

Corso di Dottorato di Ricerca in :
"INGEGNERIA CHIMICA, DEI MATERIALI E DI PROCESSO" Ciclo XXI

Scuola:

"SCIENZE E TECNOLOGIE INNOVATIVE PER L'INGEGNERIA INDUSTRIALE"

"Processo di produzione dei sottoprodotti della soia: valutazione della persistenza e degradabilità di molecole potenzialmente allergeniche"

*Dottoranda: dott.ssa Barbara Santamaria
Laboratorio di Sicurezza Alimentare
D.C.C.I Università degli Studi di Genova*

*Tutor: dott.ssa Patrizia Perego
DICHEP, Università degli Studi di Genova*

***Lavoro svolto in collaborazione con l'Istituto
Superiore di Sanità nell'ambito del progetto:***

***“Applicazione di metodologie innovative per la
determinazione della qualità della produzione
alimentare”***

Campioni forniti dall'ISS:

***Semi e farine di soia OGM (roundup ready) relative
ai diversi steps di lavorazione della soia***

Gli allergeni nascosti : un grave rischio per gli allergici

- ***Nei cibi confezionati si possono trovare contaminanti in tracce di alimenti non elencati negli ingredienti***
- ***I contaminanti possono provocare gravi reazioni nei soggetti con allergia verso di essi***
- ***Il Parlamento Europeo e il Consiglio dell'Unione Europea hanno approvato una normativa (2003/89/CE, recepita in Italia con il DL.vo 114/2006) sull'etichettatura che obbliga a dichiarare la presenza anche in tracce di 12 ingredienti allergenici.***

Direttiva EC 2003/89 (emendamento della direttiva EC 2000/13)

Approvata al fine di proteggere gli allergici dalle reazioni da allergeni nascosti, particolarmente da quelle gravi.

Stabilisce che l'etichetta di un alimento commerciale deve dichiarare tutti gli ingredienti, intesi come ogni sostanza (inclusi gli additivi) usata nella manifattura o nella preparazione di un alimento e ancora presente nel prodotto finito, anche in forma alterata.

**Allergeni alimentari inclusi nell'allegato III bis
della Direttiva 2003/89/EC.**

- **Cereali contenenti glutine (grano, segale, orzo, avena, farro)**
- **Crostacei**
- **Uova**
- **Pesce**
- **Arachidi**
- **Soia**
- **Latte**
- **Frutta a guscio (noci, mandorle, nocciole, pistacchi..)**
- **Sedano**
- **Senape**
- **Semi di sesamo**
- **Anidride solforosa e solfiti in concentrazioni superiori a 10 mg/Kg o 10 mg/L espressi come SO₂**

Perché un allergene è nascosto?

- 1. Allergene non dichiarato***
- 2. Contaminazione***
- 3. Cross-reattività***
- 4. Modificazioni della allergenicità durante la processazione***
- 5. Modificazioni della allergenicità durante la cottura***
- 6. Scarsa chiarezza etichette, diverse nei vari paesi***
- 7. Presenza di Ogm***

COME ATTUARE LA PREVENZIONE

- **Compito dell'industria alimentare è di applicare accuratamente la Direttiva CE al fine di non compromettere né la qualità della vita né la sicurezza dei soggetti con allergia alimentare in Europa.**
- **Emerge quindi la necessità di disporre di metodi analitici estremamente sensibili, in grado cioè di rilevare l'allergene anche solo in tracce.**

Tali analisi possono essere condotte a due livelli:

- ***ricercando la proteina allergizzante***
- ***ricercando la presenza del DNA della specie vegetale o animale che produce l'allergene.***

Gli studi effettuati sugli allergeni alimentari e non, hanno portato alla caratterizzazione della proteina allergenica o della corrispondente sequenza nucleotidica.

Tali dati sono stati raccolti in tabulati accessibili in rete.

(<http://www.allergen.org/list.htm>; Carboni et al.,2004)

Effetto della processazione degli alimenti sugli allergeni

- ***Cambiamento del contenuto proteico totale***
- ***Alterata composizione proteica***
- ***Denaturazione***
- ***Proteolisi***
- ***Modificazioni chimiche***
- ***Alterata digeribilità***

Effetti del calore sugli allergeni alimentari

- ***Distruzione degli epitopi:***
 - ***Diminuita resistenza alla digestione***
 - ***Denaturazione***
- ***Generazione di nuovi epitopi:***
 - ***Aumentata resistenza alla digestione***
 - ***Esposizione di epitopi nascosti***
 - ***Reazioni chimiche con altri componenti***

Relazione tra temperatura e denaturazione proteica

Temp.	Effetto
55°C	Perdita della struttura terziaria
70°C	Perdita della struttura secondaria
75°C	Taglio del legame S-S
90°C	Nuovi legami S-S
100°C	Aggregazione, reazioni chimiche all'interno delle catene proteiche

Fattori favorevoli all'allergenicità

- **Complessità molecolare:** le dimensioni della molecola allergenica devono consentire il suo passaggio attraverso la barriera mucosa (<100 kd) ma proteine < 5 kd hanno scarsa capacità sensibilizzante; quindi il p.m. ideale è compreso tra 5 e 50 kd.
- **Concentrazione:** gli allergeni più importanti possono arrivare a superare il 50% del contenuto proteico totale; tuttavia la quantità sufficiente per sensibilizzare è < 1% delle proteine totali.
- **Solubilità:** le proteine glicosilate sono più solubili e quindi raggiungono più facilmente le membrane cellulari e attraversano più facilmente i tessuti.

DIAGRAMMA DI PRODUZIONE DI ALCUNI PRODOTTI DELLA SOIA

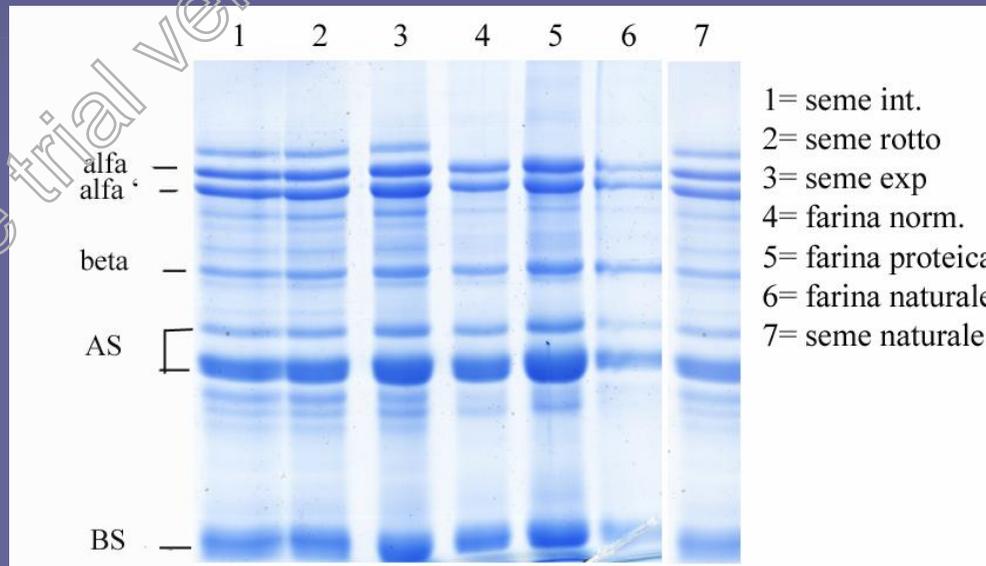


FASI SPERIMENTALI DELLO STUDIO

- 1. Confronto dei pattern proteici relativi alle varie fasi di lavorazione dei semi di soia OGM: seme intero, seme rotto, seme expeller, farina normale, farina proteica e confronto delle mappe con semi e farine ottenute da semi naturali**
- 2. Identificazione della proteina CP4-EPSPS (5-enolpiruvil-scichimato -3-fosfato sintetasi) sovraespressa nei semi di soia OGM ed analisi della sua espressione nella varie fasi di lavorazione**
- 3. Utilizzo di sieri di pazienti allergici alla soia per l'identificazione della persistenza e/o degradabilità della proteina EPSPS e di altre proteine allergeniche durante i vari steps di lavorazione della soia**

