

**DOTTORATO DI RICERCA IN PRODUZIONI E  
TECNOLOGIE ALIMENTARI  
CICLO XXVI**

**Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente (Di3A)  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**

---

**Dott.ssa SAMANTHA CREMONA**

**Ruolo di batteri lattici isolati da paste acide siciliane  
nell'idrolisi delle gliadine antigeniche del glutine**

---

**TESI DI DOTTORATO**

---

**Coordinatore:**

**Prof.ssa Marcella Avondo**

**Tutor:**

**Dott.ssa Cristina Restuccia**

---

**Triennio 2011-2013**

*Alla mia voglia di vivere e al mio G3 che mi ha permesso di  
capire quanto vale la vita e la forza d' animo.*

*“Mai arrendersi di fronte a nulla”: questo è stato il motto che  
mi ha accompagnata in questi quattro lunghi, tortuosi ma  
piacevoli anni di lavoro e questa tesi ne è il frutto.*

## INDICE

INTRODUZIONE	pag. 4
1. LA FERMENTAZIONE DEI CEREALI	pag. 7
2. GLI IMPASTI ACIDI	pag. 9
2.1 Tecnologia degli impasti acidi	pag. 9
2.2 Origine, selezione e dinamica dei microrganismi del lievito naturale	pag. 13
2.3 Fattori che influenzano i rapporti tra le specie microbiche del lievito naturale	pag. 15
3. CARATTERISTICHE E RUOLO DEI LIEVITI E DEI BATTERI LATTICI DEL LIEVITO NATURALE	pag. 17
4. INTERAZIONE TRA LIEVITI E BATTERI LATTICI DELLE PASTE ACIDE	pag. 19
5. METABOLISMO DEI BATTERI LATTICI DEL LIEVITO NATURALE	pag. 22
5.1 Metabolismo degli zuccheri.	pag. 23
5.2 Metabolismo delle sostanze azotate	pag. 25
6. IL FRUMENTO	pag. 30
6.1 Origine, Storia e caratteristiche	pag. 30
6.2 Proteine	pag. 31
6.2.1 Albumine e globuline	pag. 33
6.2.2 Gliadine e glutenine	pag. 33
7. CELIACHIA	pag. 42
7.1 Definizione e prevalenza	pag. 42
7.2 Eziopatogenesi	pag. 46
7.3 Aspetti clinici	pag. 50
7.4 Patologie associate	pag. 54
7.5 Immunogenicità della gliadina	pag. 55
7.6 Possibilità terapeutiche	pag. 58
SCOPO DEL LAVORO	pag. 61
MATERIALI E METODI	pag. 62
8 ISOLAMENTO E STUDIO FENOTIPICO DI BATTERI LATTICI DA PASTE ACIDE	pag. 62
9. CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA DEI BATTERI LATTICI ISOLATI	pag. 64
9.1 Estrazione del DNA totale.	pag. 64
9.2 Tuf gene multiplex PCR	pag. 64
9.3 Rec A gene multiplex PCR	pag. 65
9.4 Analisi PCR/RFLP del 16S rRNA	pag. 66
10. CAPACITÀ PROTEOLITICA DEI CEPPI DI BATTERI LATTICI ISOLATI	pag. 67
10.1 Degradazione del glutine in mezzo sintetico	pag. 67
10.2 Saggi enzimatici	pag. 67
10.3 Capacità proteolitica in impasti sperimentali	pag. 68
10.3.1 Estrazione delle gliadine da sfarinato e pasta acida di Monococco e Timilia	pag. 69
10.3.2 SDS-PAGE	pag. 70
RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 72
11. ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DEGLI ISOLATI	pag. 72
11.1 Isolamento e studio fenotipico di batteri lattici da paste acide	pag. 72
11.2 Caratterizzazione genotipica dei batteri lattici isolati	pag. 72
12. DEGRADAZIONE DEL GLUTINE IN MEZZO SINTETICO	pag. 73

13. SAGGI ENZIMATICI	pag. 81
14. CAPACITÀ PROTEOLITICA IN IMPASTI SPERIMENTALI	pag. 82
CONCLUSIONI	pag. 84
BIBLIOGRAFIA	pag. 87

## **INTRODUZIONE**

I cereali sono una componente importante dell'alimentazione umana in quanto forniscono fibre, proteine, carboidrati, minerali e vitamine necessarie per la salute dell'uomo.

I cereali sono principalmente utilizzati in cucina per la produzione di pane e prodotti da forno, ma anche per la preparazione di bevande alcoliche come whiskey e birra (orzo, sorgo), vodka (grano), bourbon americano (segale), sake giapponese (riso) (Hammes *et al.*, 2005).

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

L'attribuzione di proprietà tossiche ad una sostanza contenuta in alimenti che per secoli hanno costituito una delle fonti primarie nell'alimentazione dell'uomo, non è stato facile (Auricchio *et al.*, 1988, 1997, 2004). Si ritiene che nell'ultimo secolo, diversi siano stati i fattori che hanno contribuito a far emergere il problema dell'intolleranza al glutine. In primo luogo, l'aumento notevole del contenuto di glutine nella farina, a causa della selezione di semi in grado di conferire alla farina eccellenti proprietà panificatorie. 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. È 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.

La celiachia è considerata ormai una problematica sociale tanto che è stata varata una legge la n.123 del 4 luglio 2005 in cui sono codificate le norme per la protezione dei soggetti malati di celiachia. 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.

La prolungata esposizione al glutine porta ad un aumento del rischio di sviluppare altre patologie che aggravano 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 e ad un loro utilizzo come starter in impasti preparati in modo tradizionale per la produzione dei prodotti da forno, ed 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 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 Sicilia) 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 mezzo di crescita contenente glutine sia in impasti sperimentali.

## 1. LA FERMENTAZIONE DEI CEREALI

I cereali rappresentano una componente nutrizionalmente rilevante dell'alimentazione umana (Katina *et al.*, 2005), poiché forniscono fibre, proteine, carboidrati, minerali e vitamine necessari per la salute dell'uomo.

La fermentazione dei cereali è un processo biotecnologico molto antico, che risale all'antico Egitto, dove sia la birra che il pane erano prodotti con l'aiuto di lieviti e batteri lattici.

Oggi, l'arte della pasta madre, lo sviluppo di specifiche culture e il controllo della fermentazione rappresentano la prassi per tutte le aziende che producono prodotti da forno.

Il loro uso in panificazione (Brummer e Lorenz, 2003; Clarke e Arendt, 2005) provoca cambiamenti nella qualità degli alimenti, comprese la tessitura (Arendt *et al.*, 2007), il sapore (Ur-Rehman *et al.*, 2006), l'aspetto, la qualità nutrizionale e la sicurezza. .

I vantaggi della fermentazione possono comprendere:

- il miglioramento della appetibilità e dell'accettabilità, influenzando le caratteristiche sensoriali (aroma, sapore, colore, consistenza);
- la conservazione attraverso l'acidificazione e la produzione di composti antimicrobici, che migliorano la sicurezza degli alimenti attraverso l'inibizione degli agenti patogeni;
- l'aumento del valore nutrizionale attraverso la sintesi di sostanze nutritive da parte dei microrganismi;
- il miglioramento della digeribilità delle proteine e dei carboidrati;
- la rimozione di sostanze antinutrizionali (fitati, inibitori di enzimi, polifenoli, tannini) e composti indesiderati (tossine endogene, micotossine, composti cianogenici, flatulenza prodotta dalla presenza di carboidrati).

Durante la fermentazione dei cereali, in genere fino a 24 ore a moderata temperatura, l'attività metabolica dei microrganismi presenti è in interazione con i costituenti del grano.



I batteri lattici producono acido lattico, acido acetico e un abbassamento del pH in genere inferiore a 5. La regolazione del pH aumenta selettivamente le prestazioni di alcuni enzimi, come amilasi, proteasi, emicellulasi e fitasi, influenzando la qualità nutrizionale di tali prodotti.

I lieviti producono anidride carbonica ed etanolo e le interazioni che essi instaurano con i lattobacilli sono importanti per l'attività metabolica della pasta madre.

## **2. GLI IMPASTI ACIDI**

La fermentazione degli impasti acidi è uno dei processi biotecnologici più antichi utilizzati nella produzione alimentare, risalente a tempi preistorici, che si innesca quando una miscela di semi di cereali è trasformata in farina e a cui è stata aggiunta acqua per formare un impasto (Hammes *et al.*, 2005).

La moderna biotecnologia dei prodotti da forno sta riscoprendo l'uso della madre acida come agente lievitante, grazie ai numerosi vantaggi che questa offre rispetto al lievito commerciale usato per la panificazione.

Oggi, la fermentazione degli impasti acidi è utilizzata nella produzione di pani tipici, torte, cracker, prodotti da ricorrenza e la sua applicazione è in continuo aumento.

In Italia, gli impasti acidi a base di grano sono utilizzati per la produzione di oltre il 30% dei prodotti da forno. Oltre 200 tipi di pane tradizionale, che si differenziano per il tipo di farina, ingredienti, tecnologia e processo di fermentazione, sono stati recentemente classificati in Italia dall'Istituto Nazionale di Sociologia Rurale (Insor, 2000); tra questi, la Coppia Ferrarese e il Pane casereccio di Genzano (Centro Italia) sono stati inseriti dalla Comunità Europea (CE) tra i prodotti alimentari con Indicazione Geografica Protetta (IGP; regolamenti della Commissione n. 2036/2001 e n. 2325/1997, rispettivamente), mentre il Pane di Altamura (Italia meridionale) è stato incluso tra i prodotti con Denominazione di Origine Protetta (DOP) (regolamento n. 1291/2003).

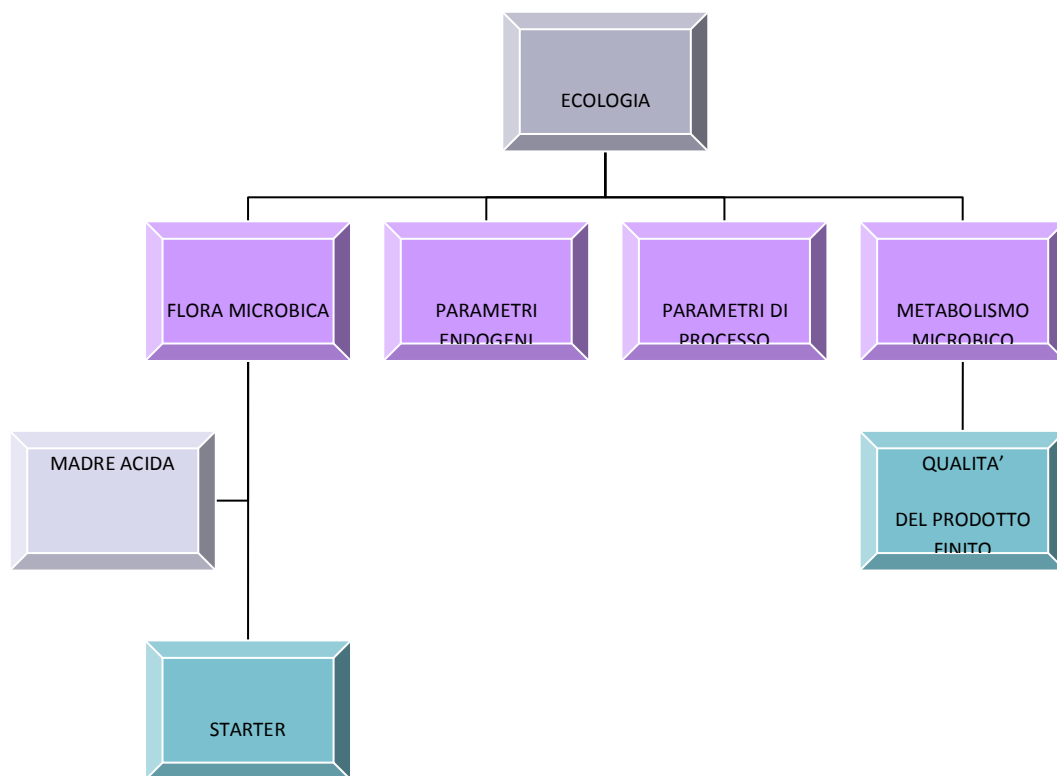
Nel Nord Italia gli impasti acidi sono utilizzati dalle piccole e grandi industrie per la produzione di dolci tradizionalmente consumati nelle festività religiose (Natale e Pasqua), come Panettone, Pandoro e Colomba.

Altri dolci locali, consumati dai bambini e per la prima colazione (cornetti e brioches), sono prodotti utilizzando gli impasti acidi (Foschino *et al.*, 1999).

### **2.1 Tecnologia degli impasti acidi**

Gli impasti acidi sono una miscela di farina di frumento o segale e acqua, fermentata con batteri lattici e lieviti indigeni (De Vuyst e Neysens, 2005) e utilizzata come inoculo per la produzione di pane e altri prodotti da forno.

A causa della loro provenienza e della produzione artigianale, gli impasti acidi sono un enorme fonte di batteri lattici e lieviti. I fattori endogeni (carboidrati, fonti di azoto, minerali, lipidi, acidi grassi, attività enzimatiche) e i parametri di processo (temperatura, consistenza dell'impasto, attività dell'acqua, ossigeno, tempo di fermentazione e numero di propagazioni) influenzano la microflora acida e le caratteristiche di prodotti da forno (Fig. 1).



**Figura 1.** Schema dei fattori che influenzano la crescita e il metabolismo della microflora degli impasti acidi e dei prodotti da forno (adattato da Vogel et al., 1996 ).

Sulla base della tecnologia di produzione, gli impasti acidi possono essere distinti in impasti di tipo I, tipo II e tipo III (Böker *et al.*, 1995) e ogni tipo è caratterizzato da una specifica popolazione microbica.

### **Gli impasti di tipo I:**

sono prodotti secondo procedure tradizionali, a temperatura ambiente (20-30°C), e sono caratterizzati da continui rinfreschi per mantenere i microrganismi in uno stato metabolicamente attivo.

Questi impasti sono impiegati per la produzione del pane francese San Francisco, di dolci (Panettone, Pandoro, Colomba) e pani tipici (pane Pugliese, Toscano e di Altamura) italiani.

Gli impasti di tipo I sono ulteriormente suddivisi in tre sottogruppi: tipo Ia, Ib e Ic ( Stolz , 1999 ).

### **Gli impasti di tipo Ia:**

sono caratterizzati da una composizione microbica stabile, da un'elevata acidità e sono resistenti alla contaminazione microbica.

La miscela di partenza, costituita da una quantità pari di farina di grano tenero e acqua, viene lasciato a fermentare a temperatura ambiente. Indipendentemente dalla provenienza geografica, questo tipo di processo è guidato da ceppi della specie eterofermentante *Lactobacillus sanfranciscensis*.

### **Gli impasti di tipo Ib:**

sono caratterizzati dalla presenza di culture miste e sono ottenuti attraverso un lungo processo di fermentazione (da 3 a 48 ore).

I diversi reinoculi dell'impasto assicurano la stabilità della popolazione microbica. La maggior parte di questa negli impasti di tipo Ib è rappresentata da ceppi di *L. sanfranciscensis*.

A seconda delle condizioni di fermentazione, tuttavia, possiamo trovare altre specie eterofermentanti obbligate come *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. pontis*, *L. reuteri* e *Weissella cibaria*, oppure eterofermentanti facoltative come *L. alimentarius*, *L. casei*, *L.*

*plantarum* o ancora omofermentanti obbligate come *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis*, *L. mindensis*.

