **139**, 1870-1880.

- Kim Chu-Young, Quarsten H., Bergseng E., Khosla C. and Sollid L.M: (2003). Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Immunology*, **101**, 4175-4179.
- Kleerezebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O.P., Leer R., Tarchini R., Peters S.A., Sandbrink H.M., Fiers M.W.E.J., Stiekema W., Klein Lankhorst R.M., Bron P.A., Hoffer S.M., Nierop Groot M.N., Kerkhoven R., de Vries M., Ursing B., de Vos W.M., Siezen R.J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *PNAS*, **100**, 1990-1995.
- Kline L., Sugihara T. (1971). Microorganisms of the San Francisco Sourdough bread process. *App. Microbiol.*, **21**, 459-465.
- Koistinen K.M., Plumed-Ferrer C., Lehesranta S.J., Karenlampi S.O., von Wright A. (2007). Comparison of growth-phase-dependent cytosolic proteomes of two *Lactobacillus plantarum* strains used in food and feed fermentations. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **273**. 12-21.
- Koletzko S, Burgin-Wolff A, *et al.* (1988). Prevalence of celiac disease in diabetic children and adolescents; a multicentre study. *Eur J Pediatr*; **148**, 113-117.
- Kolho KL, Farkkila MA, Savilahti E, (1998). Undiagnosed coeliac disease is common in Finish adults. *Scand J Gastroenterol*; **33**, 1280-1283.
- Krupicková S., Tucková L., Flegelová Z., Michalak M., Walters J.R., Whelan A., Harries J., Vencovský J., Tlaskalová-Hogenová H. (1999). Identification of common epitopes on gliadin, enterocytes, and calreticulin recognised by antigliadin antibodies of patients with coeliac disease. *Gut*; **44**, 168-173.
- Krutchinsky A.N., Kalkun M., Chait B.T. (2001). Automatic identification of proteins with a MALDI-quadrupole ion trap mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, **73**:5066-5077.
- Lionetti P, (2002). The enteropathy of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* (suppl); **34**, 18-21
- .

- Liukkonen K.-H., Katina K., Wilhelmson A., Myllymaki O., Lampi A.-M., Kariluoto S., Piironen V., Heinonen S.-M., Nurmi T., Adlercreutz H., Peltoketo A., Pihlava J.-M., Hietaniemi V., Poutanen K. (2003). "Process-induced changes on bioactive compounds in whole grain rye." *Proceed. of the Nutr. Society*, **62**, 117–122.
- Logan R.F.A. (1992). Problems and pitfalls in epidemiological studies of celiac disease. *Dyn nutr Res*, **2**, 14-24
- Londei M., Ciacci C., Ricciardelli I., Vacca L., Quarantino S. and Maiuri L. (2005). Gliadin as stimulator of innate responses in celiac disease. *Molecular Immunology*, **42**, 913-918.
- Lönner C. T., Welander N., Molin N., Dostalek M. (1986). The microflora in a sourdough started spontaneously on typical Swedish rye meal. *Food Microbiol.*, **3**, 3-12.
- Lues J. F. R., Viljoen B. C., Miller M., Prior B. A.. (1993). Interaction of non culture microbiol flora on dough fermentation. *Food Microbiol.*, **10**, 205-213.
- Luostarinen L., Pirttilä T., Collin P. (1999). Celiac disease presenting with neurological disorders. *Eur Neurol*: **42**, 132-135.
- Maki M, Collin P. (1997). Coeliac disease. *Lancet*, **349**, 1755-1759.
- Mamone G., Ferranti P., Rossi M., Roepstorff P., Fierro O., Malorni A., Addeo F. (2007). Identification of a peptide from alpha-gliadin resistant to digestive enzymes: Implications for celiac disease. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **855**. 236-241.
- Manso M.A., Leonil J., Piot M., Gagnaire V. (2005). Isolation and characterisation of a *Lactobacillus helveticus* ITG LH1 peptidase-rich sub-proteome. *Int. J. of Food Microbiol.*, **105**, 119-129.
- Marcone M. (1998). Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants. Isolation/purification and characterization. *Food Chemistry*, **26**, 27-47.
- Marti T., Molberg O., Li Q., Gray G.M., Khosla C., Sollid L.M. (2005). Prolyl endopeptidase-mediated destruction of T Cell Epitopes in whole gluten: Chemical and immunological characterization. *J Pharmacol Exp Ther.*, **312**, 19-26.