1° step: A): estrazione proteica ed elettroforesi

PATTERN PROTEICO IN MONODIMENSIONALE DEI PRODOTTI DELLA SOIA



Alfa – alfa' e beta: subunità della beta-conglicinina
AS e Bs: subunità rispettivamente acida e basica della glicinina

Trattamento del campione

- **SDS**

- *denatura le proteine (stessa forma a “bastoncino”)*
- *conferisce la stessa densità di carica (negativa)*

- **2-Mercaptoetanololo** $\text{HS-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

- *rompe eventuali legami disolfuro*

- **Temperatura (100 °C)**

- *accelera la denaturazione completa*

SDS-PAGE

(Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis)

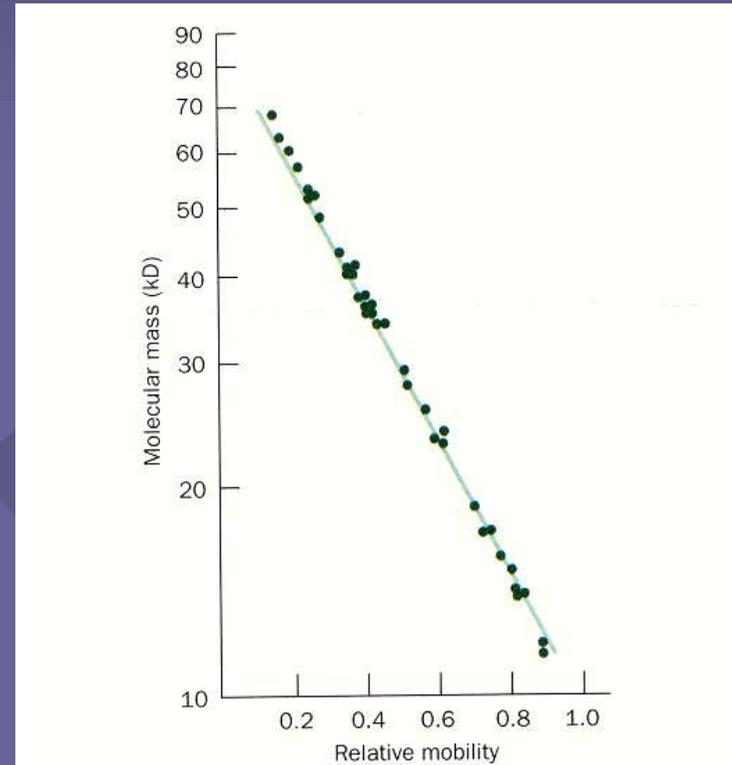
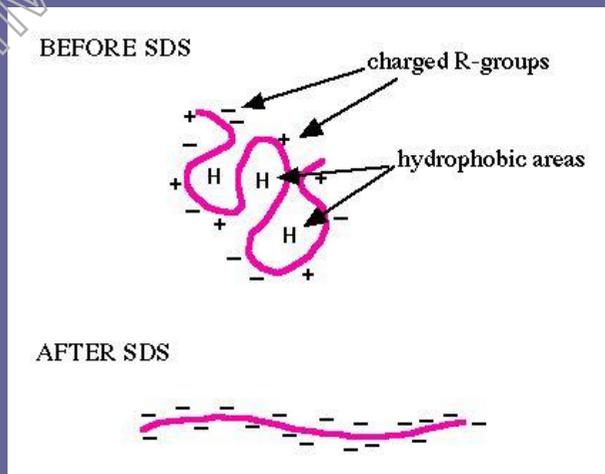
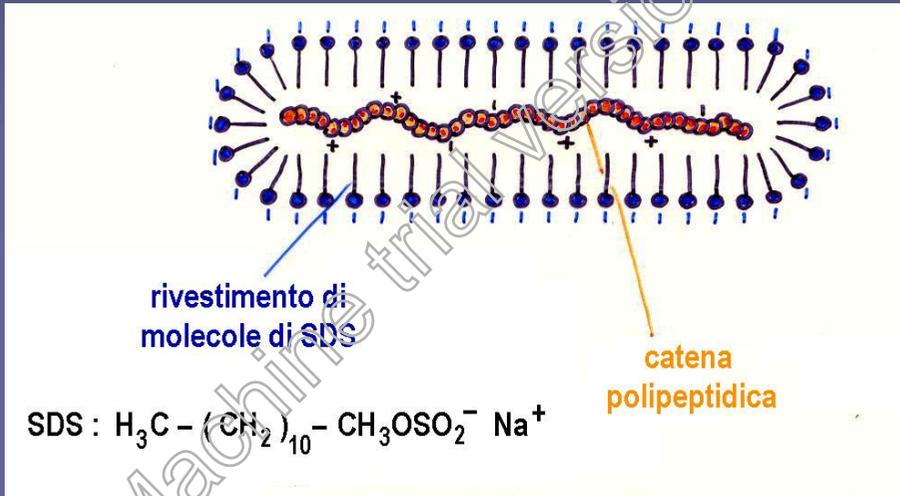


Figure 5-27

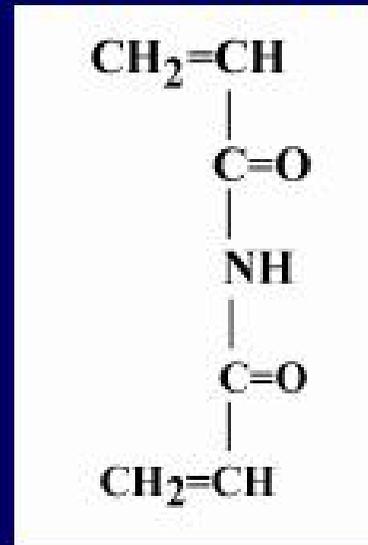
A logarithmic plot of the molecular masses of 37 different polypeptide chains ranging from 11 to 70 kD versus their relative electrophoretic mobilities on an SDS-polyacrylamide gel. [After Weber, K. and Osborn, M., *J. Biol. Chem.* **244**, 4406 (1969).]