La specie di lievito maggiormente isolata, e spesso associata a *L. sanfranciscensis* e *L. pontis*, è *Candida humilis* (*Candida milleri*) (Gänzle *et al.*, 1998).

### **Gli impasti di tipo Ic:**

sono generalmente utilizzati per la produzione di alimenti africani e turchi a base di sorgo. Il processo di fermentazione, effettuato ad alte temperature (generalmente > 35°C), è dominato da ceppi delle specie *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. amylovorus* e *Leuconostoc* spp. La specie di lievito maggiormente isolata da questi impasti è *Issatchenkia orientalis*.

### **Gli impasti di tipo II:**

sono realizzati con continue propagazioni, utilizzando temperature elevate (generalmente > 30°C), lunghi tempi di fermentazione (da 2 fino a 5 giorni) e un alto contenuto in acqua.

Questi tipi di impasti sono per lo più utilizzati in processi industriali come carrier di acidità a causa del basso pH (generalmente < 3.5) raggiunto dopo 24 ore di fermentazione. I microrganismi presentano una limitata attività metabolica perché sono generalmente in tarda fase stazionaria. La popolazione microbica degli impasti di tipo II è costituita da ceppi omofermentanti di *L. amylovorus* (segale), *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis* e *L. johnsonii*, ma possiamo trovare anche specie eterofermentative come *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. frumenti*, *L. pontis*, *L. panis*, *L. reuteri* e *Weissella* spp.

### **Gli impasti di tipo III:**

sono impasti essiccati e utilizzati come carrier di aroma durante il processo di panificazione. Questi impasti contengono batteri lattici resistenti al processo di essiccazione (spray-drying), come ad esempio ceppi delle specie *L. brevis*, *Pediococcus pentosaceus* e *L. plantarum*. Gli impasti di tipo II e tipo III, diversamente da quelli di tipo I, richiedono l'aggiunta di lievito per panificazione (*Saccharomyces cerevisiae*). Deve essere, inoltre, menzionato un altro tipo di impasto.

### **Gli impasti acidi di tipo 0:**

sono pre-impasti inoculati solo con il lievito e il processo di fermentazione avviene in 3-24 ore a temperatura ambiente. In aggiunta a *S. cerevisiae*, possono essere isolate specie importanti come *L. plantarum*, *Leuc. mesenteroides*, *P. pentosaceus*, *L. sakei*, *L. brevis*, *L. bavaricus* che contribuiscono alla acidificazione e allo sviluppo dell'aroma. Gli impasti di tipo 0 sono generalmente utilizzati per la produzione di crackers (USA), baguettes (Francia) e ciabatte.

### **2.2 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 farine e componenti vegetali. Nelle farine sono presenti i microrganismi che abitualmente si trovano sulle cariossidi e microrganismi accidentali derivanti dagli ambienti di lavorazione (Tab. 1).

**Tabella 1.** Principali gruppi microbici presenti inizialmente negli impasti

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

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

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  $10^3$  ufc/g di pasta; dopo 42 ore tale valore si attesta intorno a  $10^5$  ufc/g di pasta, per raggiungere alla fine valori compresi tra  $10^6$  e  $10^8$  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 2 sono riportati i lieviti ed i batteri lattici maggiormente riscontrati nelle paste acide naturali e nei prodotti da esse derivati. Alcune specie hanno ampia diffusione e sono state riscontrate in campioni di diversa origine e provenienza (Kline e Sugihara, 1971; 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).

**Tabella 2.** Lieviti e batteri lattici più frequentemente isolati da impasti acidi o prodotti analoghi.

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

### 2.3 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 ed il successivo. Più le variabili considerate sono restrittive e costanti nel tempo 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 cerevisiae*, *Candida holmii*, *Candida milleri*, *Candida krusei*, *Saturnispora saitoi* (*Pichia saitoi*) (Foschino *et al.*, 1997, 2001, 2005).

In particolare, in 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 ne condiziona fortemente i rapporti. Intervalli di temperatura compresi tra 20 e 35°C permettono lo sviluppo sia di lieviti che di batteri lattici, però le basse temperature inibiscono maggiormente i batteri rispetto ai lieviti e viceversa
- la farina contiene numerose sostanze nutritive necessarie per lo sviluppo dei microrganismi. 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 di crescita, i microrganismi mostrano un'elevata richiesta di amminoacidi che



vengono utilizzati 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 sia dei lieviti che dei batteri lattici. Per mantenere un impasto acido occorre quindi rallentare l'attività dei microrganismi e conservare un impasto di consistenza non troppo molle
- il cloruro di sodio in concentrazioni superiori al 2% svolge un'azione inibitrice sui lieviti, è consigliabile aggiungere il sale solo quando l'attività dei microrganismi è al massimo livello;
- 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 di pH, e della concentrazione della sua forma indissociata
- i tempi tra un rinnovo ed il successivo costituiscono parametri importanti per mantenere costante il rapporto tra le specie presenti e per preservare la vitalità del lievito naturale;
- rinnovo e mantenimento a temperatura ambiente, in questo caso il successivo rinnovo deve essere eseguito 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 e Lombardia per la produzione di pane e prodotti da forno da ricorrenza.

### 3. CARATTERISTICHE E RUOLO DEI LIEVITI E DEI BATTERI LATTICI DEL LIEVITO NATURALE

I lieviti sono organismi mesofili con temperatura ottimale di crescita compresa tra i 20 e i 40°C, prediligono pH acidi (*optimum* 3.5-4.5), sono anaerobi facoltativi. Hanno esigenze nutrizionali semplici; utilizzano composti semplici quali carboidrati, composti azotati e vitamine. Non tutti riescono ad utilizzare il maltosio, e questo aspetto riveste notevole importanza nel caso di utilizzo in associazione con i batteri lattici. 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 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 pari a 3.2. Le specie prevalentemente isolate da un lievito naturale appartengono ai generi *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Il metabolismo omo ed etero fermentante di questi ceppi permette, a partire dagli esosi, la liberazione nel mezzo di solo acido lattico L (+) e D (-) (omof fermentanti) o di acido lattico, acido acetico, CO<sub>2</sub>, etanolo e tracce di composti secondari (eterofermentanti).

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

Le loro esigenze nutrizionali variano a seconda della specie e dei ceppi. In generale, necessitano oltre ai carboidrati di vitamine, amminoacidi, peptidi, acidi grassi e loro esteri. Il ruolo principale dei batteri lattici è la produzione di acidi organici e CO<sub>2</sub> per degradazione dei glucidi. La quantità di CO<sub>2</sub> prodotta dai batteri lattici eterofermentanti è variabile a seconda delle specie e dei ceppi, si tratta comunque di quantità inferiore rispetto a quelle prodotte dai lieviti.

Proteine, amido, pentosani ed acidi organici presenti nell'impasto subiscono degradazioni risultanti dall'azione dei batteri lattici. La presenza di acido lattico ed acetico gioca un importante ruolo durante le fasi dell'evoluzione dell'impasto, infatti, l'acidità della pasta condiziona lo sviluppo microbico e l'attività dei sistemi enzimatici della farina.

Il valore ottimale del rapporto acido lattico/acido acetico è di 3:1 ed è importante che rimanga tale per gli effetti che i due acidi hanno sul glutine, in quanto l'acido lattico lo rende più elastico e 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. I batteri lattici eterofermentanti quali *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fructivorans* e *Lactobacillus fermentum* sono caratterizzati da una bassa velocità di acidificazione, invece, 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 deaminazione e transaminazione degli amminoacidi (Galal *et al.*,1978) e pur essendo poco rappresentati sono altrettanto importanti per il quadro sensoriale.

#### 4. 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 dovuta principalmente alla produzione, da parte dei batteri lattici, di sostanze antimicrobiche e 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* e *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).

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  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e di aminoacidi, essi preferiscono utilizzare il primo. Ciò stimola fortemente l'attività dei batteri lattici 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). Si comprende, quindi, come le differenti specie di microrganismi presenti nel lievito naturale, e le relazioni che intervengono a regolarne lo sviluppo e le funzioni, influiscano in modo determinante sulla qualità della pasta acida, giustificando, almeno in parte, l'originalità sensoriale che spesso accompagna i prodotti ottenuti da madri differenti.

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 delle 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 *Flaviobacterium meningosepticum*, attiva sui residui di prolina, ha mostrato effetti idrolizzanti sul peptide 33-mer uno dei principali peptidi coinvolti nella celiachia; l'impiego di tale endopeptidasi è stato proposto, infatti, 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. Nello studio di Di Cagno *et al* (2004) è 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.

Con lo stesso obiettivo, è stata testata con successo una preparazione probiotica (VSL Pharmaceuticals, Gaithersburg, 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).

## 5. METABOLISMO DEI BATTERI LATTICI DEL LIEVITO NATURALE

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 le popolazioni microbiche naturalmente presenti 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 in grado quindi di contribuire positivamente al mantenimento e al miglioramento della salute dell'uomo.

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 e dell'intestino.

## 5.1 Metabolismo degli zuccheri.

Mediante la fermentazione degli zuccheri i batteri lattici producono l'energia necessaria (ATP) per i loro processi biosintetici. 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 è denominato sistema fosfoenolpiruvato-fosfotrasferasi (PEP-PT), ed è un complesso sistema enzimatico che trasporta lo zucchero attraverso la membrana con simultanea fosforilazione. Ad eccezione delle specie dei generi *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 CO<sub>2</sub>, 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  $\beta$ -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 xylosio 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 CO<sub>2</sub> 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 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.).

## **5.2 Metabolismo delle sostanze azotate**

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.

Preferenzialmente i batteri lattici idrolizzano le caseine mediante endo e esopeptidasi. La proteolisi delle caseine comporta la produzione di peptidi di 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, difforni 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. 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.

Tra i batteri lattici isolati da impasti acidi il *L. sanfranciscensis* è la sola specie il cui 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**: enzimi che catalizzano l'idrolisi delle proteine, cioè che spezzano i legami che tengono uniti gli aminoacidi con l'intervento di acqua. Sono localizzate a livello della parete cellulare e appartengono al gruppo delle serina-proteasi. Le serina-proteasi sono una classe di proteasi che attivano il loro meccanismo di catalisi in presenza della serina e di acqua, per cui si ha la rottura del legame con la serina liberando acido carbossilico. Sono classificate in base a pH e temperature ottimali e quindi alla specificità del substrato.

2. **PEPTIDASI**: enzimi 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**: sistemi enzimatici di membrana che operano il trasporto di peptidi e aminoacidi all'interno della cellula. Sono stati studiati e caratterizzati tre specifici sistemi di trasporto:

a. 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;

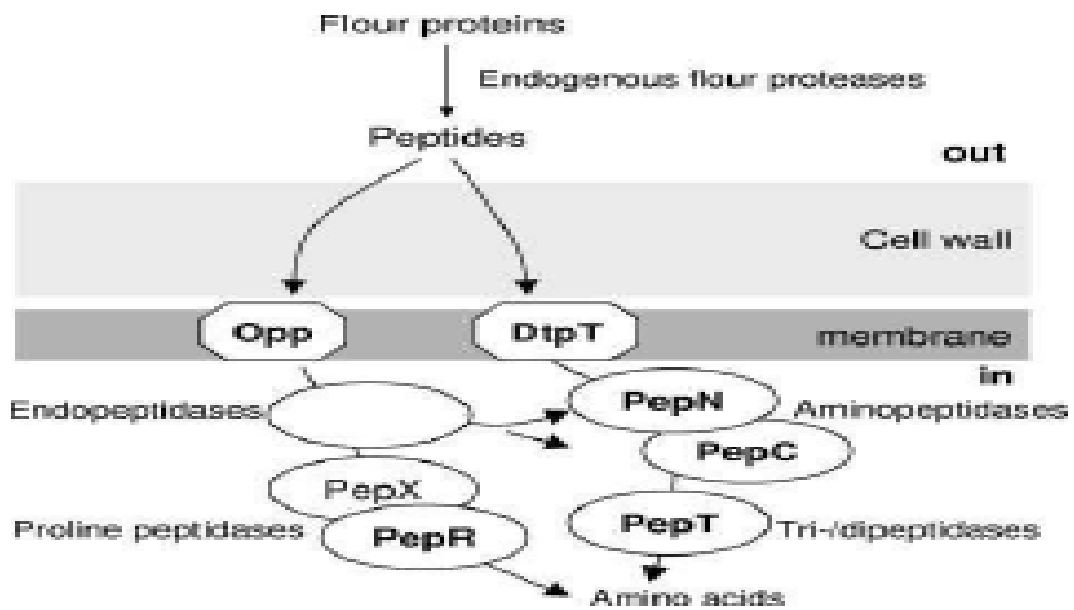
b. prima vengono degradate in oligopeptidi, di-peptidi e tri-peptidi dalle proteasi di parete chiamate *Prt*, vengono poi trasportati all'interno della cellula da tre specifici sistemi di trasporto: *Dtpt* e *Dtt*, che sono proteine singole che mediano il trasporto di di- e tri-peptidi idrofili, e *Opp* che media il

trasporto di oligopeptidi. I peptidi, in seguito, all'interno della cellula sono idrolizzati da peptidasi intracellulari in aminoacidi.

La conversione dei peptidi a singoli aminoacidi 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 di 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 meccanismo di trasporto dei batteri lattici si può suddividere in una sequenza di tre fasi principali:

- nella **prima fase**, le proteinasi di parete intervengono attaccando le proteine degradandole in piccoli peptidi.
- nella **seconda fase**, i piccoli peptidi 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 (Figura 4)
- nella **terza fase** dove interviene una categoria piuttosto complessa di peptidasi costituite da endo-, ammino- e carbossi-peptidasi (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).



**Figura 2.** Sistema proteolitico dei batteri lattici che utilizza le proteina della farina come fonte di azoto

## 6. IL FRUMENTO

### 6.1 Origine, Storia e caratteristiche

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

- *Pooideae*, di cui fanno parte 2 tribù
- *Tritiaceae*, (frumento, segale e orzo)
- *Aveneae*, (avena)
- *Bambusoideae*, (riso)
- *Panicoideae*, (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 400 Mbp per il riso e il miglio a genomi di 16000 Mbp 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*) con una pianta diploide di *Aegilops squarrosa*.

Circa l'80% delle basi che costituiscono il genoma del frumento è rappresentato da sequenze di DNA ripetute 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 distribuite in modo irregolare lungo i cromosomi e risultano concentrate a livello dei centromeri o in prossimità di regioni ricche di geni o alle estremità dei cromosomi stessi (Sandhu *et al.*, 2002).

## 6.2 Proteine

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

- **albumine**: solubili in acqua
- **globuline**: solubili in soluzioni saline
- **gliadine**: solubili in etanolo al 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.

