

*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 SO<sub>2</sub>**

## ***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***

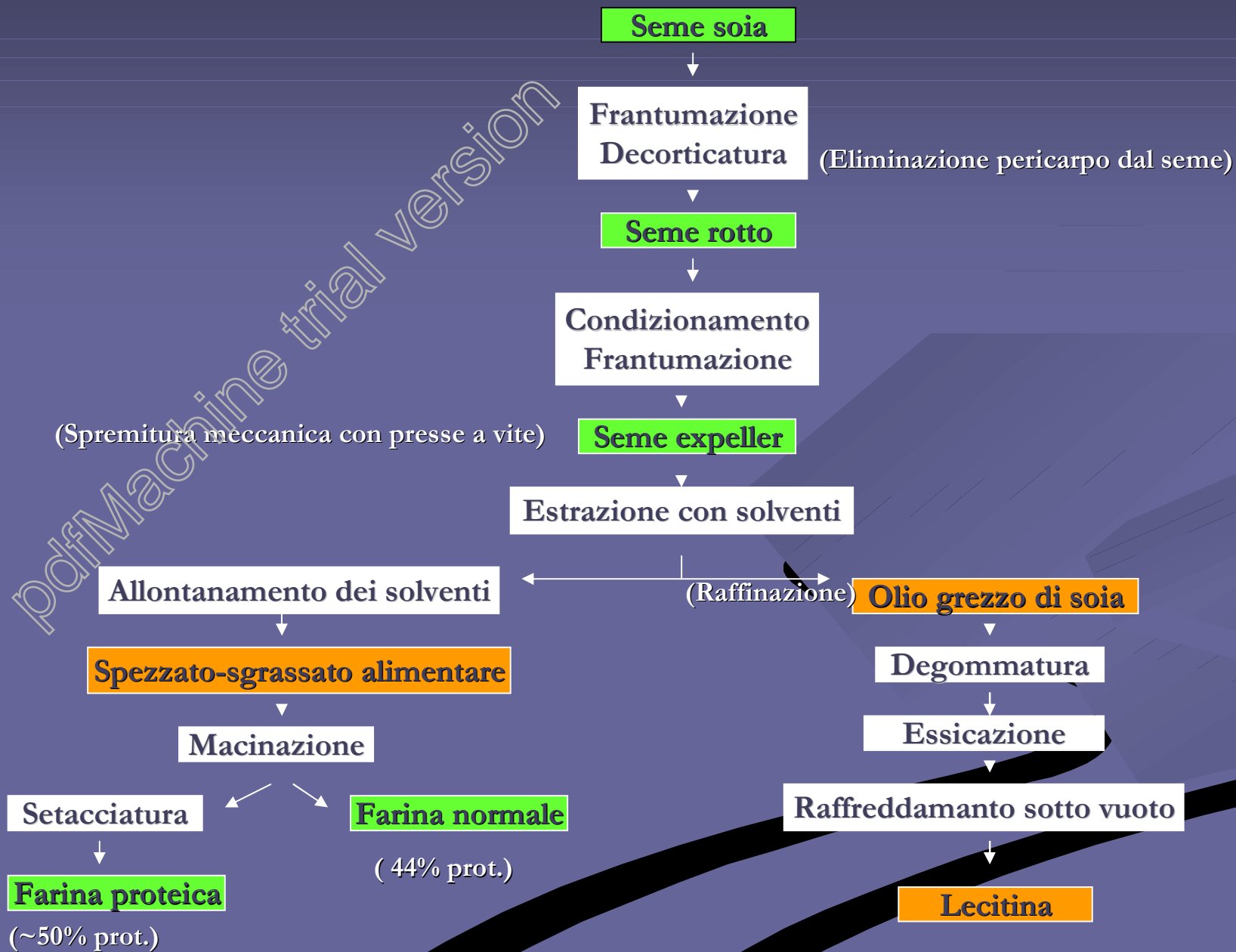
## **Relazione tra temperatura e denaturazione proteica**