POLIACRILAMIDE

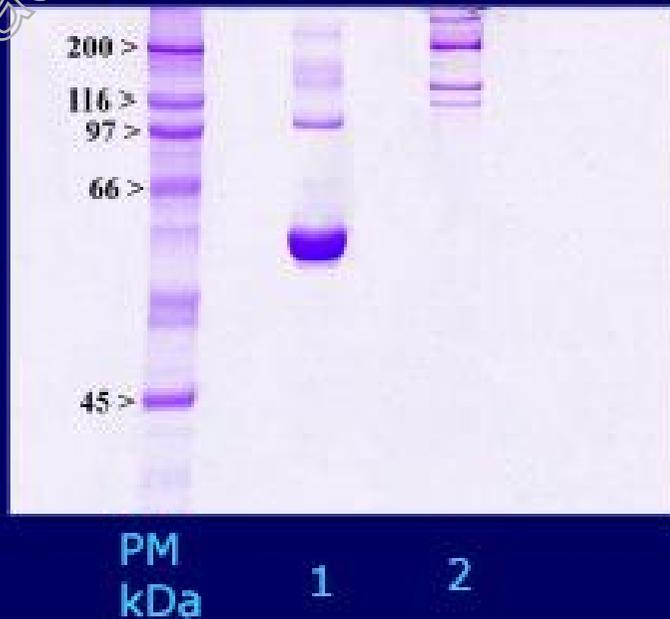
Acrilamide



N,N'-metilen-bis-acrilamide (bis)

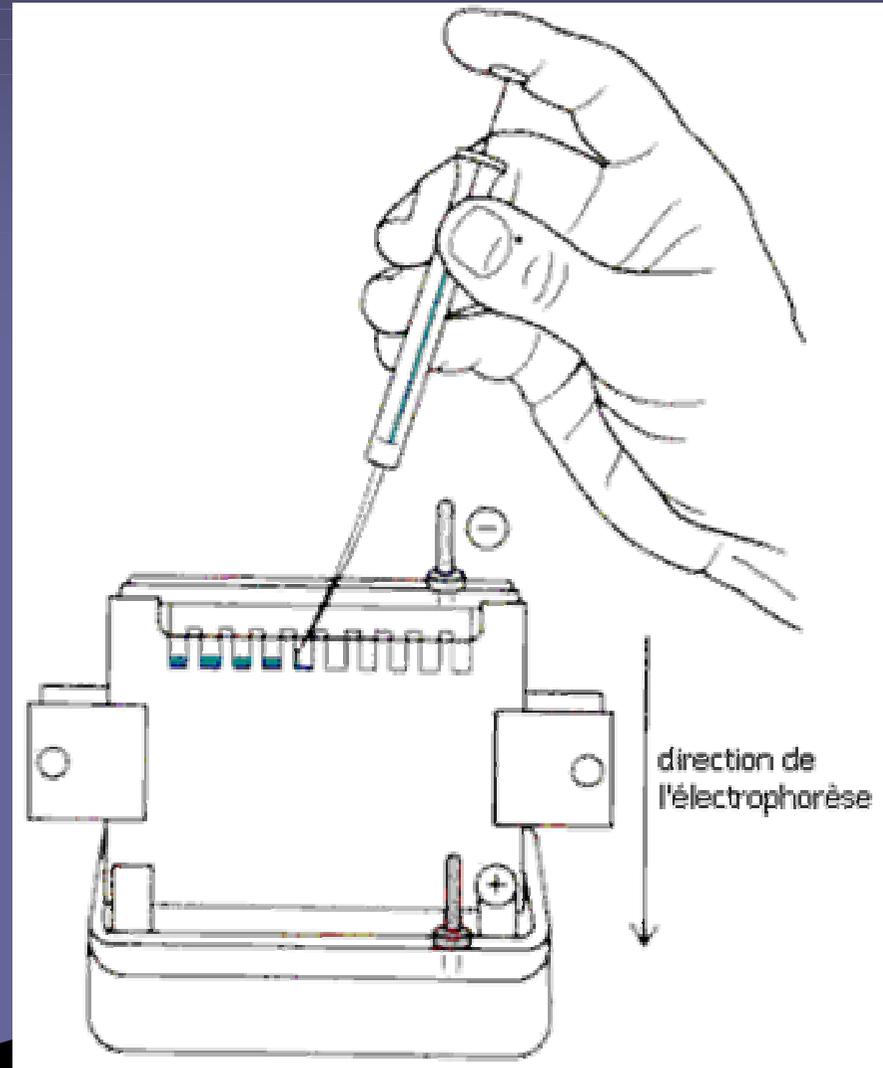


SDS-PAGE gel 8%



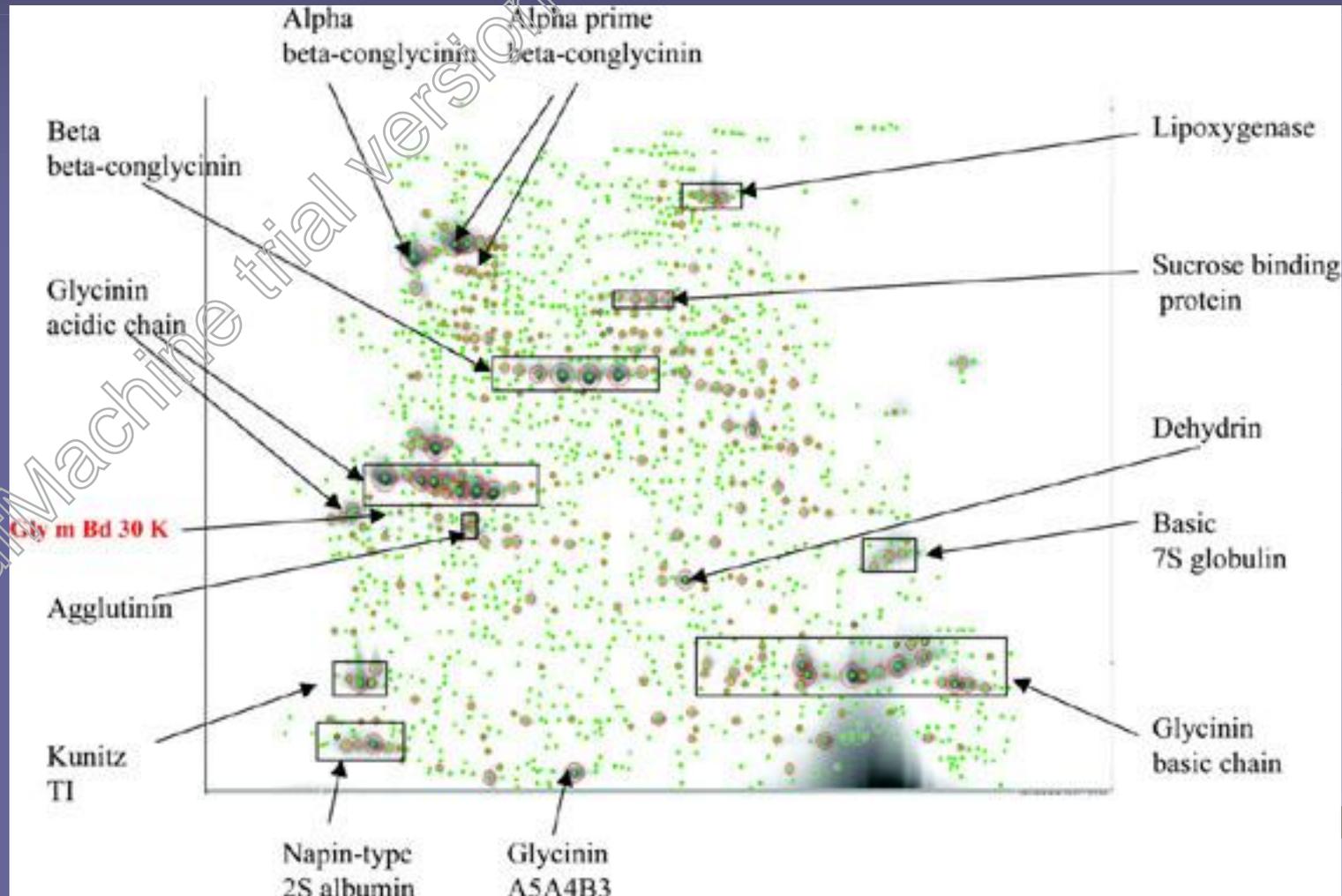
Gel colorato con Blu Comassie

APPARATO PER ELETTROFORESI VERICALE



1° step: B) :ottenimento dei pattern proteici in bidimensionale relativi alle varie fasi di lavorazione dei semi di soia