La composizione delle proteine di riserva è il più importante fattore qualitativo del grano (Pogna *et al.* 1990). Le proteine di riserva appartengono a tre famiglie principali (Gianibelli *et al.* 2001):

- gliadine
- subunità gluteniniche a basso peso molecolare (LMW)
- subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW)

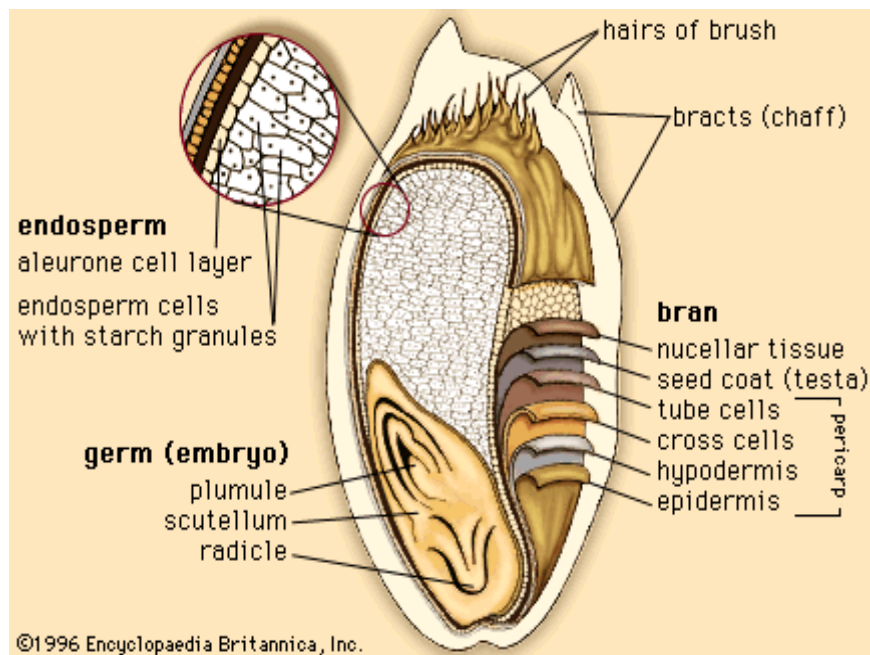
Esse costituiscono la parte preponderante del glutine, una massa proteica elastica che si ottiene impastando la semola o la farina sotto un rivotto d'acqua corrente.



Le gliadine costituiscono il 40% circa delle proteine dell'endosperma di grano e sono una miscela eterogenea di proteine monomeriche solubili in alcool. Sulla base della loro mobilità elettroforetica i componenti di queste proteine vengono classificati in  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\omega$  gliadine.

Gliadine e glutenine, sono 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), 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).

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



**Figura 3.** Sezione della cariosside di frumento

### 6.2.1 Albumine e globuline

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 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 collocare all'interno di due *range* di pesi molecolari: tra 20 e 27 KDa e tra 30 e 37 KDa; si è quindi ipotizzato che questi due gruppi possano corrispondere rispettivamente a subunità basiche e acide (Marcone 1998).

### 6.2.2 Gliadine e glutenine

Le principali frazioni proteiche del glutine sono rappresentate da gliadine e glutenine 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. Le gliadine sono monometriche mentre 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.

Studi effettuati hanno dimostrato 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).

Le **gliadine** costituiscono la principale frazione proteica di riserva della cariosside 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 70 KDa e sono state classificate in  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\omega$  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).

Le  $\alpha$  e  $\beta$  gliadine hanno un peso molecolare compreso tra 30 e 50 KDa e hanno una sequenza aminoacidica molto simile, tanto che spesso vengono classificate complessivamente come  $\alpha/\beta$ -gliadine. Le  $\alpha$ -gliadine sono presenti solo nel frumento e nelle specie correlate di *Triticum* e *Aegilops*, ma non in orzo e segale.

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 ripetuto 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 è costituita da una serie di segmenti di poliglutamine e sequenze uniche particolarmente ricche in lisina e arginina che contengono sei residui di cisteina.

Le  $\gamma$ -gliadine hanno lo stesso peso molecolare delle  $\alpha/\beta$ -gliadine, ma differiscono nella quantità di acido aspartico, prolina, metionina, tirosina, fenilalanina e triptofano. Anche le  $\gamma$ -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  $\beta$ -foglietti che possono formare una struttura più estesa; il dominio non ripetuto è ricco invece in  $\alpha$ - eliche.

Le  $\omega$ -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  $\omega$ -gliadine, chiamate ARQ-, KEL e SRL-. Il dominio centrale è costituito da una sequenza ripetuta di otto aminoacidi: PQQPFPQQ.

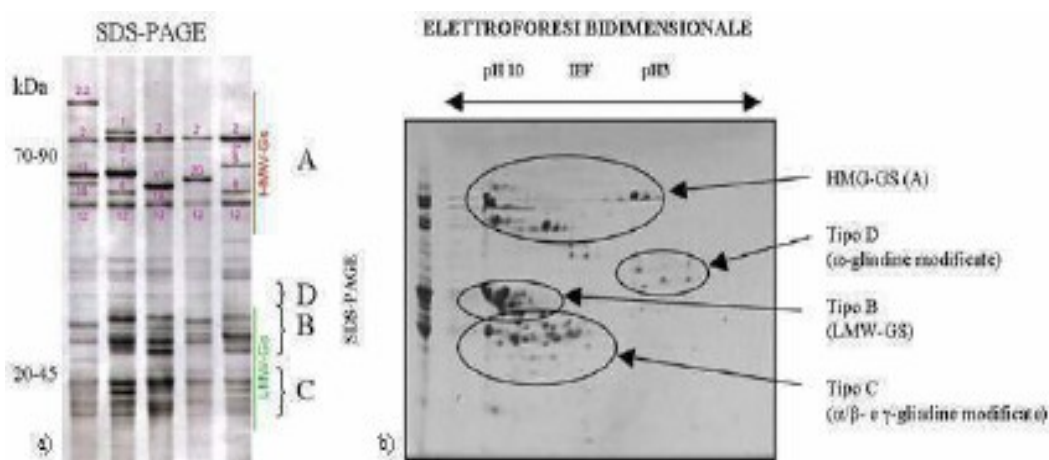
I geni che codificano per queste proteine sono localizzati sul braccio corto dei cromosomi dei gruppi 1 e 6. I *loci* che codificano per la maggior parte delle  $\alpha$ - e  $\beta$ - gliadine sono localizzati sui cromosomi della serie 6 e sono indicati come *Gli-2* (*Gli-A2*, *Gli-B2*, *Gli-D2*), mentre quelli codificanti la maggior parte delle  $\gamma$ - e  $\omega$ -gliadine sono localizzati sui cromosomi della serie 1 e sono indicati come *Gli-A1* (*Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*). I *loci* che codificano per le  $\alpha/\beta$ -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  $\gamma$ -gliadine è stato identificato un numero di geni compreso tra 17 e 39 e per le  $\omega$ -gliadine da 15 a 18 (Reeves *et al.*, 1986; Sandhu *et al.*, 2002).

Le **glutenine** sono proteine polimeriche con un peso molecolare che può variare da 60 KDa 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:

- gruppo A: ha un peso molecolare compreso tra 80 e 120 KDa e corrisponde alle subunità delle glutenine ad alto peso molecolare (HMW-GS);
- 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  $\alpha$ - e  $\gamma$ -gliadine;
- gruppo D: deriva anch'esso dalle LMW-GS, ma è costituito prevalentemente da proteine acide simili alle  $\omega$ -gliadine (Gianibelli, 2001).

In Fig. 4 sono riportate le frazioni gluteniniche separate mediante SDS-PAGE monodimensionale e bidimensionale (D'Ovidio *et al.*, 2003; Martinez Ma del Carmen *et al.*, 2004)

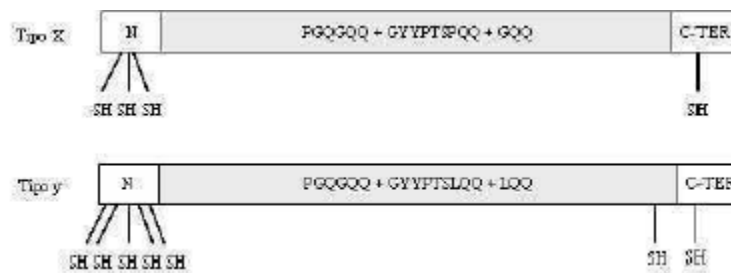


**Figura 4.** a) Classificazione e peso molecolare delle subunità delle glutenine comprese nei gruppi A, B, C, D in SDS-PAGE monodimensionale; b) elettroforesi bidimensionale di subunità gluteniniche: sono indicati i tipi B- e C- delle HMW-GS e il tipo D- delle LMW-GS.

Le HMW rappresentano solo il 5-10% delle proteine totali della cariossida 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 90 KDa e sono caratterizzate da una regione centrale, ricca di glutamine e proline, responsabili dell'elasticità e flessibilità della struttura proteica, e da regioni terminali, che presentano struttura ad  $\alpha$ -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 manifesta un peso molecolare più elevato rispetto alla subunità y (Giroux *et al.*, 1998). Entrambe le subunità 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.5).



**Figura 5.** 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.

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 51 KDa; quelle del gruppo D invece hanno un peso molecolare tra 55 e 70 KDa e corrispondono a  $\omega$ -gliadine mutate, in quanto contengono una cisteina in più che risulta spaiata e induce un comportamento alterato. Le proteine del gruppo C invece hanno un peso molecolare compreso tra 30 e 40 KDa; 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).

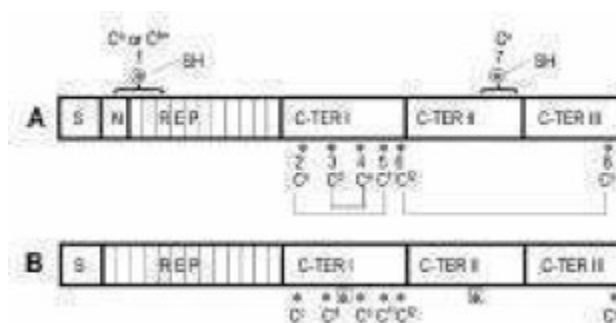
Sulla base delle caratteristiche strutturali dei gruppi B, C e D, è stata ipotizzata la possibilità di raggruppare le LMW-GS in 2 classi funzionali: una costituita dalla maggior parte delle subunità B e agisce come estensore dei polimeri in crescita grazie alla capacità di formare due ponti disolfuro inter-molecolari, l'altra costituita dalla 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 45 KDa e la sequenza aminoacidica N- terminale è SHIPGL.

Le LMW-m hanno un peso tra 30 e 40 KDa 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. 6).



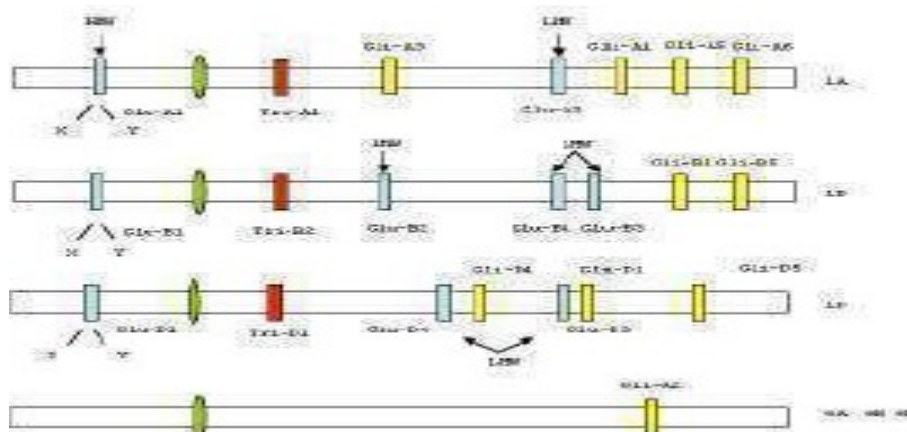
**Figura 6.** Struttura delle LMW-GS dedotta dai geni codificanti. a: LMW- m e LMW- s type; b: LMW- i type. S: peptide segnale; N: regione N- terminale; REP: dominio ripetitivo; C- TER: regione C terminale; gli asterischi cerchiati (a) indicano dei residui di cisteina che molto probabilmente sono coinvolti in ponti disolfuro intermolecolari; gli asterischi quadrati (b) indicano i due residui cisteinici in più, presenti nelle LMW- GS di tipo i.



Le LMW-GS sono codificate dai *loci Glu-3A, Glu-3B e Glu-3*, 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  $\gamma$ - e  $\omega$ -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.7).



**Figura 7.** 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  $\alpha/\beta$  - e delle  $\gamma$ -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 1167 bp, 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 ripetute 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  $\beta$ -foglietto, mentre nel dominio C-terminale ci sarebbe una predominanza di  $\alpha$ -eliche; questi risultati teorici, sono supportati da studi di predizione della struttura proteica secondaria (Field *et al.*, 1987).

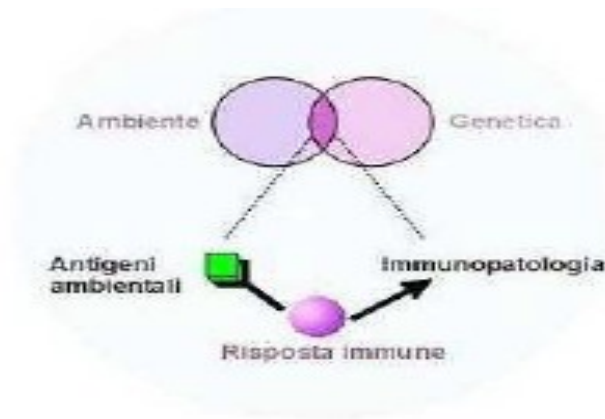
## **7. CELIACHIA**

### **7.1 Definizione e prevalenza**

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

La celiachia si può definire 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. 8); 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 al 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. 9).



**Figura 8.** Interazione ambiente-genetica responsabile della patogenesi della celiachia



**Figura 9.** Sezione di intestino sano (sinistra) e intestino colpito da celiachia

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 (Kolho *et al.*, 1998; Berti *et al.*, 2000) e, pertanto, 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).

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 dall'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).

Appare evidente quindi che la celiachia è 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.

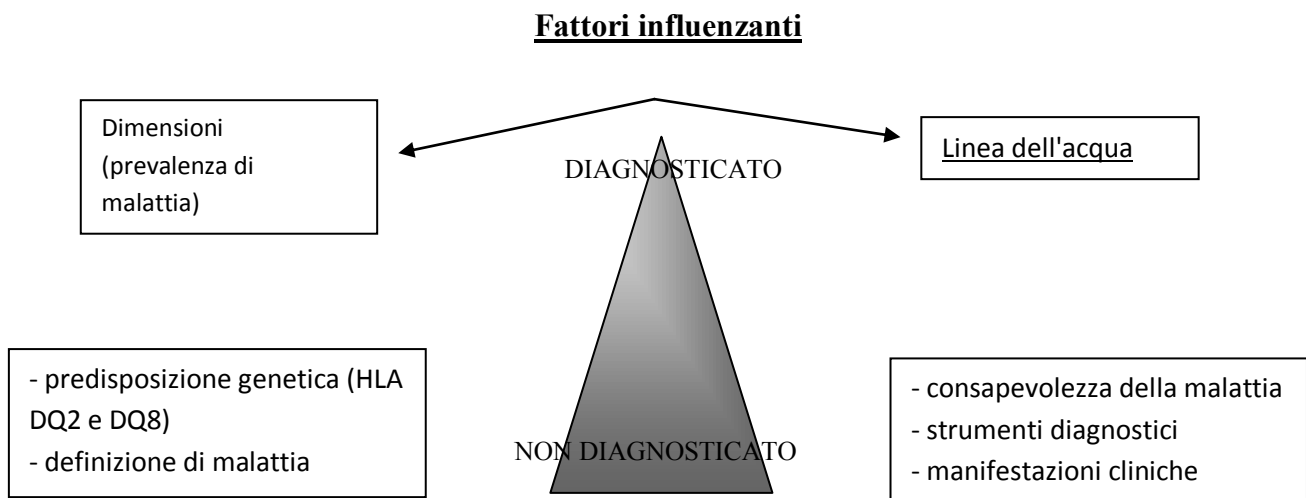
Quanto detto è esemplificato nel modello di Logan del 1992, che rappresenta la celiachia come un iceberg (Fig. 10). In questo modello la reale prevalenza della malattia può essere considerata come l'intero iceberg, le cui dimensioni sono influenzate dalla frequenza della predisposizione genetica nella 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, 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.