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

## ***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

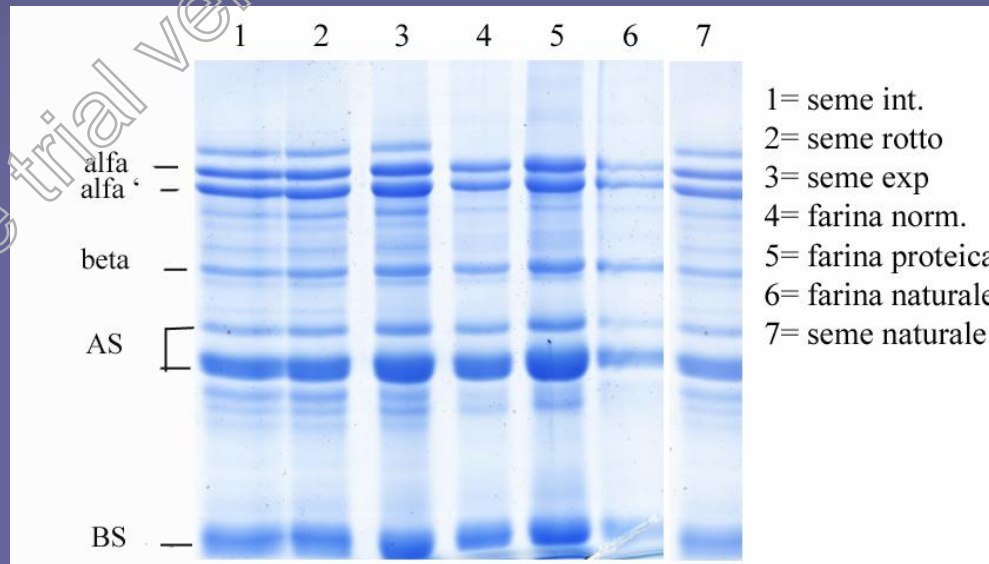


## **FASI SPERIMENTALI DELLO STUDIO**

- 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**  $HS-CH_2CH_2OH$

- *rompe eventuali legami disolfuro*

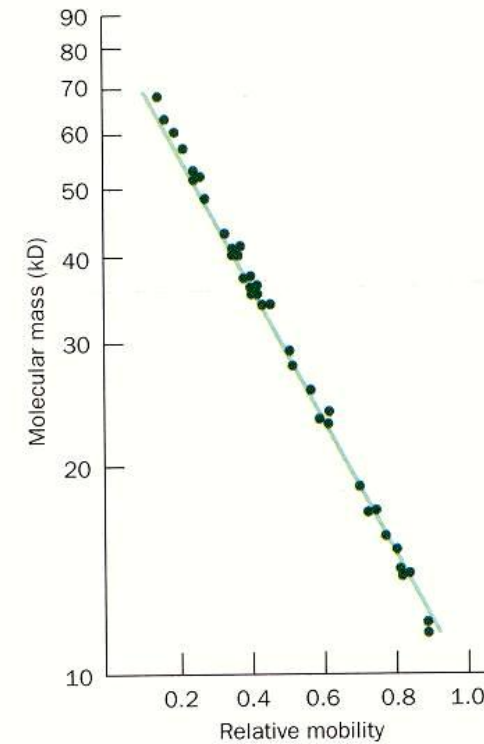
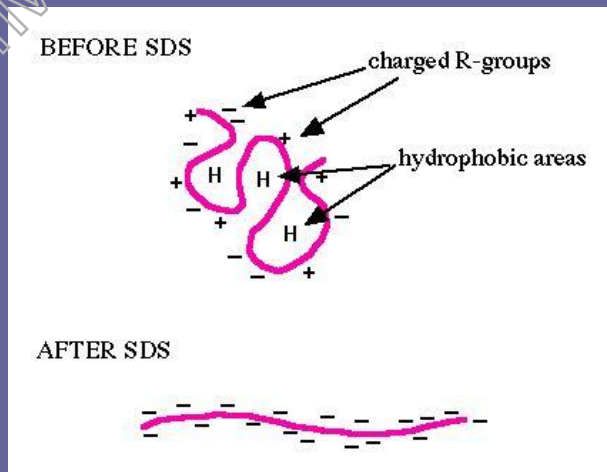
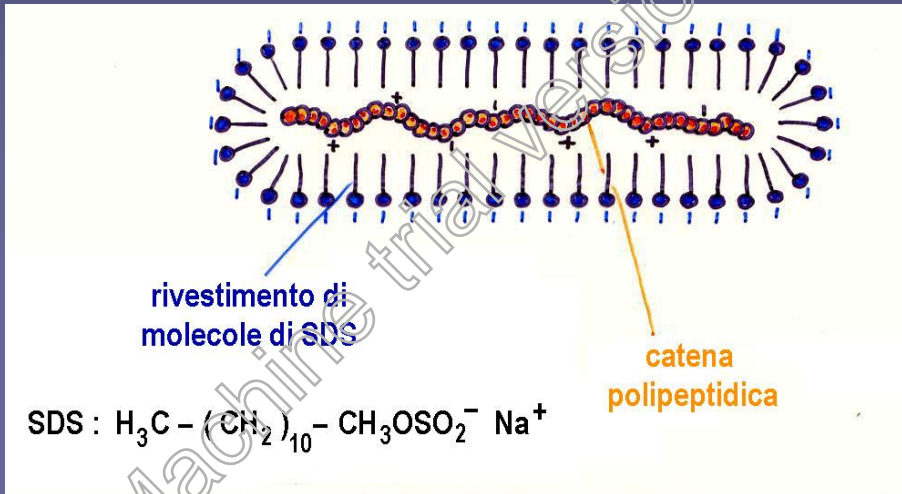
- **Temperatura (100 °C)**

- *accelera la denaturazione completa*



# SDS-PAGE

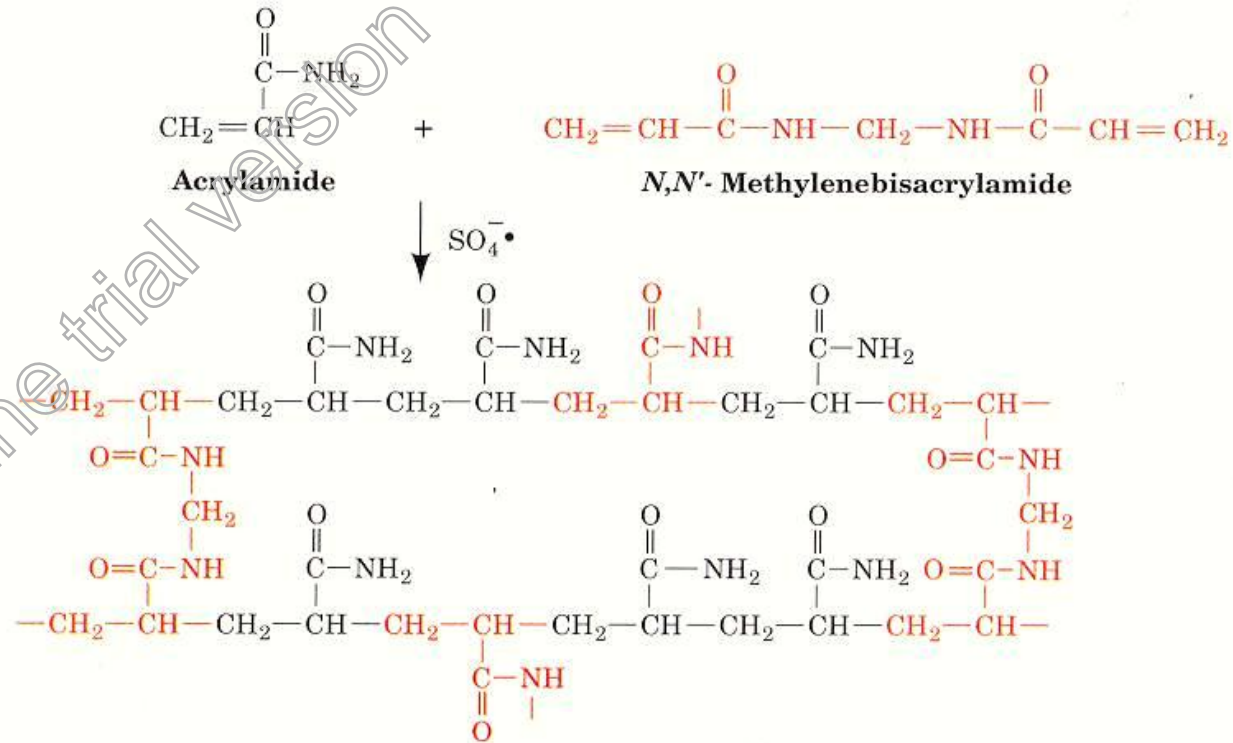
## (Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis)