Pattern proteico in bidimensionale della soia (PROTEOMA)



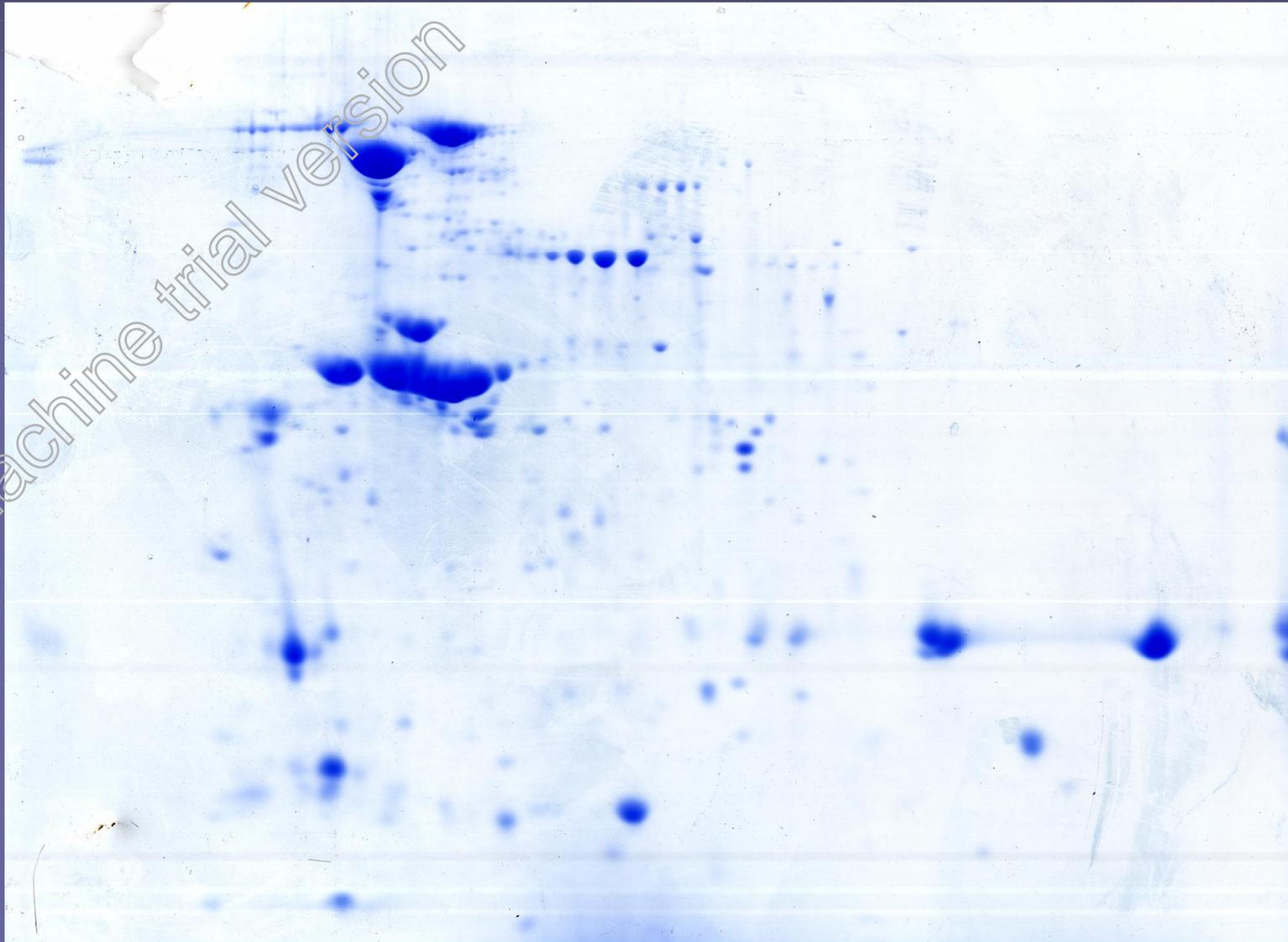
Dall'articolo: "genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean" *Plant Physiology*, May 2003, vol.132, pp.36-43

Proteoma seme di soia Roundup-ready intero

pH 3

10

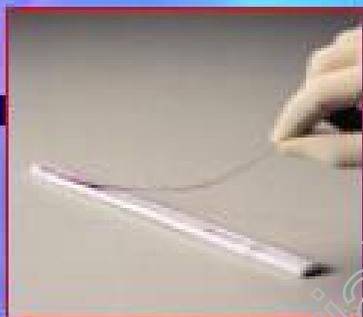
PM
150KDa



10 KDa

MATERIALI E METODI

Phor



Estrazione proteine

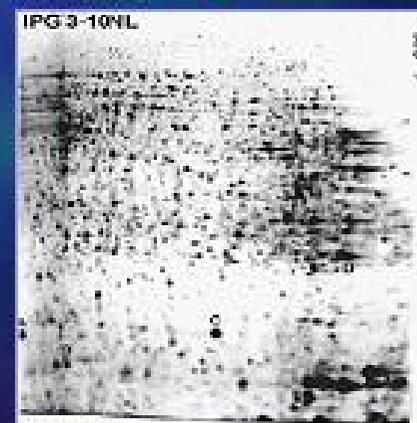
Preparazione del campione per IEF
(reidratazione)