- Martinez Ma del Carmen, Ruiz M., Carrillo J.M. (2004). New B low M_r Glutenin subunit alleles at the Glu-A3, Glu-B2 and Glu-B3 loci and their relationship with gluten strength in durum wheat. *J. of Cereal Science*, **40**, 101-107.
- Matysiak-Budnik, T., Candalh C., Dugave C., Namane A., Cellier C., Cerf-Bensussan N., Heyman M. (2003). Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*, **125**, 696-707.
- Mazzeo M.F., De Giulio B., Senger S., Rossi M., Malorni A. and Siciliano R.A. (2003). Identification of transglutaminase-mediated deamidation sites in a recombinant α -gliadin by mass-spectrometry methodologies. *Protein Science*, **12**, 2434-2442.
- Mearin ML., Ivarsson A., Dickey W. (2005). Coeliac disease: is it time mass screening? *Best pract Res Clin Gastroenterol*, **19**, 441-452.
- Medzihradzsky K.F., Campbell J.M., Baldwin M.A., Falick A.M., Juhasz P., Vestal M.L., Burlingame A.L. (2000). The characteristic of peptide collision induced dissociation using a high performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal. Chem.*, **72**, 552-558.
- Meeuwisse G.W. (1970). Diagnostic criteria in celiac disease. *Acta Paediatr Scand.*, **59**, 461-463.
- Meloni G., Dore A., Meloni G., Dore A., Fanciulli G., Tanda F., Bottazzo GF. (1999). Subclinical celiac disease in school children from Northern Sardinia. *Lancet*; **2**, 9137-9146.
- Meroth C.B., Walter J., Hertel C., Brandt M.J., Hammes W.P. (2002). Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *App. and Env. Microbiol.*, **69**, 475-482.
- Metakovsky E.V., Ng P.K., Chernakov V.M., Pogna N.E., Bushuk W. (1993). Gliadin alleles in Canadian western red spring wheat cultivars: use of two different procedures of acid polyacrylamide gel electrophoresis for gliadin separation. *Genome*, **36**, 743-749.
- Mills, O. E., and Thomas, T. D. (1981). Nitrogen sources for growth of lactic streptococci in milk. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* **16**, 42-55.

- Molberg O, Adam S.N, Sollid L.M. (2000). Role of tissue transglutaminase in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, **3**, 232-237
- Molberg Ø., Solheim Flaete N., Jensen T., Lundin K.E., Arentz-Hansen H., Anderson O.D., Kjersti Uhlen A., Sollid LM. (2003). Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology*, **125**, 337-344.
- Moron B., Bethune M.T., Comino I., Manyani H., Ferragud M., Carlos Lopez M., Cabolla A., Khosla C., Sousa C. (2008). Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibody to a main immunogenic gluten peptide. *Plos One*, **3**, 2294-2305.
- Mowat A.M. (2003). Coeliac disease-a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry. *Lancet*; **361**, 1290-1292.
- Muccilli V., Cunsolo V., Saletti R., Foti S., Masci S., Lafiandra D. (2005). Characterization of B- and C-type low molecular weight glutenin subunits by electrospray ionization mass spectrometry and matrixassisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics*, **5**, 719-728.
- Mustalahti K., Collin P., Sievänen H., Salmi J., Mäki M. (1999). Osteopenia in patients with clinically silent coeliac disease warrants screening. *Lancet*, **354**, 744-745.
- Nakamura T., Yoshida A., Komatsuzaki N., Kawasumi T., Shima J. (2007). Isolation and characterization of a low molecular weight peptide contained in sourdough. *J. of Agric. and Food Chemistry*, **55**, 4871-4876.
- O'Farrelly C., Marten D., Melcher D., McDougall B., Price R., Goldstein A.J., Sherwood R., Fernandes L. (1988). Association between villous atrophy in rheumatoid arthritis and a rheumatoid factor and gliadin-specific IgG. *Lancet*, **2**, 819-822
- Okita T.W., Greene F.C. (1982). Wheat Storage Proteins : Isolation and Characterization of the gliadin messenger RNAs. *Plant Physiol.*, **69**, 834-839.
- Osborne T.B. 1907. The proteins of the wheat kernel. Carnegie Institute of Washington publication 84. Judd and Detweiler, Washington, D.C.