**Figura 10.** 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.

## 7.2 Eziopatogenesi

Alla base della patogenesi della malattia celiaca vi è una serie di meccanismi che coinvolgono fattori ambientali, genetici e immunologici (Meeuwisse 1970). Il fattore ambientale che in assoluto svolge un ruolo di primo piano è il glutine che 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 del frumento implicate nell'insorgenza della malattia sono le gliadine, caratteristica peculiare di queste sostanze è l'elevato contenuto in glutamina (>30%) e prolina (>15%).

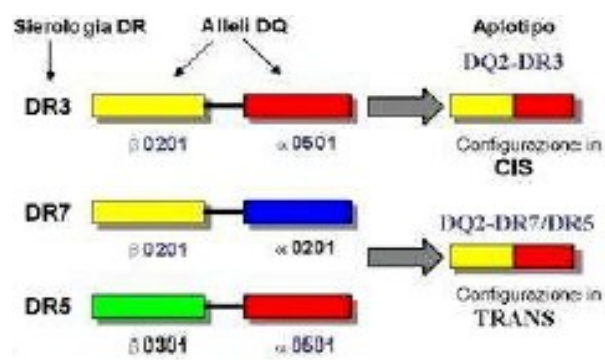
Studi recenti hanno dimostrato che l'avenina, frazione prolaminica dell'avena, nonostante le evidenti somiglianze strutturali con le prolamine tossiche, sarebbe relativamente ben tollerata dai pazienti celiaci. La spiegazione potrebbe risiedere nel minor contenuto in prolina dell'avenina e nel

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  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\omega$ -gliadine, con un peso molecolare che varia da 30 a 75 kDa; la gliadina A è la componente più importante delle  $\alpha$ -gliadine e sembra essere la frazione più direttamente coinvolta nell'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.

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. 11).



**Figura 11.** 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 abbia risposta 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 tissutale.

In condizioni fisiologiche l'epitelio intestinale, grazie alle *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*, portando allo sviluppo di una risposta immunitaria che si traduce in uno stato di tolleranza antigenica (Fasano *et al.*, 2001; Fasano 2001).

L'integrità delle *tight junctions*, e quindi la permeabilità dell'epitelio intestinale, nelle prime fasi della celiachia risulta alterata; si ha quindi 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).

La gliadina superata la barriera intestinale interagisce con un enzima extracellulare, la transglutaminasi tissutale (tTG), che catalizza una reazione calcio-dipendente di deaminazione di uno specifico residuo glutammico, convertendo la glutammina in acido glutammico carico negativamente. La gliadina acquisisce, quindi, 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+ (Schuppan 2000; Molberg *et al.*, 2000).

L'attivazione linfocitaria porta alla selezione di cloni specifici per la gliadina con produzione sia di anticorpi verso la gliadina stessa, che 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).

Secondo un modello recentemente proposto 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 immodificate, 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 stimolano l'espansione di cloni di cellule B autoreattive e 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 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).

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).

Appare chiaro che nella patogenesi della celiachia i fattori genetici siano importanti tanto quanto i fattori ambientali.

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

### **7.3 Aspetti clinici**

In base alle modalità di presentazione clinica e alle alterazioni istologiche e immunologiche al momento della diagnosi sono state a lungo riconosciute quattro forme cliniche della celiachia: classica o tipica, atipica, silente e latente o potenziale.

Questa classificazione è stata recentemente modificata ed è stata introdotta una nomenclatura più semplice e chiara con cui si distinguono tre tipologie di malattia celiaca: maggiore, minore e latente (Di Sabatino e Corazza, 2009).

La malattia può insorgere in qualsiasi periodo della vita; spesso la forma classica si manifesta tra il sesto e il ventiquattresimo mese, a seguito dello svezzamento, 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 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; 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).

- I. Forme atipiche. Nell’ultimo decennio si è assistito ad un’evidente modificazione nelle modalità di presentazione della malattia. 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.

È 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. Gli altri sintomi possono correlarsi ad anemia da carenza di ferro (soprattutto se refrattaria a terapia parziale), ipertransaminasemia ( il cui aumento deve essere persistente o ricorrente una volta che siano state escluse le altre cause più comuni di epatopatia), comparsa e persistenza di afte, 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 (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 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 carenza 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 esprime però a livello cutaneo. La dieta priva di glutine risolve la sintomatologia.

- II. Forma silente. Forma di malattia che 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 l'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.

III. 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.

IV. 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 se (positività degli anticorpi, ma non ancora danno intestinale) (Bertini *et al.*, 2000).

## 7.4 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.

Sono due le teorie più accreditate:

- la presenza di un insieme di geni che predispone ai fenomeni autoimmunitari in genere, per cui è più facile un'associazione di più malattie autoimmunitarie;
- la malattia celiaca favorisce l'esordio di altre malattie autoimmuni in soggetti geneticamente predisposti.

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) (Volta *et al.*, 1997).

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). Diversi studi hanno dimostrato che il 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 perniciosa, 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.

### **7.5 Immunogenicità della gliadina**

Recenti studi (Wieser, 1996; Mowat, 2003; Ciccocioppo *et al.*, 2005) hanno dimostrato che la struttura tridimensionale della gliadina non è indispensabile per l'attivazione della risposta immunitaria, per cui l'attenzione è stata rivolta ai peptidi della gliadina che 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' $\alpha$ - 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).

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), con conseguente 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).

Sotto ponendo i linfociti T a test di proliferazione in presenza di frazioni purificate di gliadina, sono stati individuati i seguenti frammenti proteici che contengono i seguenti epitopi:

- a. la sequenza corrispondente alla regione 206-216 al C- terminale dell' $\alpha$ -gliadina. Questo epitopo risulta essere la sequenza minima necessaria per stimolare i linfociti T HLA-DQ8
- b. il frammento sintetico corrispondente alla regione 57-73 dell' $\alpha$ -gliadina. Il 57% dei pazienti celiaci presenta, a livello sierico, IgA che riconoscono questo peptide
- c. i peptidi  $\alpha$ -2 glia e  $\alpha$ -9 glia, corrispondenti rispettivamente alle sequenze 62-75 e 57-68 dell' $\alpha$ -gliadina che somministrati a pazienti in GFD determinano un peggioramento del quadro clinico, una riduzione significativa del rapporto altezza villi: profondità cripte e un aumento del numero di linfociti intraepiteliali utilizzati
- d. l'epitopo  $\alpha$ -20 glia , isolato da una serie di peptidi sintetici,
- e. il frammento 33-mer corrispondente alla regione 56-88 dell' $\alpha$ -gliadina, contiene 6 copie parzialmente sovrapposte dei 3 epitopi principali riconosciuti dai linfociti T e li stimola maggiormente rispetto ai peptidi più corti ( $\alpha$ -2 glia,  $\alpha$ -9 glia e  $\alpha$ -20 glia) contenenti uno solo degli epitopi, è resistente *in vitro* ad incubazione prolungata con proteasi pancreatiche e gastriche ed è ricco in proline, che rappresentano il 40% dei residui
- f. il frammento 26-mer di  $\gamma$ 5-gliadina resistente alle proteasi pancreatiche e a quelle dell'orletto a spazzola come il 33-mer, pur essendo meno stabile.

Da questi studi sono state, inoltre, individuate cinque principali sequenze *consensus* riconosciute dai linfociti B:

- a. regione 33-65 dell' $\alpha$ -gliadina, riconosciuta sia da IgA che IgG

- b. regione 167-172 dell' $\alpha$ -gliadina; per le IgA il riconoscimento copre l'intera sequenza *consensus*, per le IgG è ristretto
- c. regione 239-244 dell' $\alpha$ -gliadina; anche in questo caso la sequenza riconosciuta dalle IgG è più ristretta
- d. regione 256-262 dell' $\alpha$ -gliadina, riconosciuta sia da IgA che da IgG.
- e. regione 115-118 della  $\gamma$ -gliadina. Dagli stessi studi è emerso che per gli ultimi due epitopi la deamidazione sito-specifica operata della 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; (Arentz-Hansen *et al.*, 2002, 2004)
- 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);
- 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).

L'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).

Invece, 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).

## **7.6 Possibilità terapeutiche**

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 50 mg, ben lontano dai 13 g 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  $\alpha$ -2 gliadina,  $\alpha$ -9 gliadina e  $\alpha$ -20 gliadina 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' $\alpha$ -gliadina con la prolina 67 sostituita da alanina; questa singola sostituzione sembra ridurre la produzione di INF- $\gamma$  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).

## 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. 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 incentrata sulla identificazione di una terapia alternativa ad una dieta *gluten free* ed a tale scopo è stata recentemente posta particolare attenzione al ruolo cardine di un particolare gruppo di batteri, i lattobacilli, e al loro utilizzo come starter in impasti realizzati solo con acqua e farina, per la produzione dei prodotti da forno, ed in particolare di pane (Di Cagno *et al.*, 2002, 2004, 2005).

Nel presente lavoro è stata valutata l'attività proteolitica di batteri lattici isolati da paste acide tradizionali della Sicilia, provenienti dalle province di Catania, Enna, Palermo e Siracusa. In particolare è stata valutata la capacità di tali microrganismi di degradare la gliadina utilizzando sfarinati appartenenti a varietà antiche quali il Monococco ID331 e la Timilia.

## MATERIALI E METODI

### 8. ISOLAMENTO E STUDIO FENOTIPICO DI BATTERI LATTICI DA PASTE ACIDE

I campioni di paste acide, impiegati nel presente lavoro, sono stati forniti da diverse aziende siciliane, ubicate nelle zone di Catania, Enna, Palermo e Siracusa. Tutti i campioni sono stati trasportati in laboratorio e conservati a 4°C fino al momento dell'utilizzo.

Una porzione del peso di 10 g di ciascun campione è stata addizionata a 90 mL di *quarter-strength Ringer solution* ed omogeneizzata mediante Stomacher (Brinkmann, Westbury, NY, USA) per 5 minuti. Diluizioni seriali sono state inoculate in piastra impiegando la tecnica dell'inclusione. I terreni utilizzati sono stati:

- MRS agar (Oxoid), addizionato di cicloesimide ed acidificato fino a pH 5.60, per l'isolamento dei lattobacilli mesofili;
- SDB agar, composto da maltosio 2%, yeast extract 0,3%, estratto di lievito fresco da 0.5 a 1.5%, tween 80, 0.03%, triptone 0.6%, acidificato a pH 5.60 mediante utilizzo di acido lattico o acido cloridrico da 1N a 6N. L'estratto fresco di lievito è stato preparato seguendo il protocollo riportato da Kline and Sugihara (1971), mediante sterilizzazione a 121°C per 30 minuti di una sospensione al 20% di lievito commerciale compresso in acqua distillata. Dopo la sterilizzazione la soluzione è stata conservata a +4°C per 12 ore in modo da far decantare la sospensione e prelevare il surnatante. Tale terreno di coltura è stato utilizzato per l'isolamento di *Lactobacillus sanfranciscensis*

Le piastre sono state incubate a 30°C per 72 ore.

Allo scopo di studiare la popolazione di batteri lattici, dalle piastre a diluizione più elevata, sono state isolate in modo randomizzato, colonie di presunti batteri lattici. Ciascuna colonia è stata sottoposta a successive purificazioni con il metodo dello striscio su terreno MRS agar.

Tutti i ceppi isolati sono stati sottoposti alle seguenti caratterizzazioni fenotipiche:

- morfologia cellulare. È stata valutata la morfologia coccica o bastoncellare dei vari ceppi mediante osservazione al microscopio ottico;
- prova della catalasi. La catalasi è un enzima prodotto dalla maggior parte dei batteri e serve loro a scindere l'acqua ossigenata con conseguente rilascio di ossigeno libero;
- colorazione di Gram. La morfologia dei batteri lattici può essere osservata mediante la colorazione di Gram, colorazione policromatica che consente di dividere i batteri in due gruppi: Gram-positivi e Gram-negativi.

Gli isolati Gram positivi e catalasi negativi sono stati conservati a -20°C in glicerolo per utilizzarli nelle successive analisi



## 9. CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA DEI BATTERI LATTICI ISOLATI

Al fine di identificare e caratterizzare i ceppi dal punto di vista genotipico, si è proceduti all'estrazione del DNA totale e all'amplificazione specie-specifica degli isolati mediante PCR-multiplex del gene *tuf* per la ricerca di *L. rhamnosus*, *L. paracasei* ed *L. casei*, e del gene *Rec A* per la ricerca di *L. plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus*. Successivamente si è proceduti all'analisi del polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) del 16S DNA ribosomiale (rDNA) dei ceppi non amplificati.

### 9.1 Estrazione del DNA totale.

Culture cellulari (1.5 mL), in fase esponenziale, sono state poste in *ependorf* sterili e quindi centrifugate a 8000 rpm per 10 minuti a 15°C. Eliminato il surnatante, il *pellet* è stato lavato con 1 mL di TE buffer (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8,0) e centrifugato nuovamente a 8000 rpm per 10 minuti a 15°C. Successivamente il *pellet* è stato risospeso in 500 µL di TE buffer e trasferito in *ependorf* sterili contenenti ciascuna 0.3 g di perline zirconate (diametro 0.1 mm), omogeneizzato mediante il *bead-beater* (Biospec) a 10000 rpm per 3 minuti e posto in ghiaccio per 1 minuto. Dopo centrifugazione a 13000 rpm per 5 minuti, il surnatante è stato trasferito in *ependorf* sterili, e posto a -20°C, fino al momento dell'uso.

### 9.2 *Tuf* gene multiplex PCR

La reazione di PCR è stata condotta su un volume totale di 25 microlitri contenente: 10 µl di master mix (5 PRIME MasterMix 2.5X), 1.5 µl di MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl di primer PAR (5'-GACGGTAAGATTGGTGA - 3'), 0.5 µl di primer CAS (5'-ACTGAAGGCGACAAGGA-3'), 0.5 µl di primer RHA (5'-GCGTCAGGTTGGTGTTG-3'), 0.5 ml di primer CPR (5'-CAANTGGATNGAACCTGGCTTT-3'), 10.5 µl di acqua ultrapura e 1 µl di DNA.

La reazione di amplificazione è stata condotta mediante utilizzo di termociclatore (Biometra Tpersonal), sotto le seguenti condizioni: 95°C per 5 minuti, 30 cicli di 95°C per 30 secondi, 54°C per 1 minuto e 72°C per 1 minuto e 30 secondi; estensione finale a 72°C per 7 minuti. I prodotti della PCR sono stati, quindi, visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% (w/v) (400 mM Tris-acetato e 10 mM EDTA; pH 8,0) contenente *Gel Red Nucleid Acids* (Biotium Inc., Hayward, CA), in tampone TAE 1X, al voltaggio di 7 V/cm. Come marker di peso molecolare è stato utilizzato il ladder 1Kb plus (INVITROGEN). Dopo la corsa le bande sono state visualizzate esponendo il gel all'azione di un transilluminatore a luce UV. Le immagini sono state acquisite tramite un apposito analizzatore di immagini, collegato al transilluminatore.

### **9.3 *Rec A* gene multiplex PCR**

Gli isolati che non presentavano amplificazione del gene *tuf*, sono stati identificati tramite *recA* gene multiplex PCR (Torriani *et al.*, 2001). La reazione di PCR è stata eseguita in un volume finale di 25 µl contenente 1 µl di DNA, 1.5 µl MgCl<sub>2</sub>, 10 µl di master mix (5 PRIME MasterMix 2.5x), 1 µl di primer PentF (5'-CAG TGG CGC GGT TGA TAT-3'), 1 µl paraF (5'-GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-3'), 0.5 µl di primer PlanF (5'-CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3'), 1 µl di pREV (5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3') e 9 µl di acqua ultrapura.