Corsa elettroforetica
in prima dimensione

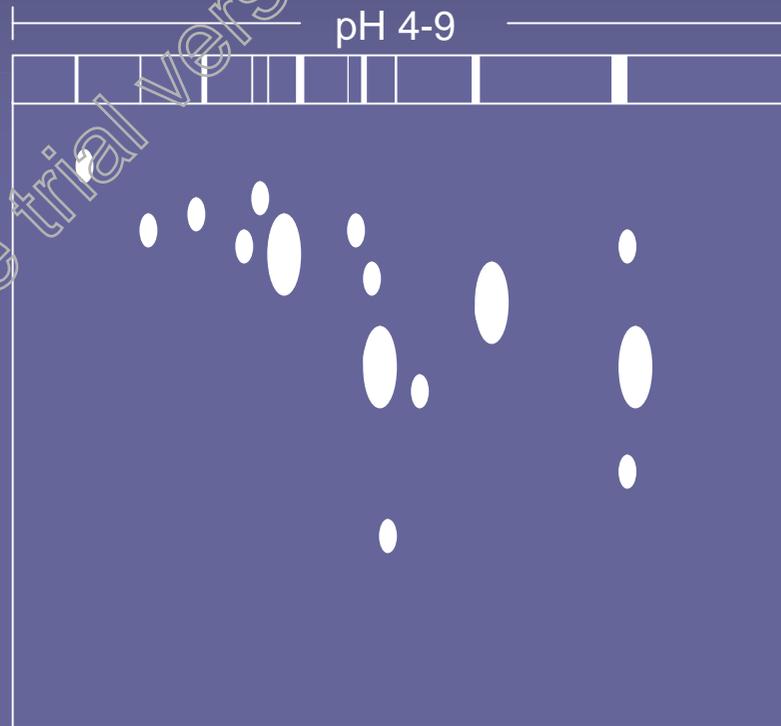
equilibrato

Corsa elettroforetica
in seconda dimensione

Colorazione gel



MAPPA PROTEICA



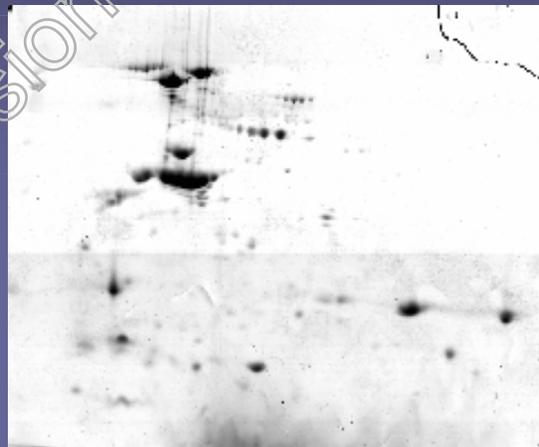
STRIP -1D

SDS-PAGE - 2D

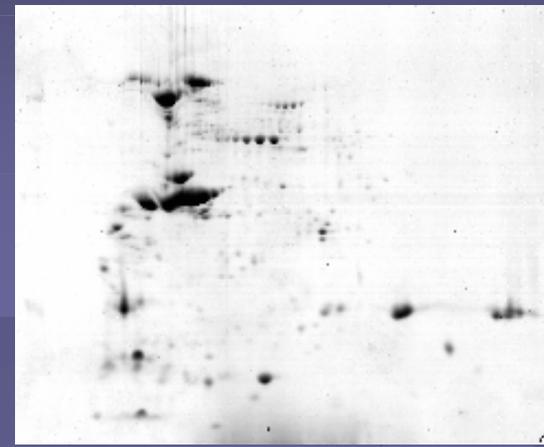
GELS BIDIMENSIONALI RELATIVI AD ALCUNE FASI DELLA LAVORAZIONE DELLA SOIA ROUND-UP READY



seme intero



seme rotto



seme expeller



farina normale



farina proteica

LA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

OBIETTIVI:

- ✓ Rompere le interazioni intermolecolari (ponti disolfuro)
- ✓ Prevenire la formazione di artefatti che possano modificare le caratteristiche dei polipeptidi in soluzione
- ✓ Rimuovere le sostanze che possono interferire con la 2D-IPG
- ✓ Mantenere le proteine in soluzione durante lo svolgimento della 2D-IPG

Non esiste un protocollo universale di solubilizzazione

La scelta del protocollo da seguire dipende dalla natura del campione e dall'obiettivo che si intende raggiungere

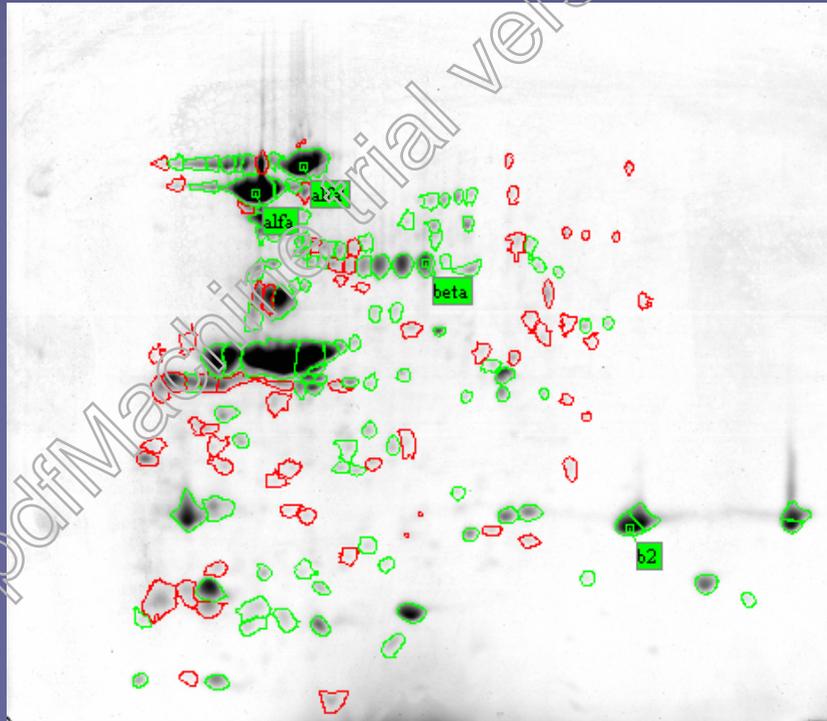


FASE CRUCIALE
influenza l'IEF e 2D in termini di

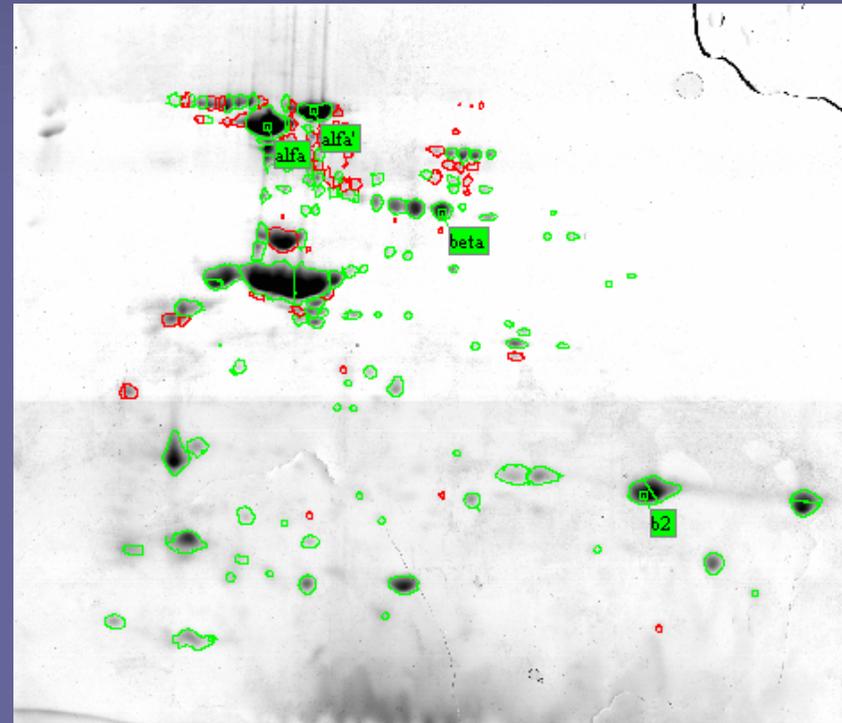
- qualità
- quantità
- distribuzione delle proteine