**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).]

## Formazione di un gel di poliacrilammide



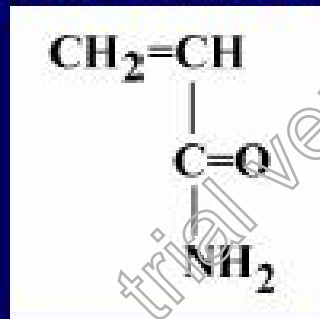
**Figure 5-21**

The polymerization of acrylamide and *N,N'*-methylenebisacrylamide to form a cross-linked polyacrylamide gel. The polymerization is induced by free radicals resulting from the chemical decomposition of **ammonium persulfate** ( $\text{S}_2\text{O}_8^{2-} \rightarrow 2\text{SO}_4^{\bullet-}$ ) or the photodecomposition of riboflavin in the presence of traces of  $\text{O}_2$ . In either case, ***N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine**

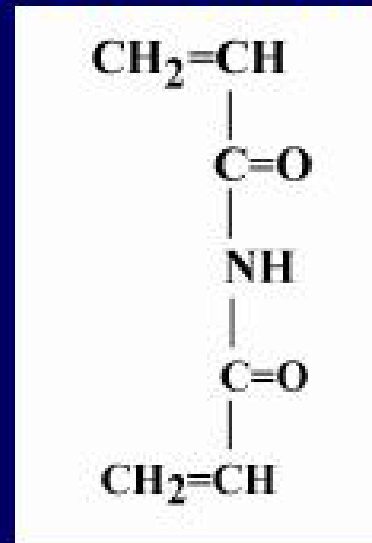
**(TEMED)**, a free radical stabilizer, is usually added to the gel mixture. The physical properties of the gel and its pore size are controlled by the proportion of polyacrylamide in the gel and its degree of cross-linking. The most commonly used polyacrylamide concentrations are in the range 3 to 15% with the amount of *N,N'*-methylenebisacrylamide usually fixed at 5% of the total acrylamide present.