- Paramithiotis S., Chouliaras Y., Tsakalidou E., Kalantzopoulos G. (2004). Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. *Process biochemistry*, **40**, 2813-2819.
- Parrot I., Huang P.C., Khosla C. (2002). Circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of immunogenic gluten peptides and their analogs. *The J. of biol. chemistry*, **277**, 45572-45578.
- Piccoli A., Capelli P., Castagnini A., Cipolli M., Contreas G., Ulmi D., Zanoni G., Valletta E. (2002). Latent celiac disease in subjects with serum anti-endomysial antibodies and normal intestinal biopsy. *Pediatr Med Chir.*, **24**, 358-362.
- Piper J.L., Gray G.M., Khosla C. (2002). High selectivity of human tissue transglutaminase for immunoactive gliadin peptides: implications for celiac sprue. *Biochemistry*, **41**, 386-393.
- Pocecco M., Ventura A. (1995). Coeliac disease and insulin-dependent diabetes mellitus: a causal association? *Acta Paediatr.*; **84**, 1432-1433.
- Pogna N.E., Mellini F., Dal Belin Peruffo A., Boggini G., Bianchi A. (1984). Diagrammi elettroforetici delle gliadine e chiave di identificazione delle varietà di grano duro iscritte nel registro delle varietà.
- Preston K.R., Kruger J.E. (1976). Purification and properties of two proteolytic enzymes with carboxypeptidase activity in germinated wheat. *Plant Physiol*, **58**, 516-520.
- Qiao S.W., Bergseng E., Molberg O., Jung G., Fleckenstein B., and Sollid L.M. (2005). Refining the rules of gliadin T Cell epitope binding to the disease-associated DQ2 molecule in celiac disease: importance of proline spacing and glutamine deamidation. *The j. of Immunol.*, **175**, 254-261.
- Qiao, S.W., Bergseng E., Molberg O., Xia J., Fleckenstein B., Khosla C., and Sollid L.M. (2004). Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *The j. of Immunol*, **173**, 1757-1762.
- Rabilloud T. (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climb up the mountain. *Proteomics*, **2**, 3-10.