**PARAGONE TRA SEME INTERO E SEME ROTTO:
GLI SPOTS VERDI SONO COMUNI MENTRE QUELLI ROSSI
RAPPRESENTANO LE DIFFERENZE**

pH 3-10



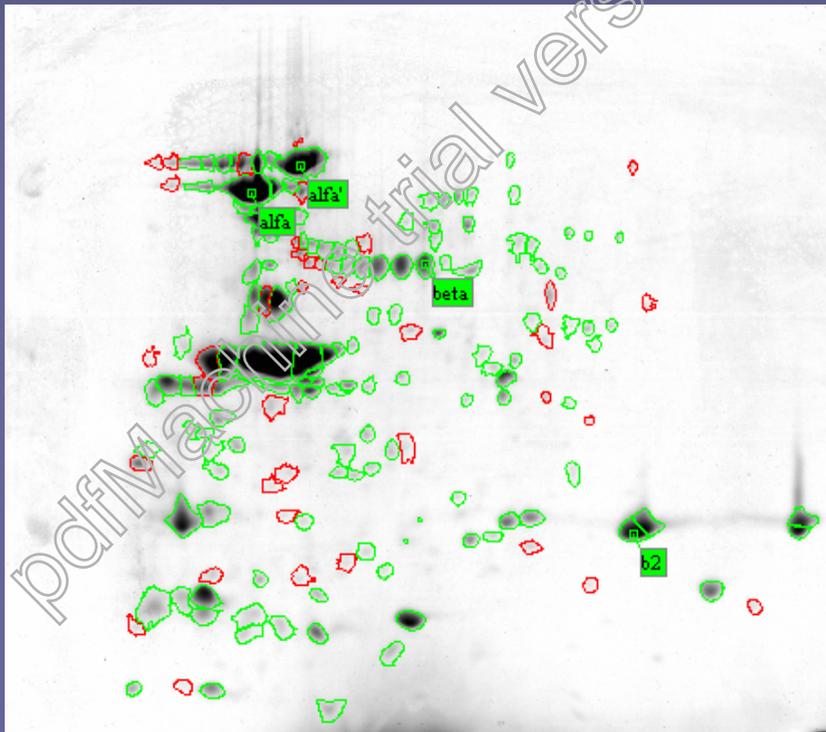
Seme intero



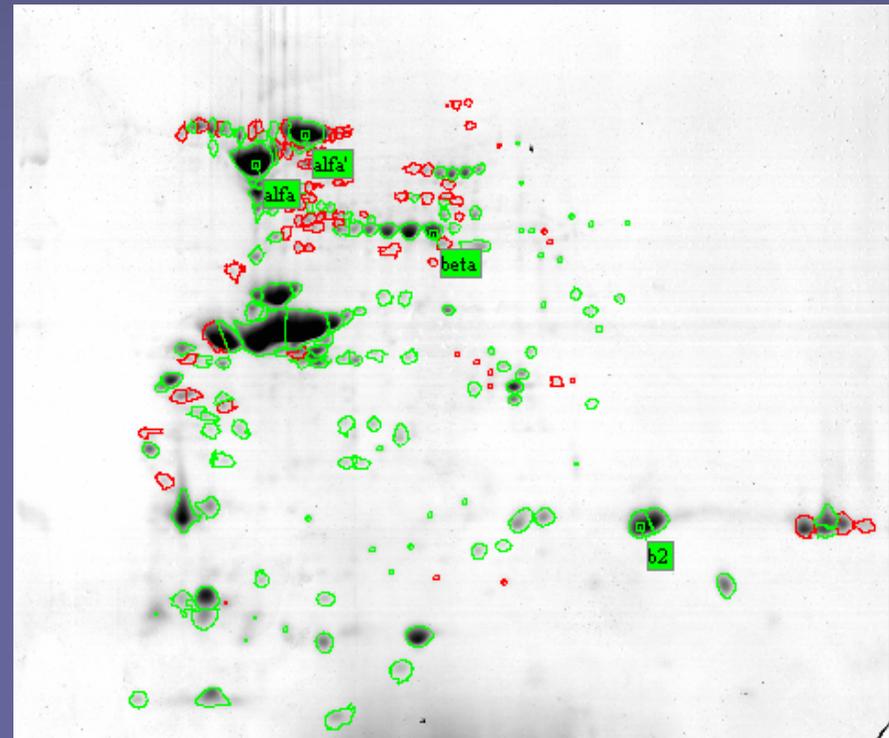
Seme rotto

**PARAGONE TRA SEME INTERO E SEME EXP:
GLI SPOTS VERDI SONO COMUNI MENTRE QUELLI ROSSI
RAPPRESENTANO LE DIFFERENZE**

pH 3-10



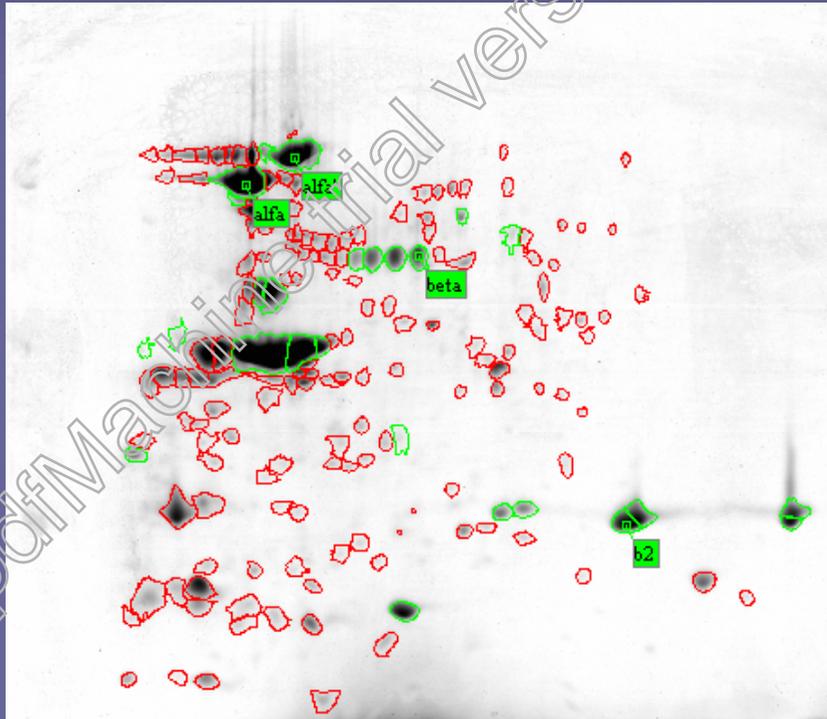
Seme intero