# POLIACRILAMIDE

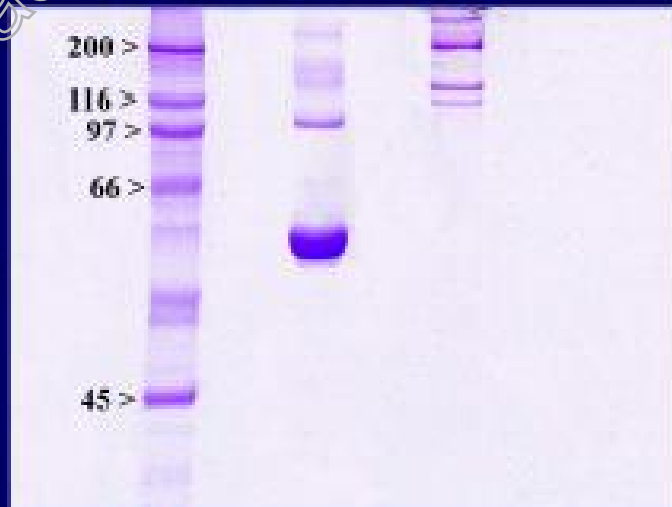
**Acrilamide**



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



SDS-PAGE gel 8%



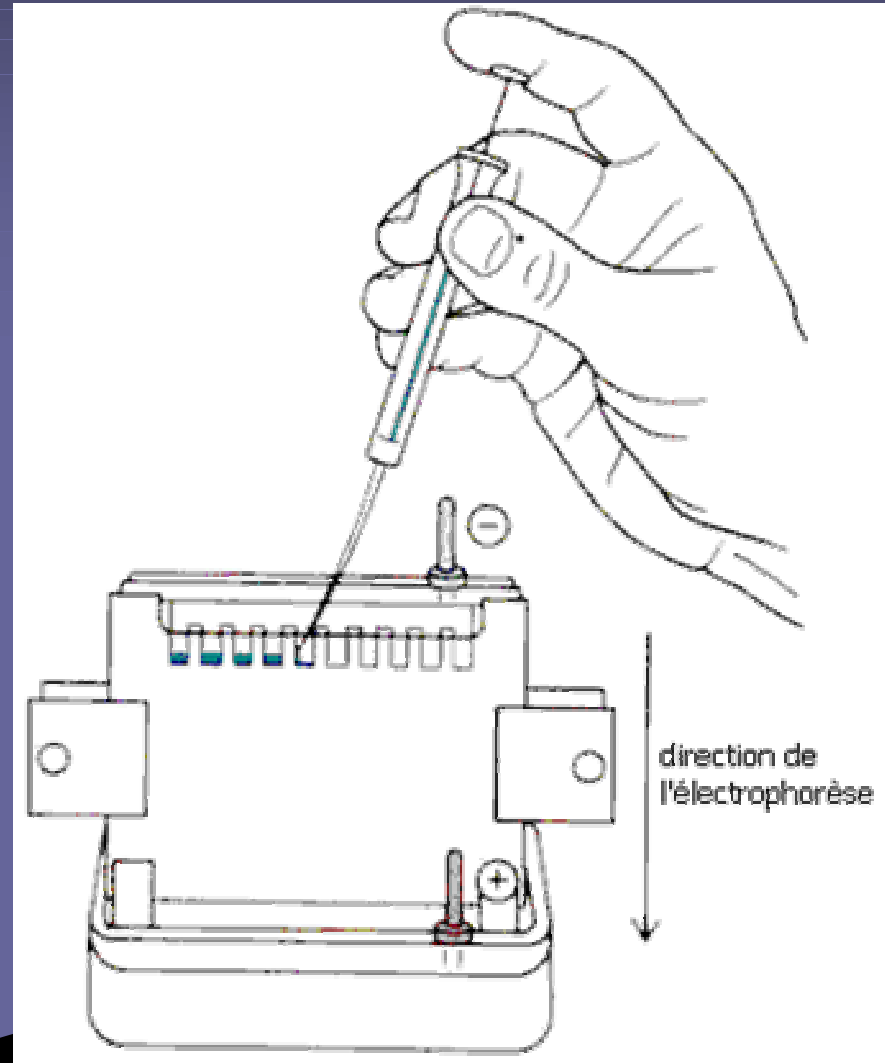
PM  
kDa

1

2

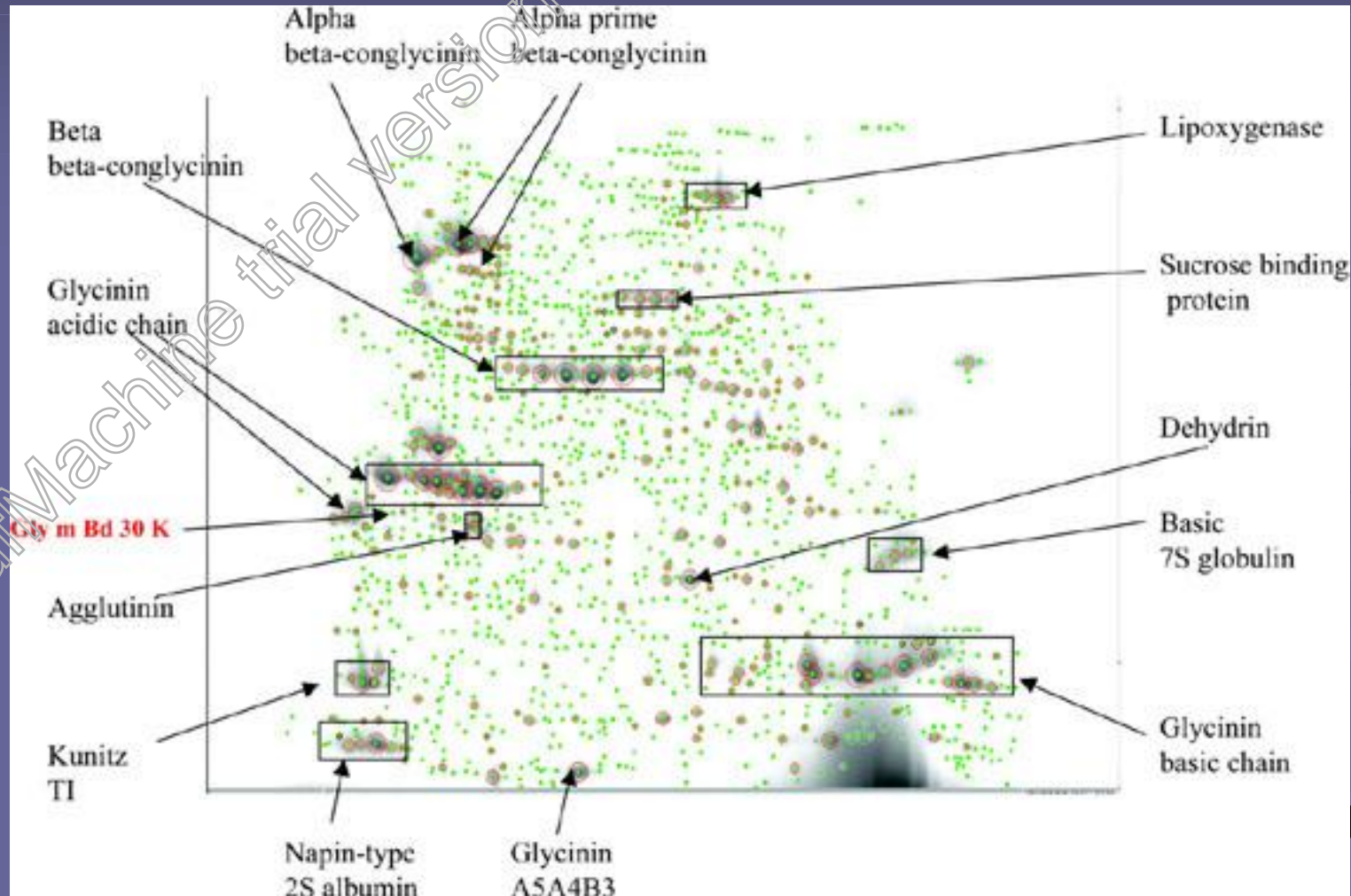
Gel colorato con Blu Comassie

## 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)**



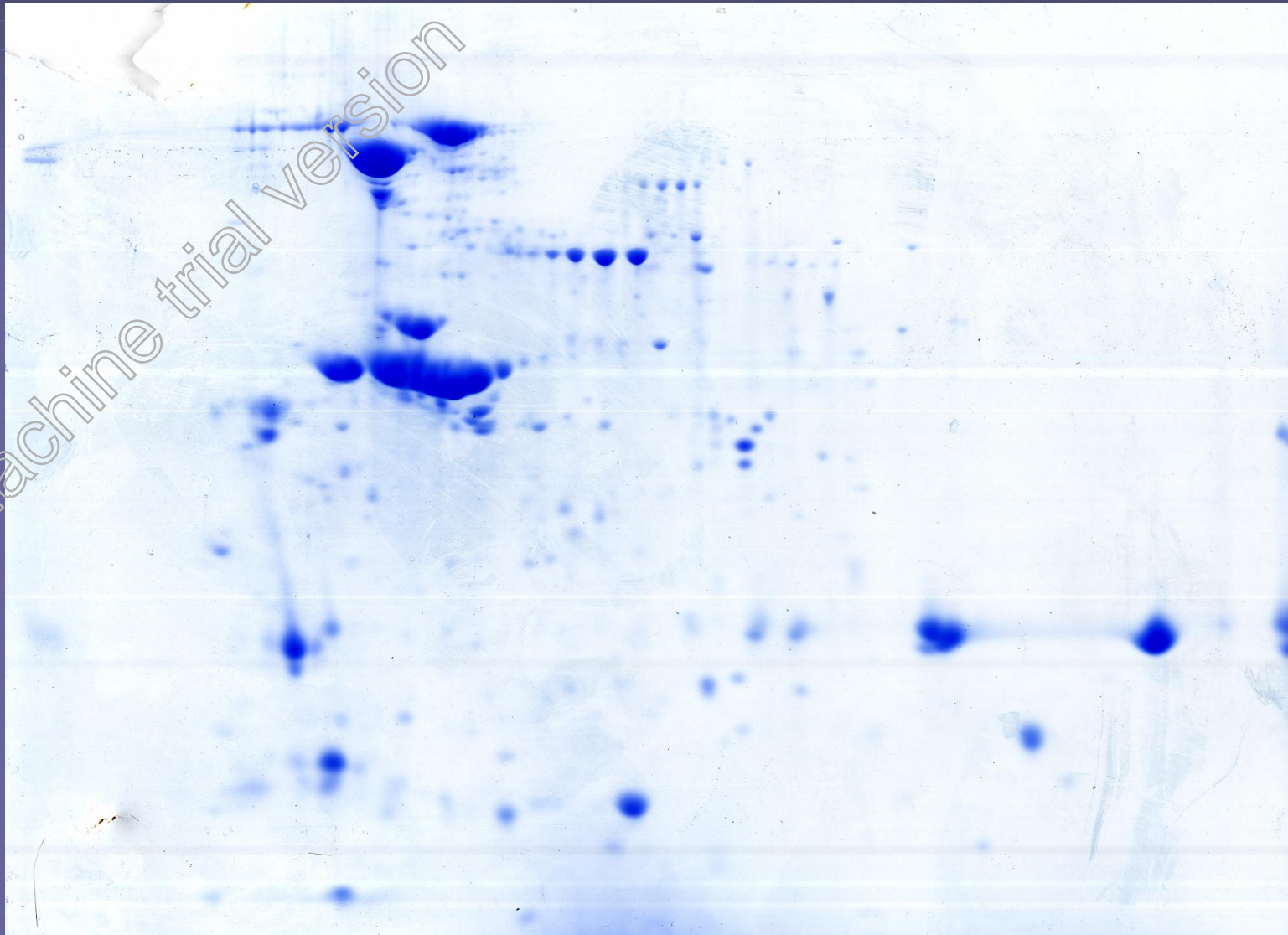
Dall'articolo: "genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean" *Plant Physiology*, May 2003, vol.132, pp.36-43

# *Proteoma seme di soia Roundup-ready intero*

pH 3

10

PM  
150KDa



10 KDa

# MATERIALI E METODI

Phor



Estrazione proteine

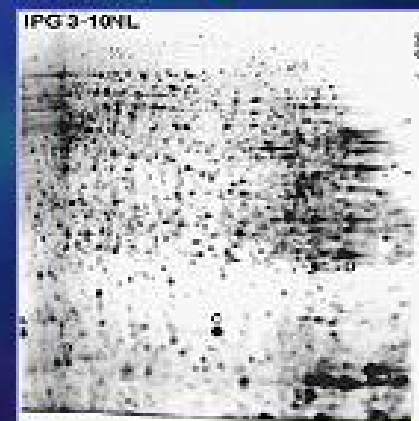
Preparazione del campione per IEF  
(reidratazione)