Il programma di amplificazione utilizzato è stato il seguente: denaturazione iniziale a 94°C per 3 min; 30 cicli a 94°C per 30 s, 56°C per 10 s e 72°C per 30 s; estensione finale a 72°C per 5 min. I prodotti della PCR sono stati, quindi, visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% (w/v) (400 mM Tris-acetato e 10 mM EDTA; pH 8,0) contenente *Gel Red Nucleid Acids* (Biotium Inc., Hayward, CA), in tampone TAE 1X, al voltaggio di 7V/cm. Come marker di peso molecolare è stato utilizzato il ladder 1Kb plus (INVITROGEN). Dopo la corsa le bande sono state visualizzate esponendo il gel all'azione di un transilluminatore a luce UV.

#### 9.4 Analisi PCR/RFLP del 16S rRNA

Gli isolati non identificati mediante *Tuf* e *RecA* sono stati sottoposti ad analisi PCR-RFLP del gene 16S dell'rRNA . I primers utilizzati per l'amplificazione del 16S rDNA sono stati il 7-*forward* (5'-AGAGTTTGATC/TA/CTGGCTCAG-3') e 1510-*reverse* (5'-ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991).

L'amplificazione del 16S rDNA è stata condotta sotto le seguenti condizioni: 94°C per 3 min, 30 cicli di 94°C per 30 sec, 52°C per 30 sec, e 68°C per 1,5 min; estensione finale a 68°C per 7 min.

I prodotti della PCR sono stati, quindi, visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1,2% (w/v) in tampone TAE 1X (400 mM Tris-acetato e 10 mM EDTA; pH 8,0).

L'analisi PCR/RFLP dei prodotti 16S rDNA è stata effettuata impiegando gli enzimi di restrizione *HaeIII* , *HpaII* e *AluI* (MBI Fermentas). Le reazioni sono state condotte in un volume finale di 20 µl contenente 10 µl di prodotto di PCR, 2 µl di tampone dell'enzima, 0.5 µl di enzima e 7.5 µl di acqua ultrapura. Dopo incubazione a 37°C per due ore è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% (89 mM Tris-borato, 89 mM acido borico, 2 mM EDTA; pH 8.0), contenente *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium Inc., Hayward, CA), impiegando come tampone di corsa TBE 1X. Il *marker* molecolare impiegato è stato 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen-Life Technologies, UK).

## 10. CAPACITÀ PROTEOLITICA DEI CEPPI DI BATTERI LATTICI ISOLATI

### 10.1 Degradazione del glutine in mezzo sintetico

Al fine di testare la capacità proteolitica dei ceppi di batteri lattici isolati da paste acide siciliane, gli stessi sono stati inoculati in terreno MRS broth ed incubati a 37°C per 18 ore; le cellule recuperate per centrifugazione sono state lavate due volte con tampone potassio fosfato 10mM (pH 7) , risospesi in acqua distillata sterile ed inoculati in terreno GMB contenente glutine di farina al 9%, glucosio 2%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1%, tween 80 0.1%.

Trascorso il periodo di incubazione a 30°C per 96 ore ed ottenuto il surnatante per centrifugazione (9000 g x 15 min), lo stesso è stato sottoposto ad elettroforesi, secondo protocollo di Laemmli, opportunamente modificato, utilizzando gel precast (Biorad) al 12% di acrilammide e successiva colorazione dei gels in argento secondo protocollo di Blum (Blum *et al.*, 1987). Come standard è stato utilizzato il low-range SDS PAGE (Biorad).

### 10.2 Saggi enzimatici

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

- i substrati, per valutare l'attività aminopeptidasica ed iminopeptidasica sono stati risospesi in metanolo 100% alla concentrazione di 20 mM, mentre i substrati per valutare l'attività di- e tri-peptidasica sono stati risospesi in dimetilsolfossido (DMSO) 20mM.
- i batteri sono stati fatti crescere in MRS broth per 24 ore a 37°C, centrifugati a 10.000 x g per 20 minuti, lavati due volte con un tampone fosfato 50 mM pH 7, centrifugati e risospesi nello stesso tampone. La concentrazione delle cellule è stata 10<sup>9</sup> UFC/ml.

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

Nella mix sono stati aggiunti:

- 900 µl di substrato enzimatico
- 100 µl di sospensione cellulare

Le mix sono state incubate in agitazione a 150 rpm a 37°C per 15 minuti (De Angelis *et al.*, 2010), la reazione è stata stoppata con 600 µl di acido acetico al 10%, e, successivamente centrifugata a 10.000 rpm per 10 min, la valutazione dell'attività enzimatica è stata effettuata attraverso lettura allo spettrofotometro a 410 nm.

Per l'attività di- e tri-peptidasica sono stati utilizzati i seguenti substrati: **Leu-Leu-Leu, Leu-Leu, Gly -Proline.**

Nelle mix di reazione sono stati aggiunti:

- 20 µl di substrato enzimatico
- 180 µl di sospensione cellulare.

Le mix sono state incubate in agitazione a 150 rpm a 37°C per 15 minuti.

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:

- 0.8 g ninidrina, 80 ml di etanolo, 10 ml di acido acetico
- 1 g di cadmio, 1 ml di H<sub>2</sub>O

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.

### **10.3 Capacità proteolitica in impasti sperimentali**

Per valutare la capacità dei ceppi selezionati sulla base delle prove preliminari di degradare le gliadine presenti in differenti sfarinati di frumento, si è proceduto con la preparazione di impasti sperimentali. La prova prevedeva l'inoculo dei ceppi selezionati in un impasto la cui formulazione

(% di acqua, sfarinato e inoculo) riproducesse la composizione della pasta acida tradizionale. Nella prima fase, condotta in laboratorio, tra i ceppi selezionati di batteri lattici è stato scelto quello che ha mostrato attività proteolitica più accentuata.

Il ceppo è stato inoculato in MRS broth, e fatto crescere per 24 h a 30°C. La brodocoltura è stata centrifugata a 7000 rpm per 15 minuti e il pellet di cellule è stato lavato due volte in acqua distillata sterile, al fine di eliminare residui di brodo colturale; questo è stato, infine, utilizzato per effettuare l'inoculo in un impasto costituito da sfarinato e acqua (impasto sperimentale).

Sono stati preparati due impasti, il primo costituito da 100 g di Monococco ID331 e 75 ml di acqua, il secondo con 100 g di Timilia e 90 ml di acqua, entrambi inoculati con  $10^9$  cell/g. Sono stati inoltre preparati due impasti di controllo senza inoculo batterico.

Tutti gli impasti sono stati incubati a 30°C per 24 ore e sottoposti ad estrazione delle 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).

### 10.3.1 Estrazione delle gliadine da sfarinato e pasta acida di Monococco e Timilia

Le gliadine sono state estratte direttamente dall'impasto utilizzando il metodo descritto da Osborne e modificato da Weiss *et al* (1993).

Un'aliquota di sfarinato (7.5g) ed una di pasta acida (12.75g) sono state diluite in 30 ml di tampone TRIS-HCl 50mM pH 8.8, contenente l'1.5% di polivinilpolipirrolidone per rimuovere i tannini dagli sfarinati. Le sospensioni sono state mantenute a 4°C per un'ora vortexando ad intervalli di 15 minuti e centrifugando a 20.000 rpm per 20 minuti. Il surnatante contiene albumine e globuline.

Al fine di minimizzare la contaminazione da albumine, globuline e prolamine i pellets sono stati estratti nuovamente con tampone TRIS-HCl pH 8.8 contenente polivinilpolipirrolidone ed i surnatanti eliminati.

Dopo lavaggio con acqua distillata per rimuovere gli ioni del tampone, i pellets sono stati risospesi in 30 ml di etanolo al 75% e tenuti in agitazione per 2 ore a 25°C. I surnatanti contengono prolamine. L'estrazione in etanolo viene ripetuta due volte. Per eliminare i residui di etanolo si procede al lavaggio in acqua distillata.

I pellets vengono diluiti in 30 ml di tampone SDS-DTT (TRIS- HCl 50mM pH 8,8; SDS 1%; DTT 0,5%) e tenuti 2 ore a temperatura ambiente vortexando di tanto in tanto e centrifugando. I surnatanti contenenti gliadine sono stati conservati a -80°C per le successive analisi.

### 10.3.2 SDS-PAGE

Le proteine estratte dagli impasti fermentati sono state separate su Glicina-SDS-PAGE in gels precast al 12% di acrilamide e rivelati in blu comassie, secondo protocollo di Laemli opportunamente modificato (Laemli, 1970).

Il buffer di estrazione è così costituito:

- TRIS-HCl 0,5M pH 6,8
- Glicerolo
- SDS 10%
- $\beta$  mercaptoetanolo
- blu di bromo fenolo
- acqua distillata

Il tampone di corsa è il tampone glicina pH 8.3.

Ogni campione è stato diluito 1:1 con il buffer di estrazione, riscaldato a 95°C per 5 minuti e caricato per un volume pari a 30  $\mu$ l.

Le condizioni di corsa utilizzate sono state le seguenti:

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

Conclusa la corsa il gel è stato posto in soluzione colorante composta da acido acetico, metanolo, Blu Coomassie R 250, acqua deionizzata per circa un'ora in agitazione basculante.

Conclusa la colorazione il gel è stato posto in soluzione decolorante composta da metanolo, acido acetico ed acqua deionizzata.



## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **11. ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DEGLI ISOLATI**

#### **11.1 Isolamento e studio fenotipico di batteri lattici da paste acide**

Da otto campioni di paste acide Siciliane sono stati isolati un numero rappresentativo di batteri lattici.

Tra tutti quelli sottoposti ad identificazione fenotipica tramite osservazione al microscopio, test della catalasi e colorazione di Gram, 54 ceppi sono risultati appartenenti al gruppo dei batteri lattici essendo risultati negativi al test della catalasi e positivi alla colorazione di GRAM.

#### **11.2 Caratterizzazione genotipica dei batteri lattici isolati**

I 54 ceppi isolati sono stati sottoposti ad identificazione genotipica mediante amplificazione specie-specifica degli isolati mediante PCR-multiplex del gene *tuf* per la ricerca di *L. rhamnosus*, *L. paracasei* ed *L.casei*, e del gene *Rec A* per la ricerca di *L.plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus*. Successivamente si è proceduto all'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) della subunità 16S del DNA ribosomiale (rDNA) dei ceppi non amplificati.

Le indagini condotte hanno portato ai seguenti risultati:

- 41 ceppi risultano appartenere alla specie *Lactobacillus sanfrancisciensis*
- 11 ceppi risultano appartenere alla specie *Lactobacillus pentosus*
- 1 ceppo risulta appartenere alla specie *Lactobacillus plantarum*

## 12. DEGRADAZIONE DEL GLUTINE IN MEZZO SINTETICO

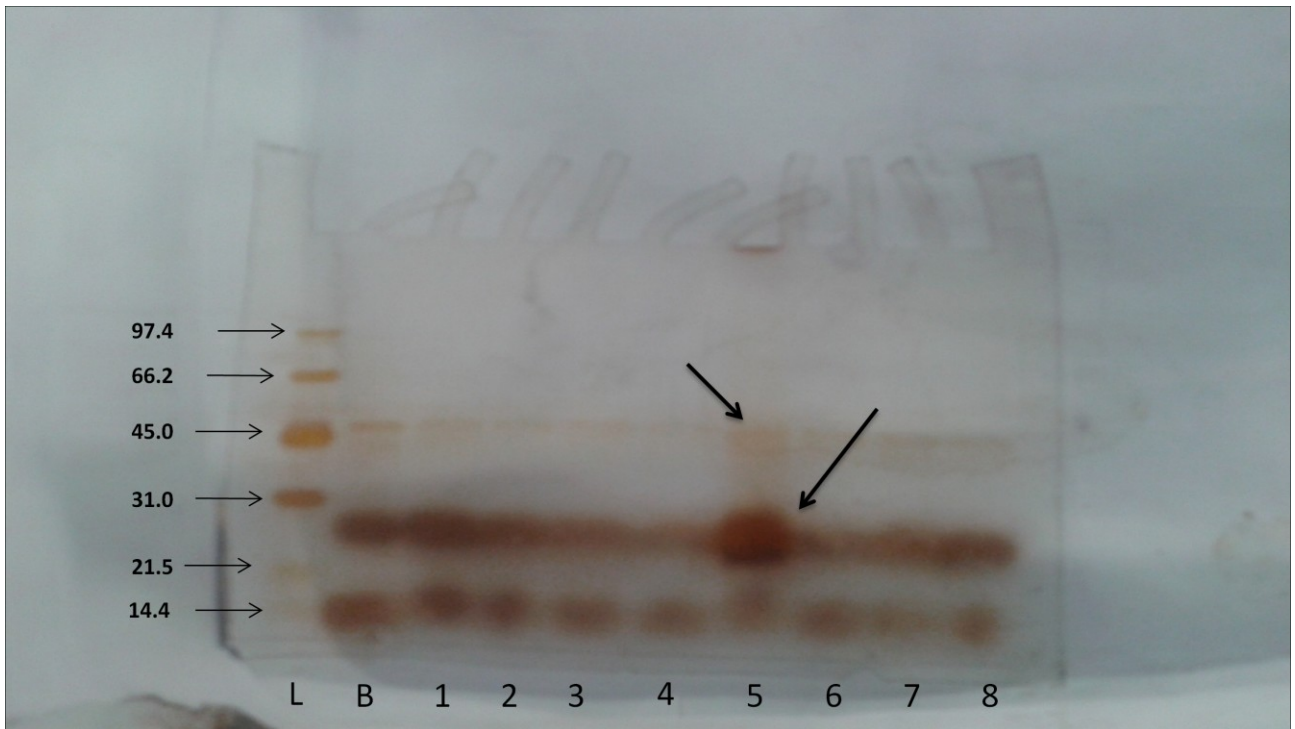
Tutti i 54 ceppi isolati sono stati fatti crescere in terreno contenente glutine al fine di testare la loro capacità proteolitica e i surnatanti, recuperati per centrifugazione, sono stati sottoposti a SDS-PAGE.

Tutti i campioni sottoposti ad elettroforesi hanno mostrato attività proteolitica su peptidi compresi tra 97.4 kDa e 66.2 kDa ed anche sui peptidi di peso superiore ai 97.4 kDa, come già rilevato dalla letteratura (Gerez *et al*, 2005), e come mostrato nelle figure da 12 a 18.

Alcuni ceppi, inoltre, hanno evidenziato attività proteolitica su peptidi con pesi molecolari tra 66.2 kDa e 45 kDa; in particolare si è assistito alla scomparsa della banda corrispondente a circa 66.2 kDa (Figg. da 12 a 18).