- Ram S., Jain N., Dawar V., Singh R. P., Shoran J. (2005). Analyses of Acid-PAGE Gliadin Pattern of Indian Wheats (*Triticum aestivum* L.) Representing Different Environments and Periods. *Crop Science*, **45**, 1256–1263.
- Reeves C.D. (1986). Gene expression in developing wheat endosperme. *Plant Physiol.*, **82**, 34-40.
- Ricciardi A., Parente E., Piraino P., Paraggio M., Romano P. (2005). Phenotypic characterization of lactic acid bacteria from sourdough for Altamura bread produced in Apulia (Southern Italy). *Int. J. of Food Microbiol.*, **98**, 63-72.
- Risposta anti-glutine nella malattia celiaca. *Tesi di dottorato dott.ssa Monica Vecchiet*, Università degli Studi di Trieste.
- Rizzello C.G., De Angelis M., Di Cagno R., Camarca A., Silano M., Losito I., De Vincenzi M., de Bari M.D., Palmisano F., Maurano F., Gianfrani C., and Gobbetti M. (2007). Highly efficient gluten degradation by Lactobacilli and Fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *App. and Env. Microbiol.*, **73**, 4499-4507.
- Rocher A., Soriano F., Molina E., González-Limas G., Méndez E. (1995). Characterization of distinct alpha- and gamma-type gliadins and low molecular weight components from wheat endosperm as coeliac immunoreactive proteins. *Biochim Biophys Acta*; **1247**, 143-148.
- Rollan G., De Angelis M., Gobbetti M., De Valdez G.F. (2005). Proteolytic activity and reduction on gliadin-like fractions by sourdough lactobacilli. *J. of App. Microbiol.*, **99**, 1495-1502.
- Rubin R., Levanony H., Galili G. (1992). Evidence for the Presence of Two Different Types of Protein Bodies in Wheat Endosperm. *Plant Physiol*; **99**, 718-724.
- Rumbo M., Chirido F.G., Anon M.C., Fossati C.A. (1997). Immunoblotting of gliadins separated by Acid Page: Analysis of Electrotransference Conditions. *Food and Agric. Immunol.*, **9**, 135-139.
- Salmenkallio-Marttila M., Katina K., Autio K. (2001). Effect of bran fermentation on quality and microstructure of high-fibre wheat bread. *Cereal Chem.***78**, 429–435.

Autore: Dr.ssa Mariangela Stefania Fiori

Titolo: Ruolo delle Peptidasi dei LAB nell'Idrolisi delle Gliadine Antigeniche e di Peptidi derivati dal 33-mer.

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

- Salzano A.M., Crescenzi M. (2005). Mass spectrometry for protein identification and the study of posto translational modifications. *Ann Ist Super sanità*, **41**, 443-450.
- Sandhu D. Gill K.S. (2002). Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes. *Plant Physiol.*, **128**, 803-811.
- Sasaki M., Bosman B.W., Tan P.S.T. (1995). Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli. *J. of Dairy Res.*, **62**, 601-610.
- Sasaki M., Bosman B.W., Tan P.S.T. (1995). Immunological and electrophoretic study of the proteolytic enzymes from various *Lactococcus* and *Lactobacillus* strains. *J. of Dairy Res*, **62**, 611-620.
- Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *App. Microbiol Biotechnol*, **71**, 394-406.
- Savilahti E., Simell O., Koskimies S., Rilva A., Akerblom H.K. (1986). Celiac disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. of .Pediatric*, **108**,690-693.
- Schleifer K.H., Ehrmann M., Beimform C., Brockmann E., Ludwigg W., & Amann R. (1995) Application of Molecular Methods for the Classification and Identification of Lactic Acid Bacteria. *Int. Dairy J.* , **5**, 1081-1094.
- Schulzke J.D., Bentzel C.J., Schulzke I. (1998). Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. *Pediatric Research*, **43**: 435-441
- Schuppan D. (2000). Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology*; **119**, 234-242.
- Shan L., Mathews I.I., Khosla C. (2004). Structural and mechanistic analysis of two prolyl endopeptidases: role of interdomain dynamics in catalysis and specificity. *PNAS*, **102**, 3599-3604.
- Shan Lu, Marti T., Sollid L.M., Gray G.M., Khosla C. (2004). Comparative biochemical analysis of three bacterial endopeptidases: implications for celiac spue. *Bioch. Society*, **383**, 311-318.
- Shan, L., Molberg O., Parrot I., Haush F., Filiz F., Gray G.M., Sollid L.M. (2002.) Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*; **297**, 2275-2279.

Autore:Dr.ssa Mariangela Stefania Fiori

Titolo: Ruolo delle Peptidasi dei LAB nell'Idrolisi delle Gliadine Antigeniche e di Peptidi derivati dal 33-mer.