Corsa elettroforetica  
in prima dimensione

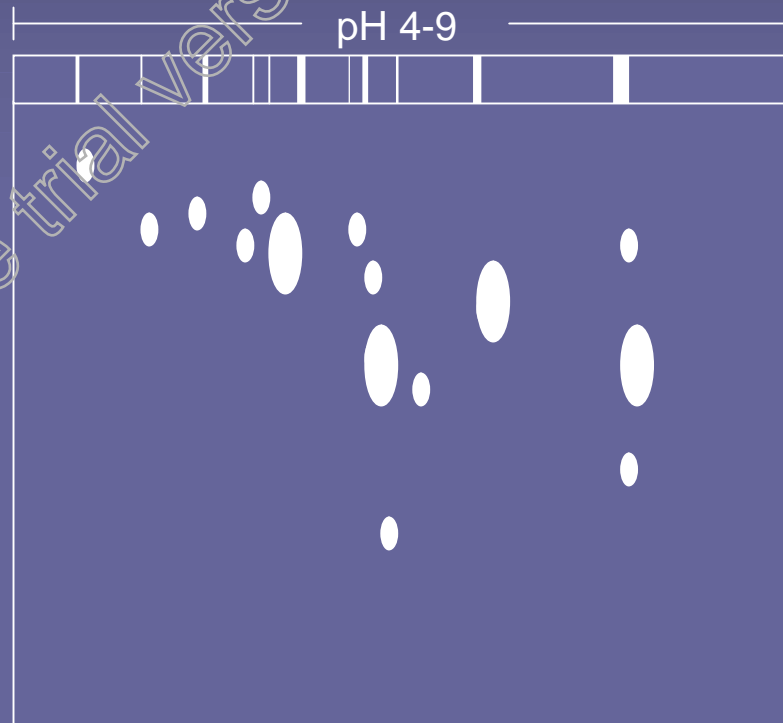
*equilibrata*

Corsa elettroforetica  
in seconda dimensione

Colorazione gel



# MAPPA PROTEICA



STRIP -1D

SDS-PAGE - 2D



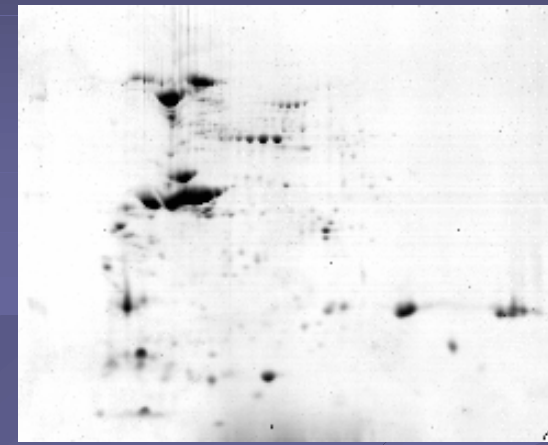
## **GELS BIDIMENSIONALI RELATIVI AD ALCUNE FASI DELLA LAVORAZIONE DELLA SOIA ROUND-UP READY**



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

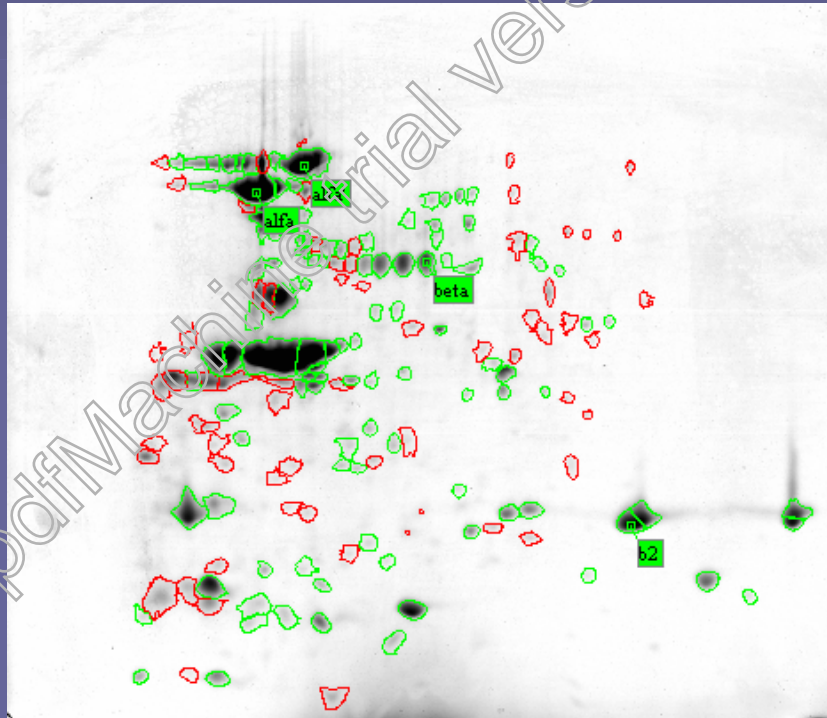


**FASE CRUCIALE**  
influenza l'IEF e 2D in termini di

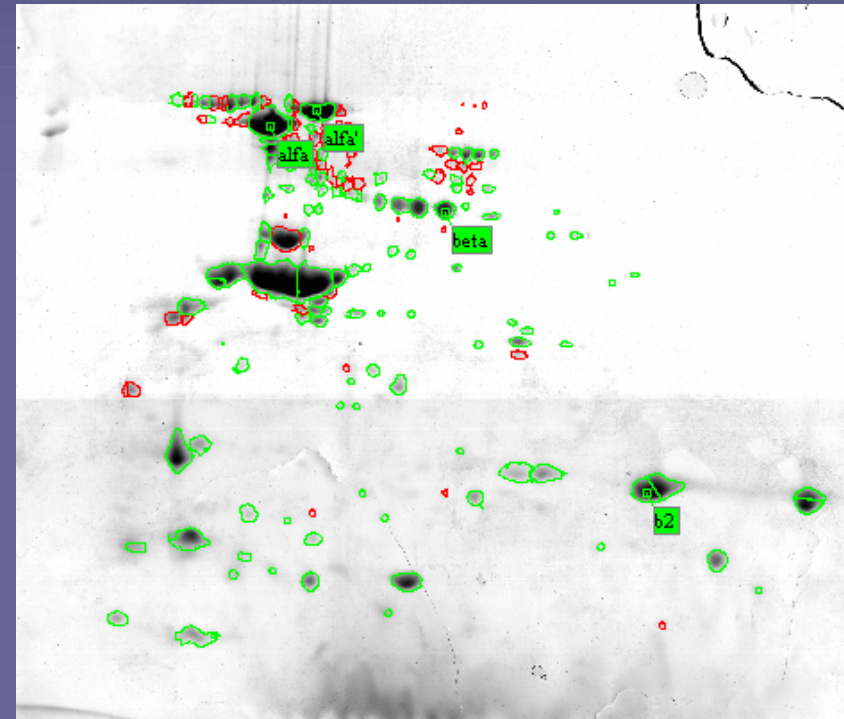
- qualità
- quantità
- distribuzione delle proteine