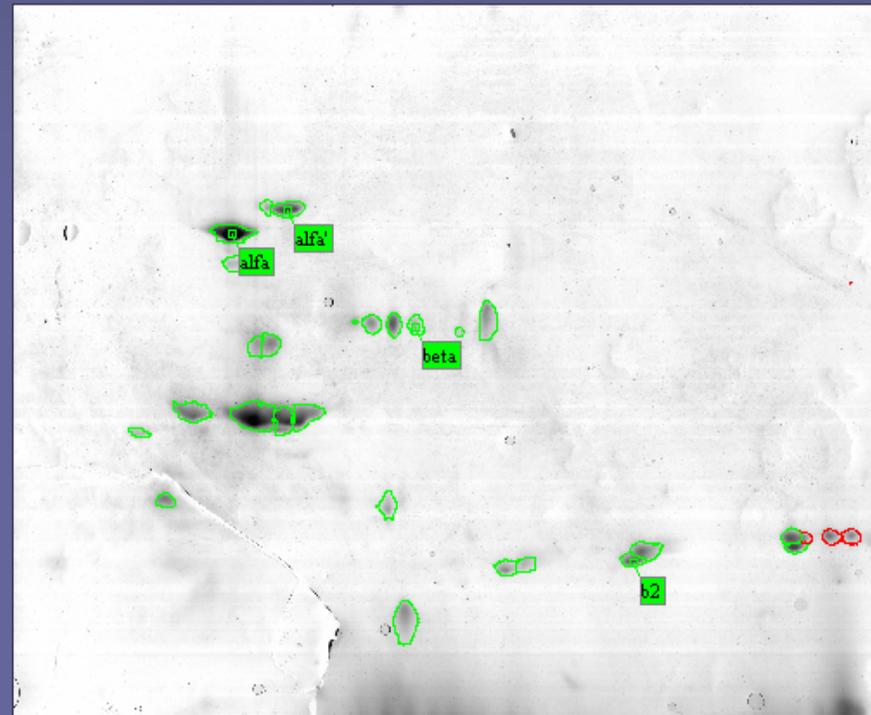
Seme expeller

**PARAGONE TRA SEME INTERO E FARINA NORMALE:
GLI SPOTS VERDI SONO COMUNI MENTRE QUELLI ROSSI
RAPPRESENTANO LE DIFFERENZE**

pH 3-10



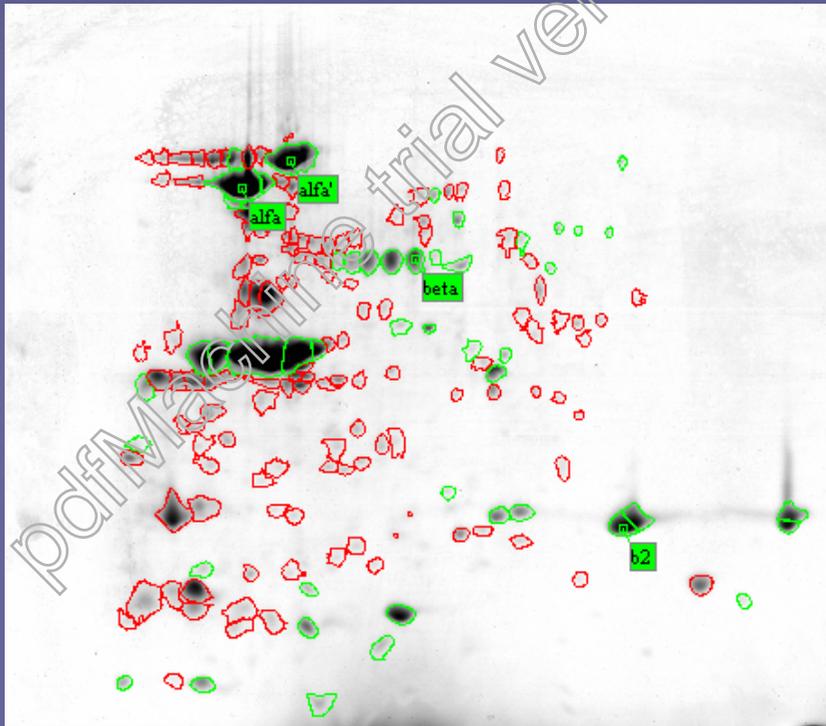
Seme intero



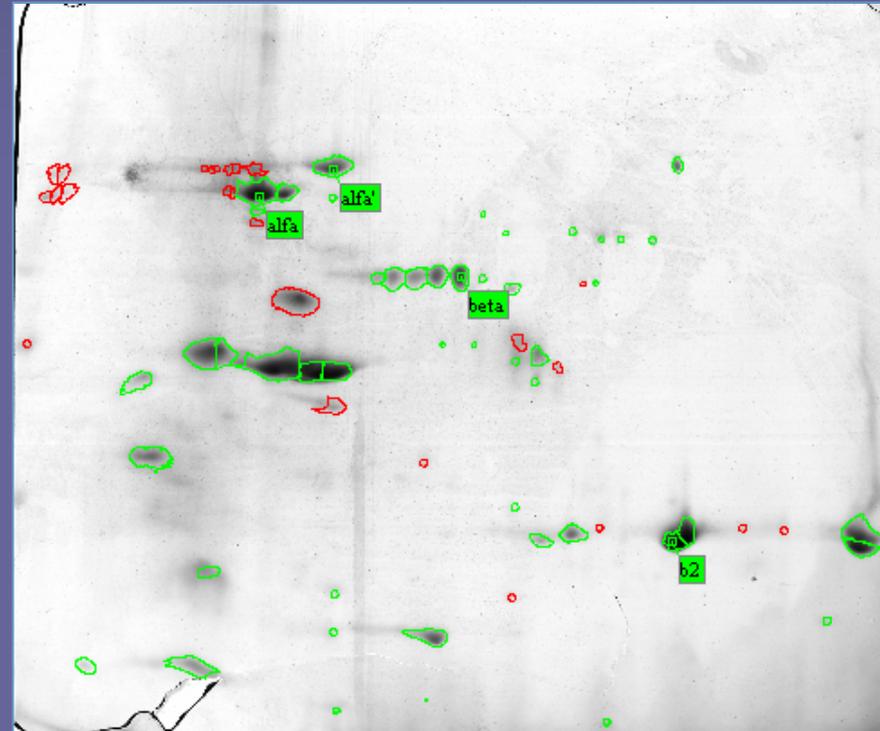
Farina normale

**PARAGONE TRA SEME INTERO E FARINA PROTEICA:
GLI SPOTS VERDI SONO COMUNI MENTRE QUELLI ROSSI
RAPPRESENTANO LE DIFFERENZE**