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

- Shan, L., Qiao S.W., Arentz-Hansen H., Molberg O., Gray G.M., Sollid L.M., and Kosla C. (2005). Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten, implications for celiac sprue. *J. proteome res.*, **4**, 1732-1741.
- Shewry P.R., Halford N.G., Belton P.S., Tatham A.S. (2002). The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, **357**, 133-142.
- Shewry, P.R., Halford N.G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot*; **53**, 947-958.
- Shin J.Y., Jeon W.M., Kim G.B., Lee B.H. (2004). Purification and characterization of intracellular proteinase from *Lactobacillus casei* ssp *casei* LLG. *J. Dairy Science*, **87**, 4097-4103.
- Shinjini B., Nitya T. (2006). Diagnosis of celiac disease. *The Ind. J. of Pediatrics*, **73**, 703-709.
- Silano M., De Vincenzi M. (1999). Bioactive antinutritional peptides derived from cereal prolamins: a review. *Nahrung*. **43**, 175–184.
- Silano M., Di Benedetto R., Trecca A., Arrabito G., Leonardi F., De Vincenzi M. (2007). A decapeptide from durum wheat prevents celiac peripheral blood lymphocytes from activation by gliadin peptides. *Pediatric Res.*, **61**, 67-71.
- Smith D.M.H., Miller J (1979). Gastroenterology, celiac disease and enamel hypoplasia. *Br Dent J.*, **147**, 91-95
- Sollid L., Markussen G., Gjerde H., (1989). Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ- α/β heterodimer. *J Exp Med.*, **169**, 345-350
- Spaenij-Dekking L., Kooy-Winkelaar Y., van Veelen P., Drijfhout J.W., Jonker H., van Soest L., Smulders M.J., Bosch D., Gilissen LJ, Koning F. (2005). Natural variation in toxicity of wheat: potential for selection of nontoxic varieties for celiac disease patients. *Gastroenterology*, **129**, 797-806.
- Spicher G., E. Rabe, R. Sommer, H. Stephan. (1981). About the behaviour of homofermentative sourdough bacteria and yeasts in mixed culture. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **173**, 291-296.

Autore: Dr.ssa Mariangela Stefania Fiori

Titolo: Ruolo delle Peptidasi dei LAB nell'Idrolisi delle Gliadine Antigeniche e di Peptidi derivati dal 33-mer.

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

- Spicher G., Rabe E., Sommer R., Stephan H. (1982). On the behaviour of heterofermentative sourdough bacteria and yeasts in mixed culture. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **174**, 222-227.
- Stene-Larsen G., Mosvold J., Ly B. (1988). Selective vitamin B12 malabsorption in adult celiac disease. Report on three cases with associated autoimmune disease. *Scand J Gastroenterol.*, **23**, 1105-1108.
- Stenhammar L., Fallstrom S.P., Jansson G. (1986). Celiac disease in children of short stature without gastrointestinal symptoms. *Eur J Pediatr.*, **145**, 185-186.
- Stenhammer L., Ljunggren C.G. (1988). Trombocytopenic purpura and coeliac disease, *Acta Paediatr Scand.*, **77**, 764-766.
- Stepniak D., Vader L.W., Kooy Y., van Veelen P.A., Moustakas A., Papandreou N.A., Eliopoulos E., Drijfhout J.W., Papadopoulos G.K., and Koning F. (2005). T-cell recognition of HLA-DQ2-bound gluten peptides can be influenced by an N-terminal proline at p-1. *Immunogenetics.*, **57**, 8-15.
- Stiles M.E., Holzapfler W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. of Food Microbiol.*, **36**, 1-29.
- Thompson J., Gentry-Weeks C.R. (1994) Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. in: de Rossart H., Luquet F.M. *Bactéries Lactiques. Ed. Lorica*, **6**, 239-289.
- Ul-Haq I., Mukhtar H. (2006). Protease biosynthesis from *Lactobacillus* species: fermentation parameters and kinetics. *J. of Food proces. and Preservation*, **31**, 102-115.
- Vader L.W., Stepniak D.T., Bunnik E.M., Kooy Y.M., de Haan W., Drijfhout J.W., Van Veelen P.A., Koning F. (2003). Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology*, **125**, 1105-1113.
- Vader, L.W., de Ru A., van der Wal Y., M.C. Kooy Y., Benckhuijsen W., Mearin M.L., Drijfhout J.W., van Veelen P. And Koning F. (2002). Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med.*, **195**, 643-649.
- Van Heel D.A., West J. (2006). Recent advances in coeliac disease. *Gut*, **55**, 1037-1046.