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

pH 3-10



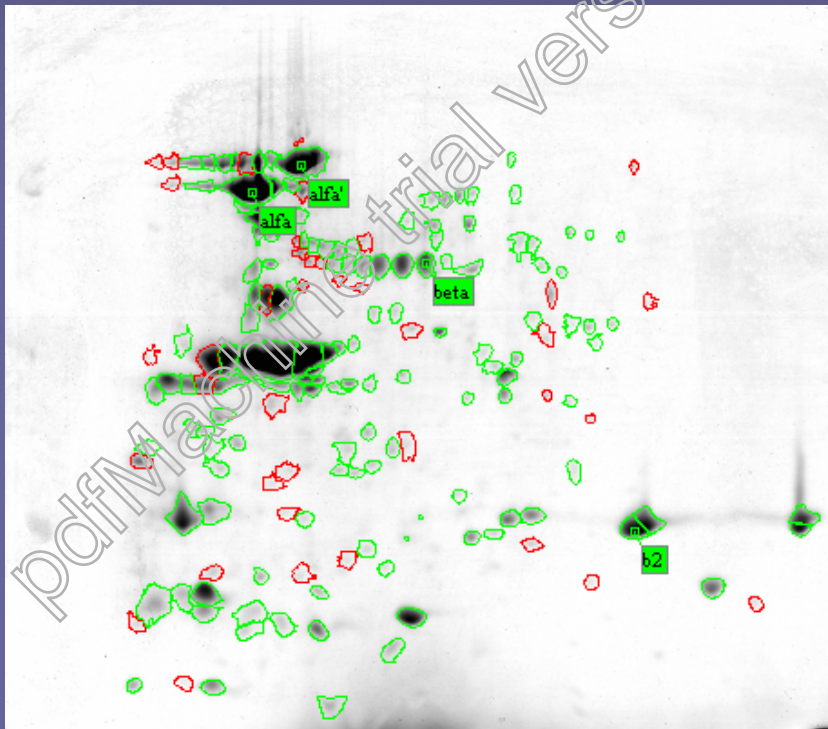
Seme intero



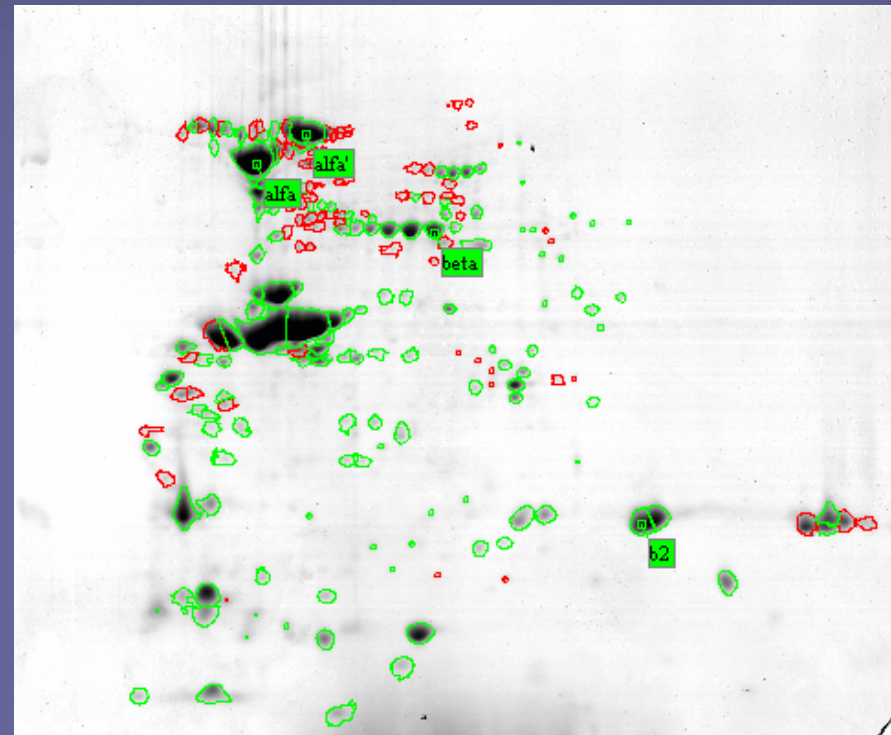
Seme rotto

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

pH 3-10



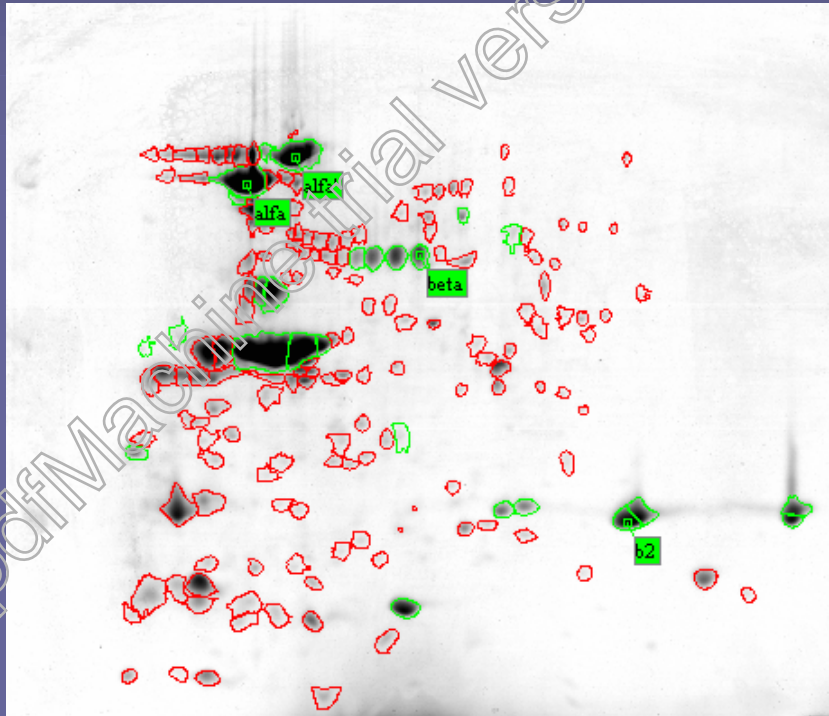