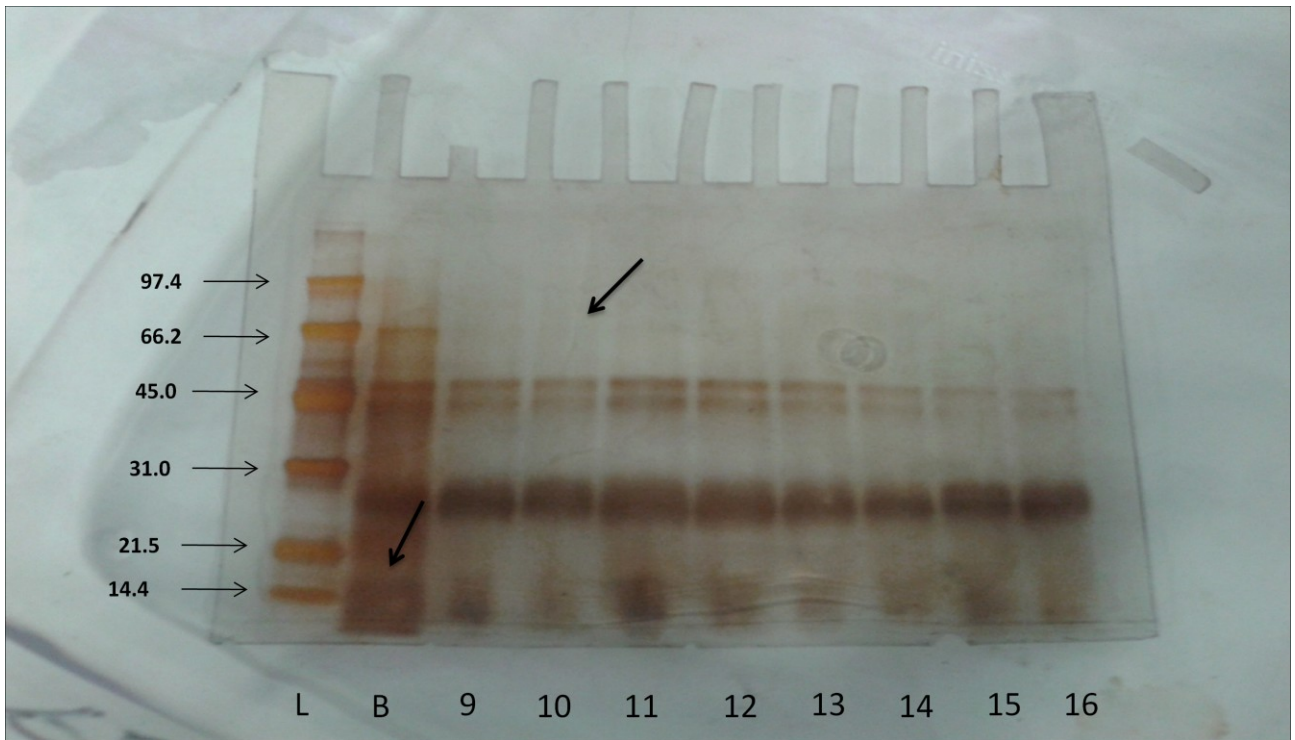
I ceppi di batteri isolati hanno mostrato, inoltre, un'elevata attività proteolitica su peptidi con pesi molecolari compresi tra 45 e 21.5 kDa, in particolare per il ceppo n. 5 di *Lactobacillus sanfranciscensis* per il quale si nota come la banda compresa tra 31 e 21.5 kDa si separa in due bande ben distinte (Fig. 12).

Si può inoltre osservare come i peptidi a minor peso molecolare, quindi le bande comprese tra 21.5 e 14.4 kDa, siano stato completamente idrolizzate (Figg. da 12 a 18).



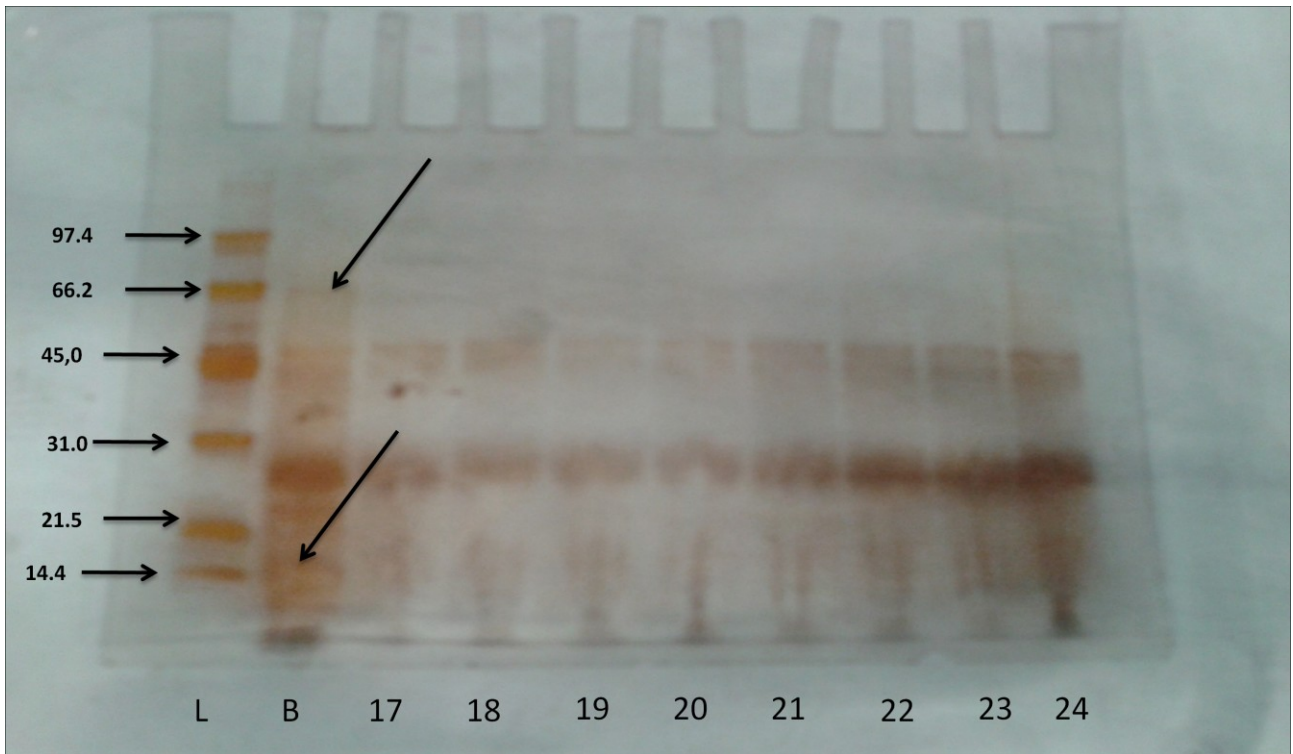
**Figura 12.** Profilo elettroforetico in SDS-PAGE per i ceppi di batteri lattici 1-8 appartenenti al genere *Lactobacillus*

**L** = Low-Range SDS PAGE ladder; **B** = GMB medium non inoculato; **1** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **2** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **3** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **4** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **5** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **6** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **7** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **8** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*



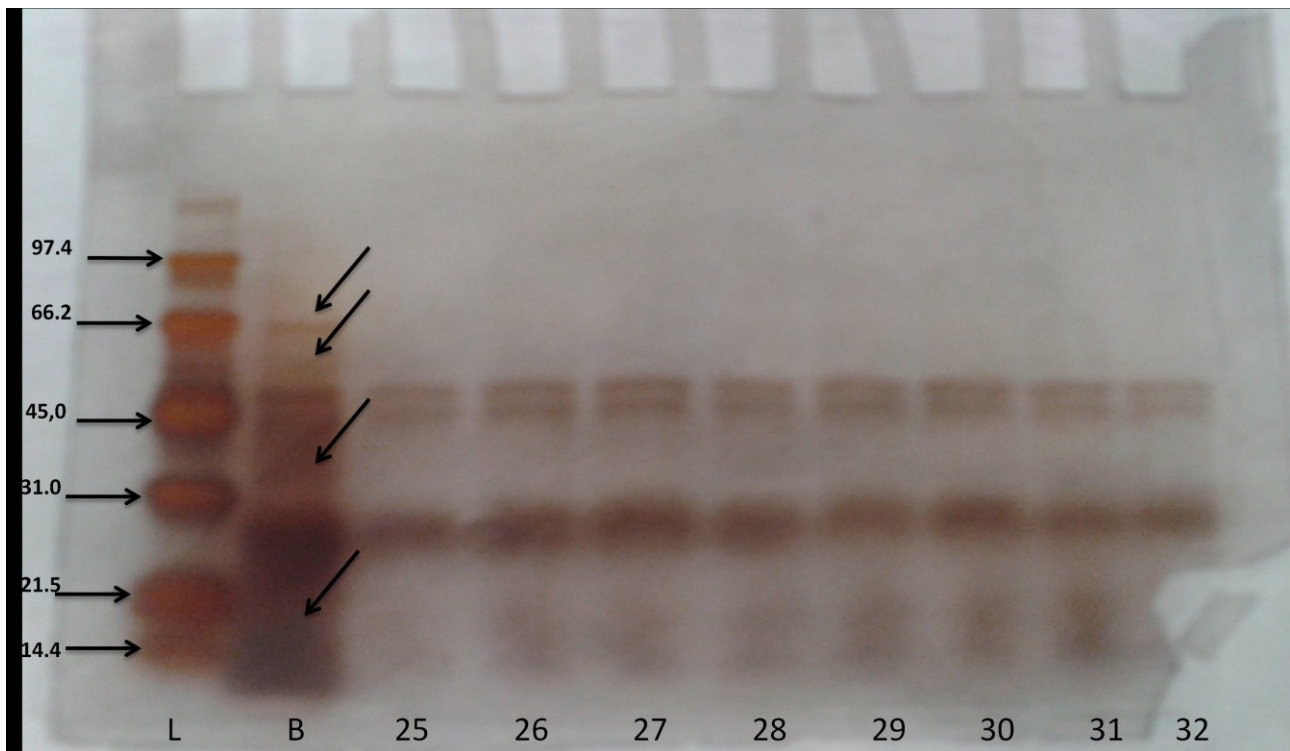
**Figura 13.** Profilo elettroforetico in SDS-PAGE per i ceppi di batteri lattici 9-16 appartenenti al genere *Lactobacillus*

**L** = Low-Range SDS PAGE ladder; **B** = GMB medium non inoculato; **9** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **10** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **11** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **12** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **13** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **14** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **15** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **16** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*



**Figura 14.** Profilo elettroforetico in SDS-PAGE per i ceppi di batteri lattici 17-24 appartenenti al genere *Lactobacillus*

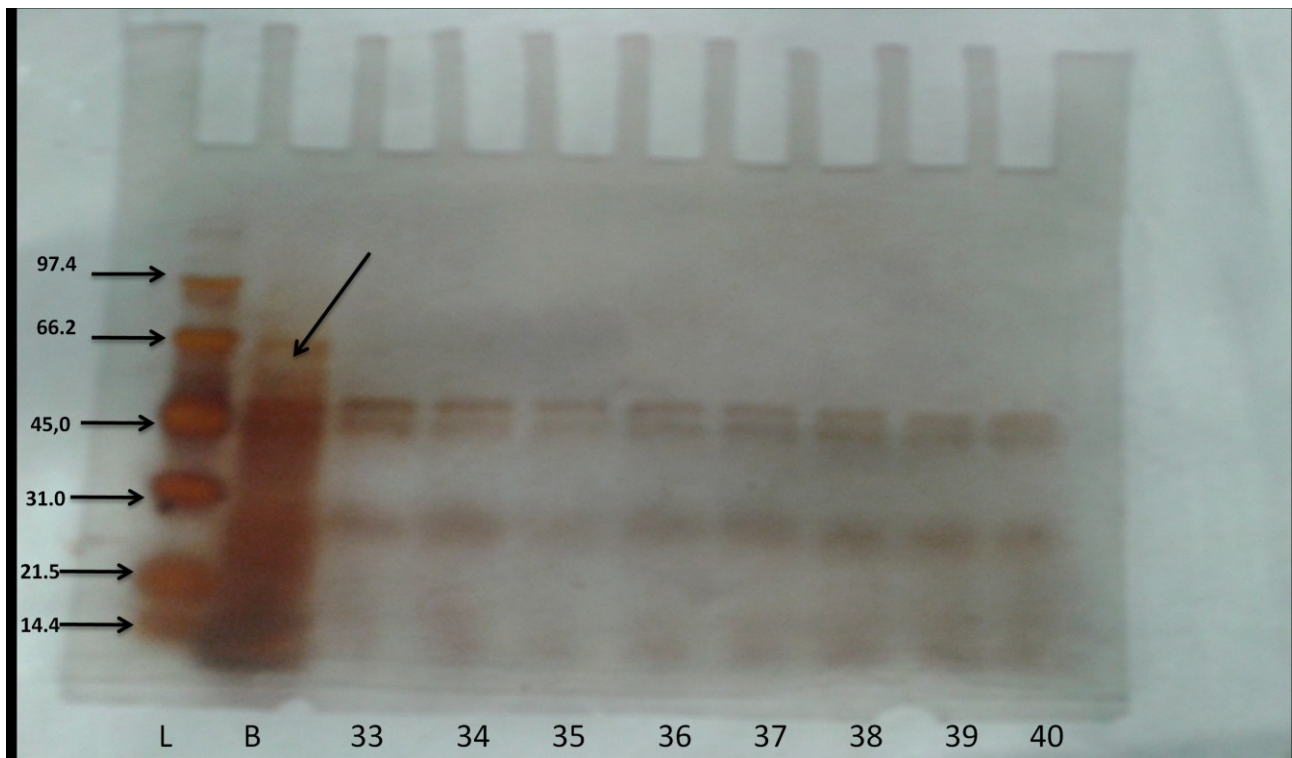
**L** = Low-Range SDS PAGE ladder; **B** = GMB medium non inoculato; **17** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus* ; **18** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **19** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **20** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **21** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **22** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **23** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **24** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*



**Figura 15.** Figura 3. Profilo elettroforetico in SDS-PAGE per i ceppi di batteri lattici 25-32 appartenenti al genere *Lactobacillus*

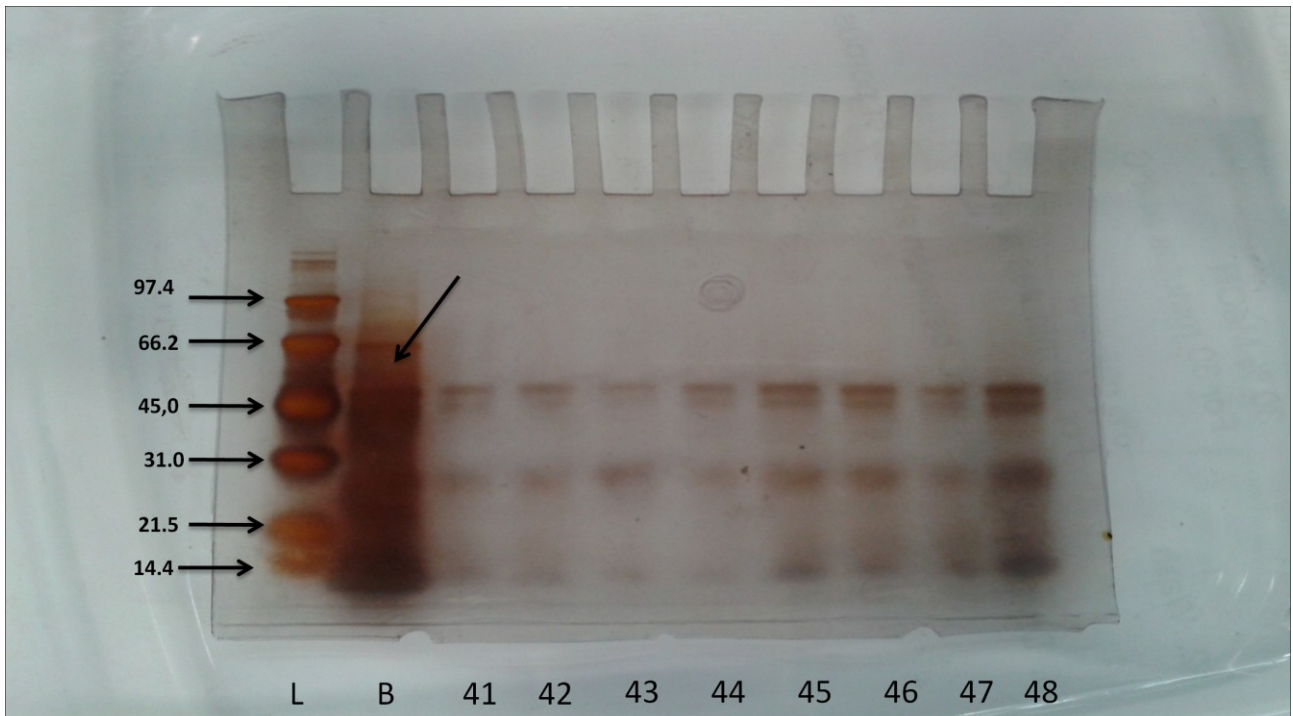
**L** = Low-Range SDS PAGE ladder; **B** = GMB medium non inoculato; **25** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus* ; **26** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **27** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **28** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **29** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **30** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **31** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **32** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*