- van Herpen T.W., Goryunova S.V., van der Schoot J., Mitreva M., Salentijn E., Vorst O., Schenk M.F., van Veelen P.A., Koning F., van Soest L.J., Vosman B., Bosch D., Hamer R.J., Gilissen L.J., Smulders M.J. (2006). Alpha-gliadin genes from the A, B, and D genomes of wheat contain different sets of celiac disease epitopes. *BMC Genomics*; **7**, 1.
- Vensel W.H., Tanaka C.K., Cai N., Wong J.H., Buchanan B.B., Hurkman W.J. (2005). Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics*, **5**, 1594-1611.
- Ventura A., Magazu G., Gerarduzzi T., Greco L. (2002). Coeliac disease and the risk of autoimmune disorders. *Gut*; **51**, 897-898.
- Ventura A., Magazzu G., Greco L., (1999). Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology*. **117**, 297-303.
- Vermeulen N., Pavlovic M., Ehrmann M.A., Ganzle M.G., Vogel R.F. (2005). Functional characterization of the proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T during growth in sourdough. *App. and Env. Microbiol.*, **71**, 6260-6266.
- Verplaetse A. (1994). Influence of raw meat properties and processing techniques on aroma quality of raw fermented meat products. In: Proceedings of the 40th International congress on meat science and technology, 45-65.
- Vido K., le Bars D., Yves-Mistou M., Anglade P., gruss A., Gaudu P. (2004). Proteome analysis of Heme-dependent Respiration in *Lactococcus Lactis*: involvement of the proteolytic system. *J. of Bacteriology*, **186**, 1648-1657.
- Villani F. (2007) Microbiologia degli alimenti e Laboratorio di Microbiologia degli Alimenti. <http://wpage.unina.it/villani>.
- Volta U., De Franceschi L., Molinaro N., Tetta C., Bianchi F.B. (1997). Organ specific autoantibodies in coeliac disease: do they represent an epiphenomenon or the expression of associated autoimmune disorders? *Ital J Gastroenterol Hepatol.*, **29**, 18-21.
- Weiss W., Vogelmeier C. and Gorg A. 1993. Electrophoretic characterization of wheat grain allergens from different cultivars involved in bakers' asthma. *Electrophoresis.*, **14**, 805–816.

- Wieser H. (1996). Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatr Suppl.*, **412**, 3-9.
- Zambonelli C., Tini V., Giudici P., Grazia L. (2001). Microbiologia degli alimenti fermentati., 151-165.
- Zelissen P.M.J.(1995). Associated autoimmunity in Addison's disease. *J Autoimmun.*, **8**, 121-130
- Zhao H., Wang R., Guo A., Hu S., Sun G. (2004). Development of primers specific for LMW-GS genes located on chromosome 1D and molecular characterization of a gene from Glu-D3 complex locus in bread wheat. *Hereditas*, **141**, 193-198.
- Zotta T., Piraino P., Ricciardi A., McSweeney P.L.H., Parente E. (2006). Proteolysis in Model sourdough fermentations. *J. of Agricul. and Food Chemistry*, **54**, 2567:2574.