pH 3-10

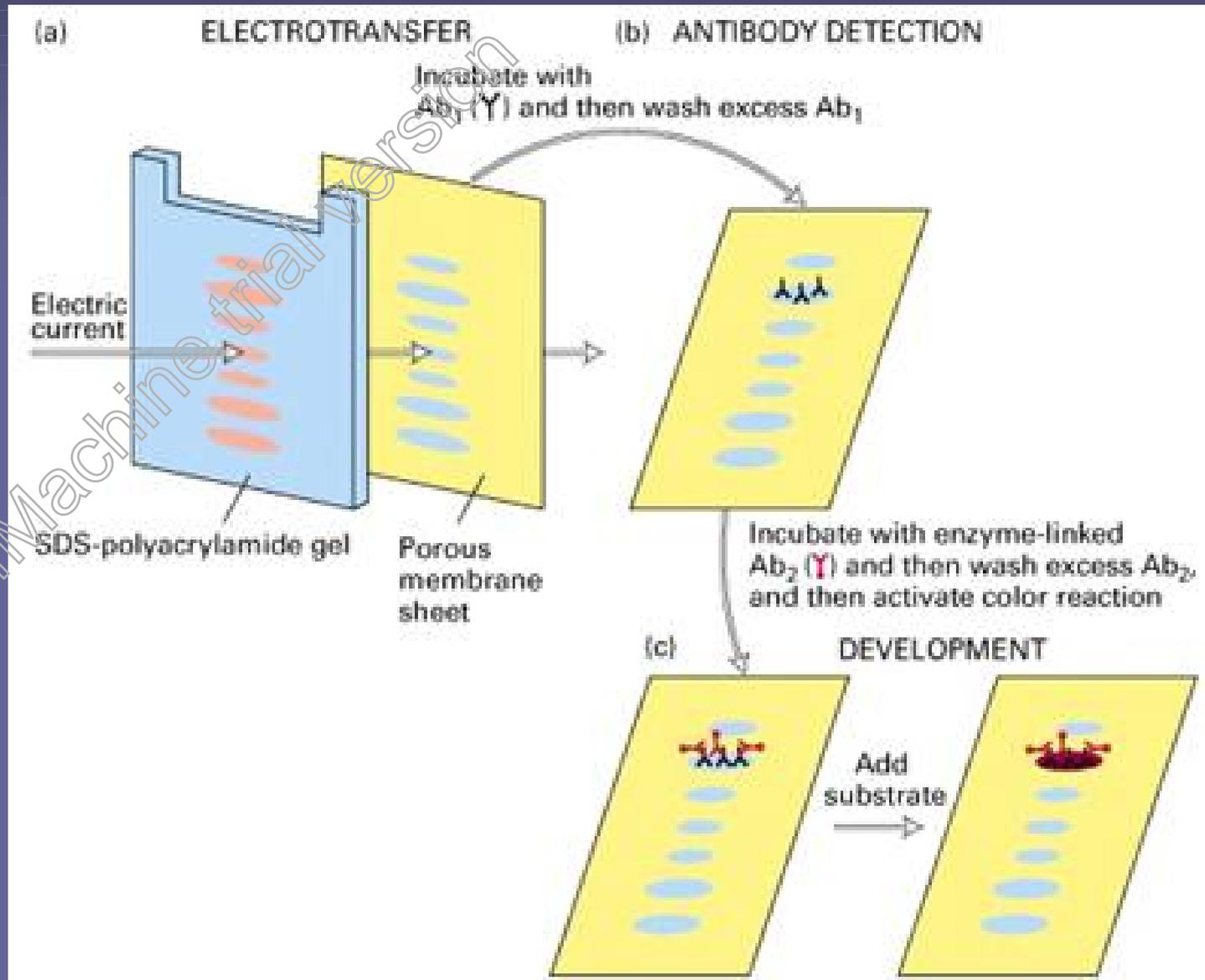


Seme intero



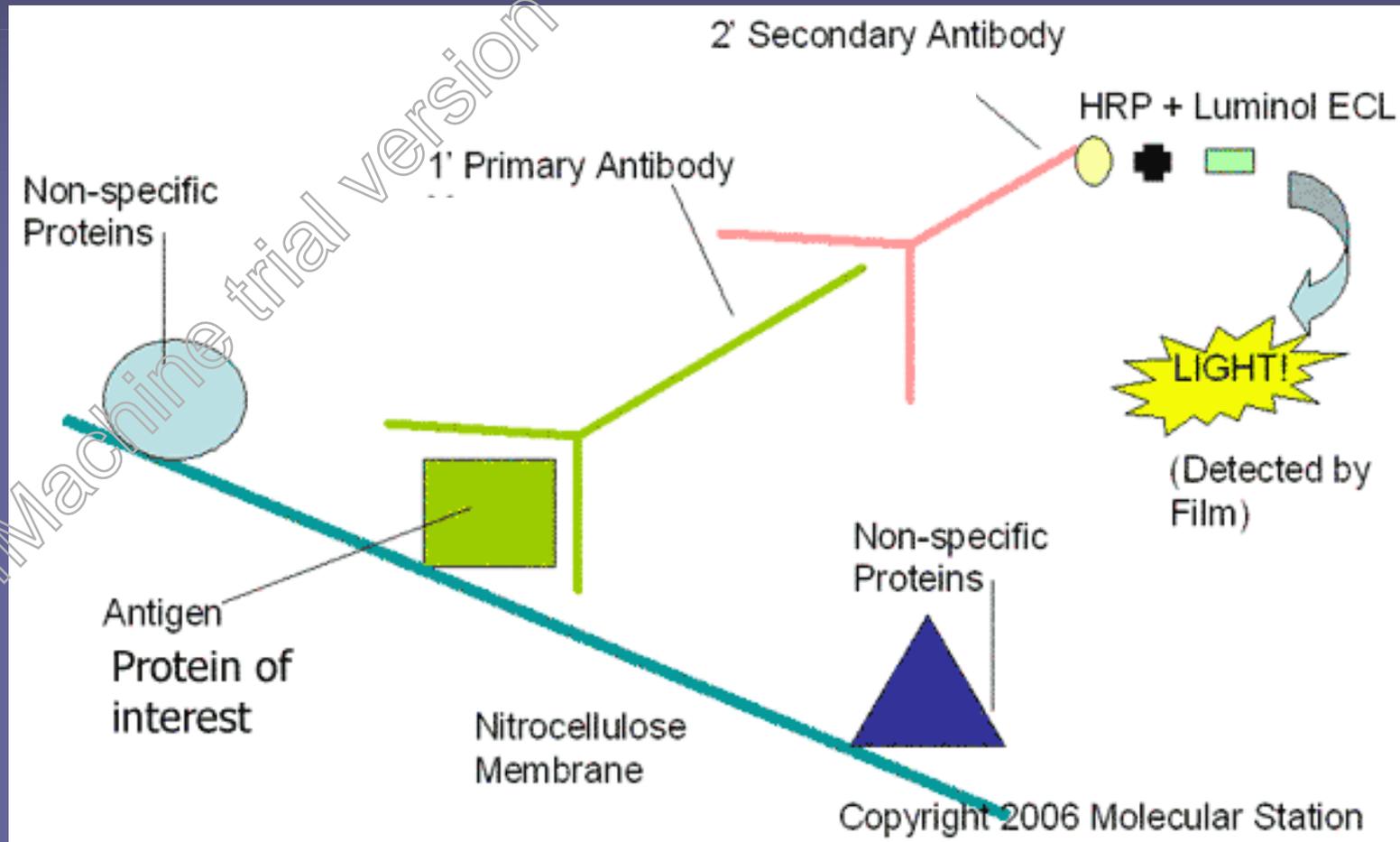
Farina proteica

2° step: ricerca proteina CP4-EPSPS (5-enolpiruvil-scichimato-3-fosfato sintetasi)



2° step: ricerca proteina CP4-EPSPS (5-enolpiruvil-scichimato-3-fosfat sintetasi)

Sviluppo lastra fotografica tramite reazione di chemoluminescenza



UTILIZZO ANTICORPO POLICLONALE ANTI- EPSPS

Dall'analisi si evidenzia (figura non disponibile) come la proteina CP4-EPSPS (PM 58KDa) subisca una parziale degradazione durante le fasi di lavorazione dei semi di soia OGM generando prodotti a più basso peso molecolare.

Questi frammenti potrebbero comportarsi come proteine allergeniche nei soggetti a rischio.

PRINCIPALI ALLERGENI DELLA SOIA:

•Gly m1 β conglucina α subunità 63 kDa
 α' subunità 74 kDa
 β subunità 50 kDa

•Gly m2 Glicinina G1 55 kDa
Glicinina G2 54 kDa
Glicinina G3 54 kDa
Glicinina G4 63 kDa

•Gly m3 Profilina 1 14 kDa
Profilina 2 14 kDa

•Gly m Bd 28K Cupina 52 kDa

•Kuniz type protase inhibitors 16-20 kDa

Step successivo:

***Utilizzo di sieri di pazienti allergici alla soia
per l'individuazione di possibili nuove proteine
allergeniche generate durante il processo industriale
o per valutare la degradabilità delle stesse***