**Figura 16.** Figura 3. Profilo elettroforetico in SDS-PAGE per i ceppi di batteri lattici 33-40 appartenenti al genere *Lactobacillus*

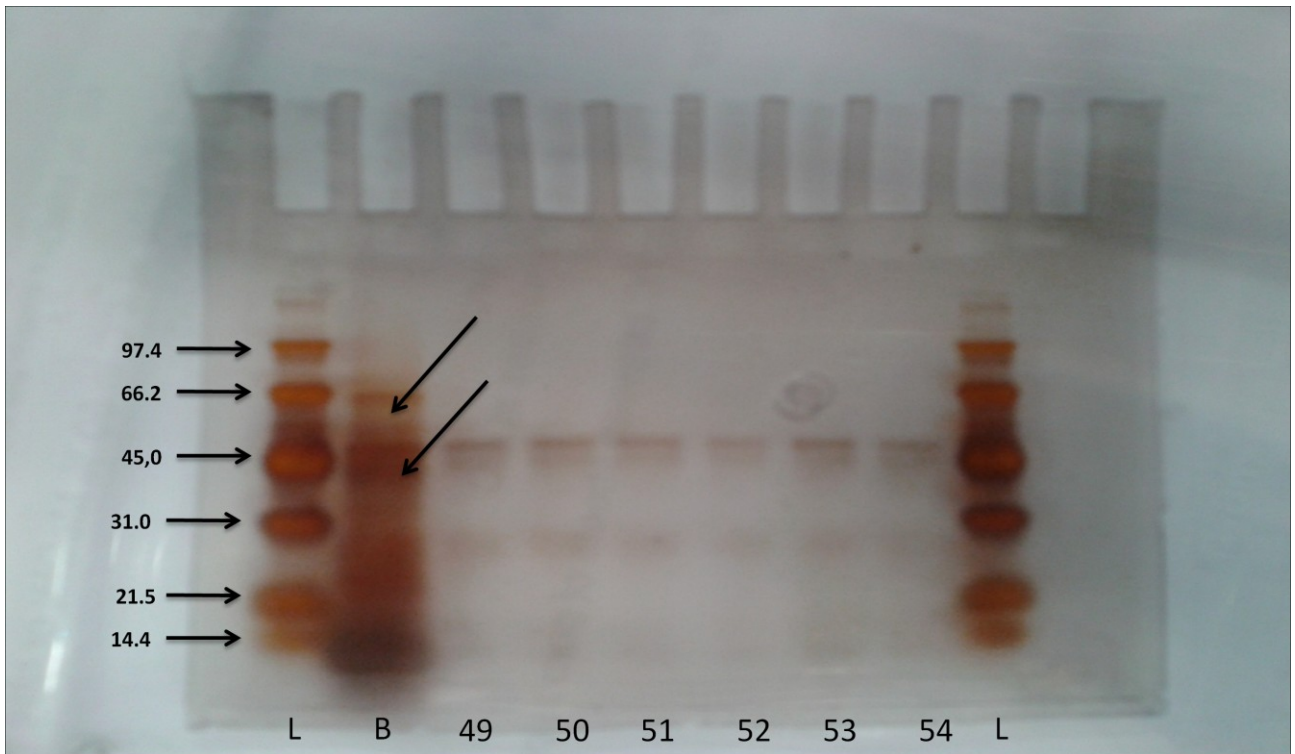
**L** = Low-Range SDS PAGE ladder; **B** = GMB medium non inoculato; **33** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus* ; **34** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **35** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **36** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **37** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **38** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **39** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **40** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*



**Figura 17. Figura 3. Profilo elettroforetico in SDS-PAGE per i ceppi di batteri lattici 41-48 appartenenti al genere *Lactobacillus***

**L** = Low-Range SDS PAGE ladder; **B** = GMB medium non inoculato; **41** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus* ; **42** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*; **43** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus plantarum*; **44** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **45** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **46** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **47** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **48** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus sanfranciscensis*





**Figura 18. Profilo elettroforetico in SDS-PAGE per i ceppi di batteri lattici 49-54 appartenenti al genere *Lactobacillus***

**L** = Low-Range SDS PAGE ladder; **B** = GMB medium non inoculato; **49** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **50** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **51** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus plantarum*; **52** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **53** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*; **54** = GMB medium inoculato con *Lactobacillus pentosus*

### 13. SAGGI ENZIMATICI

I saggi condotti su L-Leucina-p nitroanilide, L-Prolina-p nitroanilide, Leucina–Leucina, Leucina–Leucin–Leucina e Glicina–Prolina sono riassunti in **tabella 3**, ed espressi come percentuale dei ceppi che hanno dato positività all'idrolisi del peptide sintetico.

La scelta dei peptidi impiegati per la valutazione dell'attività proteolitica dei ceppi su un substrato di sintesi deriva dal fatto che gli amminoacidi prolina, leucina e glicina sono quelli maggiormente presenti nelle sequenze aminoacidiche degli epitopi tossici della gliadina (Rollàn *et al.*, 2005).

**Tabella 3.** Percentuali di positività dei saggi enzimatici su diversi peptidi

PEPTIDE	PERCENTUALE DI POSITIVITÀ (%)
<i>L-Leucina- p nitroanilide</i>	68.5
<i>L-Prolina p nitroanilide</i>	16.6
<i>Leucina – Leucina</i>	57.4
<i>Leucina – Leucina – Leucina</i>	88.8
<i>Glicina – Prolina</i>	16.6

---

## 14. CAPACITÀ PROTEOLITICA IN IMPASTI SPERIMENTALI

A seguito dei risultati ottenuti nei saggi enzimatici un ceppo di *L. pentosus*, che presentava attività proteolitica più elevata, è stato scelto per l'inoculo in impasti sperimentali di Timilia e Monococco.

Le frazioni proteiche sono state estratte e separate utilizzando un gel di poliacrilamide in Glicina e precast gel (Biorad) di acrilamide al 12%.

Le proteine sono state estratte sia da sfarinato, sia da impasto non inoculato, sia da impasto inoculato.

Il risultato ottenuto dall'analisi elettroforetica (Fig. 19) ha permesso di dimostrare come il ceppo analizzato possiede una attività proteolitica sulla gliadina.

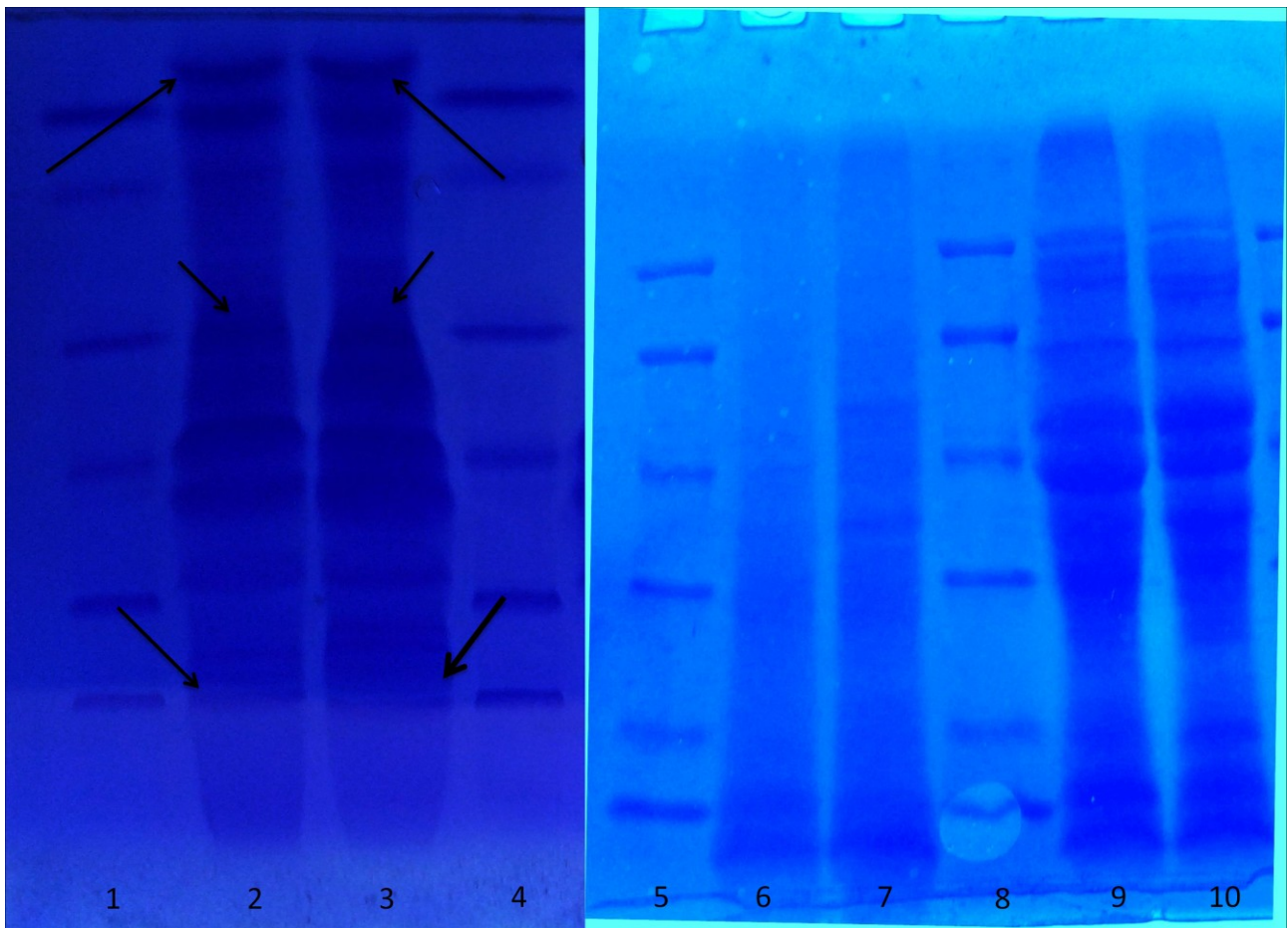
Dall'osservazione comparativa dei profili elettroforetici ottenuti per gli sfarinati di Monococco e Timilia e dei rispettivi impasti inoculati con il ceppo selezionato di *L. pentosus*, è possibile osservare che per pesi molecolari superiori ai 94 kDa sia presente una banda in entrambi i profili degli sfarinati. La stessa non è, invece, presente nei profili elettroforetici di entrambi gli impasti fermentati inoculati con *L. pentosus*.

Un risultato analogo si ha in corrispondenza della banda a 45 kDa che è presente nei profili degli sfarinati, contrariamente agli impasti fermentati inoculati. Per la banda a 14.4 kDa, invece, si ha un comportamento diverso, osservando infatti i profili degli impasti fermentati inoculati si ha la formazione di due bande a diversi pesi molecolari.

Le differenze riscontrate nell'osservazione dei profili elettroforetici degli sfarinati sono dovute, con elevate probabilità, all'attività proteolitica degli enzimi durante la fermentazione degli impasti stessi.

I risultati ottenuti confermano la capacità dei batteri lattici di degradare i peptidi della gliadina, capacità che in un primo tempo era stata attribuita alla presenza di enzimi proteolitici quali amino

peptidasi, carbossi-peptidasi ed endopeptidasi provenienti per lo più da farine (Spicher and Nierle, 1988).



**Figura 19.** SDS PAGE delle gliadine estratte da sfarinati di Monococco e Timilia (corsie 1-4) e da impasti inoculati con *Lactobacillus pentosus* (corsie 5-10).

1, 4, 5, 8 = Low-Range SDS PAGE ladder; 2 = Sfarinato di Monococco; 3 = Sfarinato di Timilia; 6 = Sfarinato Monococco e acqua; 7 = Sfarinato Timilia e acqua; 9 = Sfarinato Monococco inoculato con *Lactobacillus pentosus*; 10 = Sfarinato di Timilia con *Lactobacillus pentosus*.

## CONCLUSIONI

In Sicilia, così come in tutto il Mediterraneo, il pane è stato sempre considerato come alimento base.

Le paste acide continuano a costituire lo starter utilizzato nei processi di panificazione tradizionale senza che per lungo tempo fossero noti la presenza ed il ruolo svolto dai microrganismi.

L'aspetto fondamentale che caratterizza un lievito naturale è la presenza e la coesistenza di lieviti e batteri lattici. I batteri lattici sono ritenuti principalmente responsabili dell'acidificazione dell'impasto, mentre i lieviti giocano un ruolo fondamentale nella lievitazione dell'impasto legata alla produzione di CO<sub>2</sub> (Hammes e Gänzle, 1998).

I batteri lattici insieme ai lieviti sono i microrganismi dominanti negli impasti acidi (Gobbetti *et al.*, 2005). In particolare, più di 50 specie di batteri lattici, appartenenti al genere *Lactobacillus*, e più di 20 specie di lieviti, appartenenti ai generi *Saccharomyces* e *Candida* (De Vuyst e Neysens, 2005) sono stati isolati dagli impasti acidi. Il rapporto batteri lattici: lieviti è generalmente 100:1 (Ottogalli *et al.*, 1996), ma varia in base alle materie prime o alla tecnologia utilizzata.

La moderna biotecnologia dei prodotti da forno sta riscoprendo l'uso della madre acida come agente lievitante, grazie ai numerosi vantaggi che questa offre rispetto al lievito commerciale usato per la panificazione. Oggi, la fermentazione degli impasti acidi è utilizzata nella produzione di pane, torte, cracker e la sua applicazione è in continuo aumento principalmente per le migliori caratteristiche sensoriali e nutrizionali.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di verificare se i batteri lattici, isolati da paste acide della Sicilia, fossero in grado di idrolizzare le gliadine coinvolte nella patogenesi della malattia celiaca.

La malattia celiaca è una enteropatia immuno-mediata scatenata dall'ingestione di prodotti alimentari contenenti glutine, in soggetti geneticamente predisposti.

Si stima che per ogni diagnosi di malattia celiaca ci siano da 3 a 7 casi non diagnosticati e che fino al 3% della popolazione europea e Nord-americana possa sviluppare la malattia nel corso della vita.

Il glutine, presente nella farina di frumento e di altri cereali, si forma durante la fase di impastamento della farina con acqua per interazione tra gliadine e glutenine e assume una forma tridimensionale complessa.

Tali proteine di riserva sono particolarmente ricche in prolina che è l'unico aminoacido ad avere una struttura ciclica che impone restrizioni steriche ai legami peptidici rendendoli particolarmente resistenti ai processi idrolitici. Una volta ingerito il glutine va incontro ad un processo digestivo che non riesce a degradare completamente la proteina a causa della mancanza, a livello intestinale di enzimi dotati di attività prolil-endopeptidasica.

Alla base della patogenesi della malattia celiaca vi è una serie di complessi meccanismi che coinvolgono fattori ambientali, immunologici e genetici. Le proteine del glutine, dopo aver subito la degradazione proteolitica a livello del lume intestinale liberano diversi peptidi in grado di stimolare la risposta immunitaria delle cellule T (Shane *et al.*, 2002).

A dispetto della vasta diffusione del morbo celiaco in tutto il mondo, nessuna terapia è stata ancora sviluppata e adottata per far fronte a questa malattia e l'unico trattamento conosciuto è una rigorosa dieta *gluten free*.

Recenti studi (Di Cagno *et al.*, 2002) hanno dimostrato che la degradazione dei peptidi di gliadina ricchi di prolina durante la fermentazione ad opera delle peptidasi batteriche influenza positivamente la tolleranza dell'uomo alle proteine del glutine.

La degradazione delle proteine dei cereali nelle fermentazioni con lievito madre di frumento è un fenomeno correlato, inoltre, all'acidità. L'acidificazione e la riduzione dei legami disolfuro del glutine da parte dei lattobacilli eterofermentanti aumentano l'attività delle proteasi dei cereali (Loponen *et al.*, 2004) e l'accessibilità al substrato; gli aminoacidi sono accumulati per azione di peptidasi intracellulari ceppo-specifiche dei lattobacilli.

Infatti, nella prima fase del lavoro dopo un'accurata ricerca bibliografica, il nostro studio ha confermato che gli enzimi proteolitici batterici contribuiscono ad idrolizzare le gliadine.

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

È stata, inoltre, valutata la capacità dei batteri lattici di degradare la gliadina in sfarinati di varietà antiche quali Timilia (9% di glutine) e Monococco ID 331 (7% di glutine).

Il ceppo di *L. pentosus* è stato inoculato direttamente in impasto costituito da acqua e farina, senza la presenza di lievito compresso, e lasciato in fermentazione per 24 ore; la capacità proteolitica nei confronti delle gliadine è stata valutata tramite SDS-PAGE.

La scelta delle varietà antiche è stata dettata dal fatto che, non essendo state sottoposte a manipolazione genetica per aumentarne il contenuto di proteine in modo da renderle tecnologicamente più adatte alla trasformazione, hanno un contenuto di glutine leggermente inferiore rispetto alle varietà moderne; inoltre il pattern elettroforetico delle gliadine del grano Monococco ID331 mostra la parziale assenza delle  $\omega$ -gliadine (Saponaro *et al.*, 1995).

Diversi studi hanno riguardato la valutazione dell'attività citotossica o immunogenica delle farine di Monococco nei confronti dei sintomi della malattia celiaca i quali hanno dimostrato, in vitro, l'assenza di effetti negativi (Vicentini *et al.*, 2007; Pogna *et al.*, 2008).

Alla luce dei risultati ottenuti si potrebbe proporre di isolare singolarmente i frammenti gliadinici tossici per i celiaci da Monococco ID331 e di valutare, quindi, l'azione sia singola che sinergica di differenti ceppi di batteri lattici nei confronti dei diversi peptidi tossici, con l'obiettivo di individuare un pool di batteri in grado, durante la fermentazione dell'impasto, di degradare completamente gli epitopi tossici per i pazienti celiaci.

## BIBLIOGRAFIA

- ✚ 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. *Journal of Experimental 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 sensitivity and neurological illness. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 25, S7-S8.
- ✚ Auricchio S., Barone M.V., Troncone R. (2004). Dietary proteins and mechanisms of gastrointestinal diseases: gliadin as a model. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 39, 738-739
- ✚ 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. *Archives 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.
- ✚ Berti I., Horvath K., Green P.H.R., (2000). Prevalence of celiac disease among risk groups and the general population in U.S.A. *Journal of Medical Investigation*, 48, 206-220.
- ✚ Bertini M, Capelli P, Chilosi M, Valletta E, (2000). La celiachia. *Dialogo sui farmaci*; 3, 212-222.
- ✚ Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J. (1987) *Electrophoresis* 8, 93-99
- ✚ Boraam F., Faid M., Larpent J. P., Breton A. (1993). Lactic acid bacteria and yeast associated with traditional moroccan sour dough bread fermentation. *Sci. des aliments*, 13, 501-509.
- ✚ 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 y-type subunit from durum wheat. *Journal 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. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 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., 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.
- ✚ Dako E., El Soda M., Vuilleumard J.-C., Simard R. E (1995). Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria. *Food ressearch 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. *Inter. J. Of Food. Microb.*, 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. *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 Patways Enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *App. and Env. Microbiol.*, , 68, 6193-6201.
- ✚ 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 polipeptides responsible for celiac sprue. *Bioch. And Biophys*, 1762, 80–93.
- ✚ De Vuyst L., Neysens P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science e Tech.*, 16, 43-56.
- ✚ Desmazeaud M.J., de Roissart H. Luquet F.M. (1994) Metabolisme general des bacteries lactiques. in: de *Bacteries Lactique-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. *Europe 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. *C-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.
- ✚ D'Ovidio R. (2004). The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *C-J. Of Cereal Science*, 39, 321-339.
- ✚ 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.
- ✚ 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 moduletor 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.
- ✚ 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.
- ✚ 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 genotipi aspects of *Lactobacillus sanfrancisciensis* 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 sanfrancisciensis* 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. *Journal of Bacteriology* , 177, 4652-4657.
- ✚ Francki M., Appels R. (2002). Wheat functional genomics and engineering crop improvement. *Genome Biol.*, 3, Reviews1013.
- ✚ 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 Appl. 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 Appl. 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 USA*, 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. Journal 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. Journal 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. Journal of Food Science*, 120, 34-45.
- ✚ 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 Microbioogy.*, 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 Microbioogy.*, 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.
- ✚ Godkin A., Jewell D. (1998). The patogenesis of celiac disease. *Gastroenterology*, 115, 206-210.

- ✚ Guandalini S. (2000). Celiac disease in the New World. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.*, 31, 362-364.
- ✚ Guèdon 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. *Journal of Bacteriolog.*, 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.
- ✚ Hammes, W.P. and Gañzle, M.G. (1998) Sourdough breads and related products. In *Microbiology of Fermented Foods*, Vol. 1 ed. Woods, B.J.B. pp. 199–216. London, UK: Blackie Academic & Professional.
- ✚ Hausch F., Shan L., Santiago N. A., Gray G. M., Khosla C. (2003). Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *American Journal of Physiology*, 283, 996–1003.
- ✚ Helin H., Mustonen J., Regnala T., Pasternack A. (1983). IgA nephropaty associated with coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 107, 324-327.
- ✚ Hierro E., de la Hoz. L., Ordonez J.A. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 39, 329-367.
- ✚ Hill I., Fasano A. (2000). The prevalence of celiac disease in at risk groups of children in the United States. *Journal of Pediatrics*, 1, 86-90.
- ✚ Holtmeier W., Caspary W.F. (2006). Celiac disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 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. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 343-362.



- ✚ 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 alphan type gliadins from wheat (*Triticum aestivum*). *Proc Nat Acad Sci USA*, 81, 4712-4716.
- ✚ Katina K., Arendt E., Liukkonen K. H, Autio K., Flander L., Poutanen K. (2005). Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends in Food Science and Technology*, 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 Physiology*, 139, 1870-1880.
- ✚ Kline L., Sugihara T. (1971). Microorganisms of the San Francisco Sourdough bread process. *Applied Microbiology*, 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 Microbiology Letters*, 273, 12-21.
- ✚ Koletzko S, Burgin-Wolff A, et al. (1988). Prevalence of celiac disease in diabetic children and adolescents; a multicentre study. *European Journal of Pediatrics*, 148, 113-117.
- ✚ Kolho KL, Farkkila MA, Savilahti E, (1998). Undiagnosed coeliac disease is common in Finish adults. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 33, 1280-1283.
- ✚ Krupickova S., Tuckova L., Flegelova Z., Michalak M., Walters J.R., Whelan A., Harries J., Vencovsky J., Tlaskalova-Hogenova H. (1999). Identification of common epitopes on gliadin, enterocytes, and calreticulin recognised by antigliadin antibodies of patients with coeliac disease. *Gut*, 44, 168-173.
- ✚ Laemmli, V.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

- ✚ Lionetti P, (2002). The enteropathy of celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (suppl); 34, 18-21.
- ✚ Lonner C. T., Welander N., Molin N., Dostalek M. (1986). The microflora in a sourdough started spontaneously on typical Swedish rye meal. *Food Microbiology*, 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 Microbiology*, 10, 205-213.
- ✚ Maki M, Collin P. (1997). Coeliac disease. *Lancet*, 349, 1755-1759.
- ✚ Manso M.A., Leonil J., Piot M., Gagnaire V. (2005). Isolation and characterisation of a *Lactobacillus helveticus* ITG LH1 peptidase-rich sub-proteome. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 119-129.
- ✚ Marccone 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. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312, 19-26.
- ✚ Martinez Ma del Carmen, Ruiz M., Carrillo J.M. (2004). New B low Mr Glutenin subunit alleles at the Glu-A3, Glu-B2 and Glu-B3 loci and their relationship with gluten strength in durum wheat. *Journal of Cereal Science*, 40, 101-107.
- ✚ Mearin ML., Ivarsson A., Dickey W. (2005). Coeliac disease: is it time mass screening? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 19, 441-452.
- ✚ Meeuwisse G.W. (1970). Diagnostic criteria in celiac disease. *Acta Paediatrica*, 59, 461-463.

- ✚ Mills, O. E., and Thomas, T. D. (1981). Nitrogen sources for growth of lactic streptococci in milk. *Journal of Dairy Science*, 16, 42-55.
- ✚ Molberg O, Adam S.N, Sollid L.M. (2000). Role of tissue transglutaminase in celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 3, 232-237
- ✚ Molberg O., 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.
- ✚ 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., Sievanen H., Salmi J., Maki M. (1999). Osteopenia in patients with clinically silent coeliac disease warrants screening. *Lancet*, 354, 744-745.
- ✚ 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.
- ✚ 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. *Pediatria Medica e Chirurgica*, 24, 358-362.
- ✚ Pocecco M., Ventura A. (1995). Coeliac disease and insulin-dependent diabetes mellitus: a causal association? *Acta Paediatrica*, 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.
- ✚ Pogna N. E. , Autran J. C. , Mellini F. , La Fiandra D. and Feillet P., (1990). Chromosome 1B encoded gliadins and glutenin subunits in durum wheat: genetics and relationship to gluten strength. *Journal of Cereal Science*, 11:15-34.
- ✚ Pogna N.E., Gazza, L., Vincentini, O and De Vincenzi M., (2008). Variation in noxiousness of different wheat species for celiac patients. *Journal of Plant Interactions*, 3:57 – 67.
- ✚ Preston K.R., Kruger J.E. (1976). Purification and properties of two proteolytic enzymes with carboxypeptidase activity in germinated wheat. *Plant Physiology*, 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. *Journal of Immunology*, 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. *Journal of Immunology*, 173, 1757-1762.
- ✚ Reeves C.D. (1986). Gene expression in developing wheat endosperm. *Plant Physiology*, 82, 34-40.
- ✚ Rocher A., Soriano F., Molina E., Gonzalez-Limas G., Mendez E. (1995). Characterization of distinct alpha- and gamma-type gliadins and low molecular weight components from wheat endosperm as coeliac immunoreactive proteins. *Biochimica et Biophysica 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. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1495-1502.
- ✚ Sandhu D. Gill K.S. (2002). Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes. *Plant Physiology*, 128, 803-811.
- ✚ Saponaro C, Pogna NE, Castagna R, Pasquini M, Cacciatori P., Redaelli R. 1995. Allelic variation at the Glu-A1m, Gli-A1m and Gli-A2m loci and breadmaking quality in *Triticum monococcum*. *Genetic Research (Cambridge)* 66:127–137.
- ✚ Sasaki M., Bosman B.W., Tan P.S.T. (1995). Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli. *Journal of Dairy Research*, 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. *Journal of Dairy Research*, 62, 611-620.
- ✚ Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394-406.
- ✚ Savilahti E., Simell O., Koskimies S., Rilva A., Akerblom H.K. (1986). Celiac disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Pediatrics*, 108, 690-693.
- ✚ 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.
- ✚ 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. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357, 133-142.

- # Shewry, P.R., Halford N.G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53, 947-958.
- # Silano M., De Vincenzi M. (1999). Bioactive antinutritional peptides derived from cereal prolamins: a review. *Nahrung*, 43, 175–184.
- # Smith D.M.H., Miller J (1979). Gastroenterology, celiac disease and enamel hypoplasia. *British Dental Journal*, 147, 91-95
- # Sollid L., Markussen G., Gjerde H., (1989). Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ- $\alpha/\beta$  heterodimer. *Journal of Experimental Medicine*, 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. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung NLM*, 173, 291-296.
- # Spicher G., Rabe E., Sommer R., Stephan H. (1982). On the behaviour of heterofermentative sourdough bacteria and yeasts in mixed culture. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung NLM*, 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. *Gastroenterology*, 23, 1105-1108.
- # Stenhammar L., Fallstrom S.P., Jansson G. (1986). Celiac disease in children of short stature without gastrointestinal symptoms. *European Journal of Pediatrics*, 145, 185-186.

- ✚ Stenhammer L., Ljunggren C.G. (1988). Trombocytopenic purpura and coeliac disease, *Acta Paediatrica Scand*, 77, 764-766.
- ✚ Stiles M.E., Holzapfler W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.
- ✚ Thompson J., Gentry-Weeks C.R. (1994) Metabolisme des sucres par les bacteries lactiques in: de Rossart H., Luquet F.M. -*Bacteries Lactiques*. Ed. Loriga, 6, 239-289.
- ✚ Torriani, S., Felis, G. E., Dellaglio F. (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3450-3454.
- ✚ 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<sup>T</sup> during growth in sourdough. *Applied and Environmental Microbiology*, 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.
- ✚ Vicentini O, Maialetti F, Gazza L, Silano M, Dessi M, De Vincenti M, Pogna NE (2007). Environmental factors of celiac disease: cytotoxicity of hulled wheat species *Triticum monococcum*, *T. turgidum* ssp. *dicoccum* and *T. aestivum* ssp. *spelta*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22:1816–1822.
- ✚ 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. *Journal 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? *Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 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 Paediatrica*, 412, 3-9.
- ✚ Zelissen P.M.J.(1995). Associated autoimmunity in Addison's disease. *J. Autoimmunology*, 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.



## ***Ringraziamenti***

Un sentito ed accorato ringraziamento sento di rivolgerlo alla Dott.ssa Restuccia Cristina ed alla Dott.ssa Palmeri Rosa che in questi anni mi hanno sostenuto ed aiutato per portare a termine questo lungo e laborioso lavoro, ho trovato in loro rifugio durante i momenti di sconforto ed ho la certezza che senza di loro non sarei riuscita a portarlo a termine.

Si ringrazia, inoltre, il Consorzio di Ricerca “Gian Pietro Ballatore” per aver messo a disposizione reagenti ed attrezzature del proprio laboratorio di ricerca “Città del grano” di Raddusa e per aver fornito i campioni di sfarinato Monococco e Timilia.