**Seme intero**



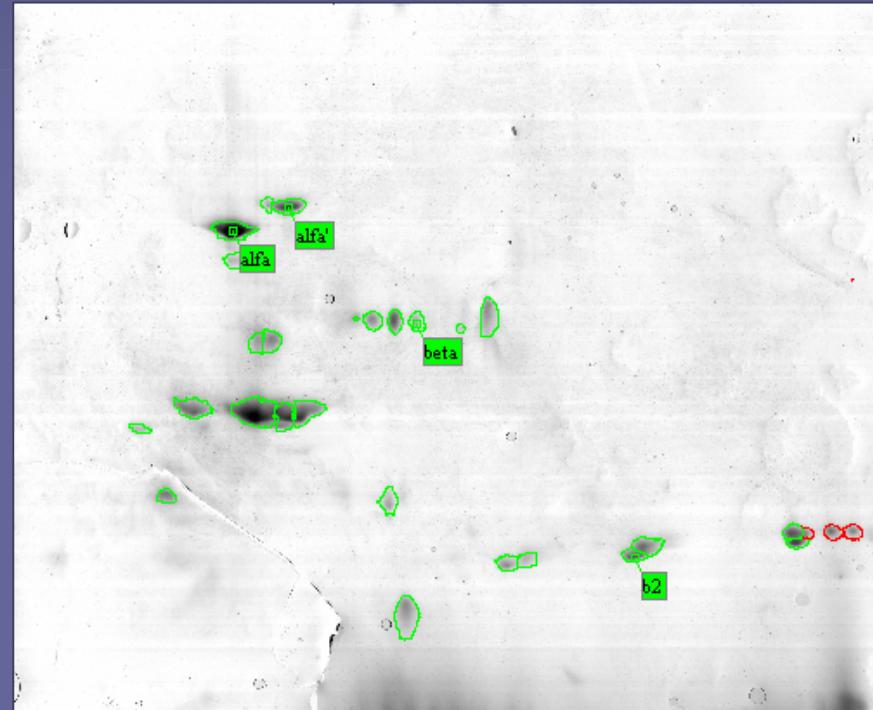
**Seme expeller**

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

pH 3-10



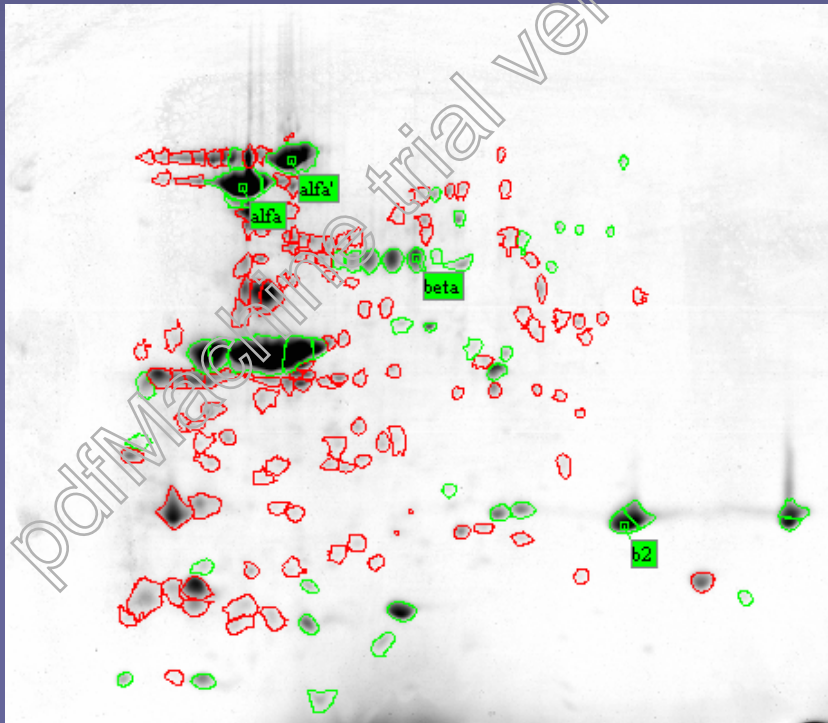
Seme intero



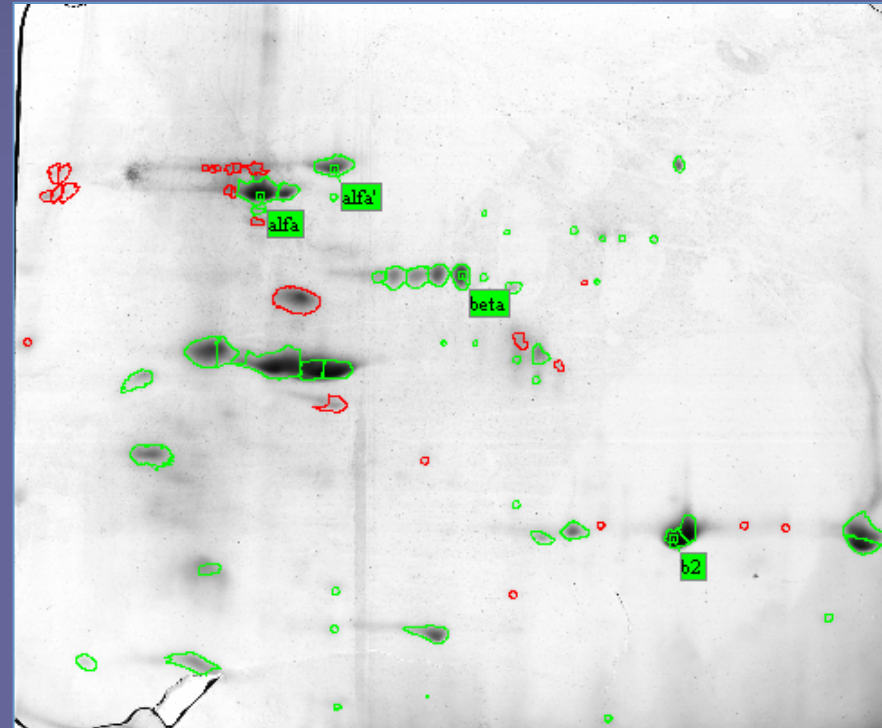
Farina normale

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

pH 3-10

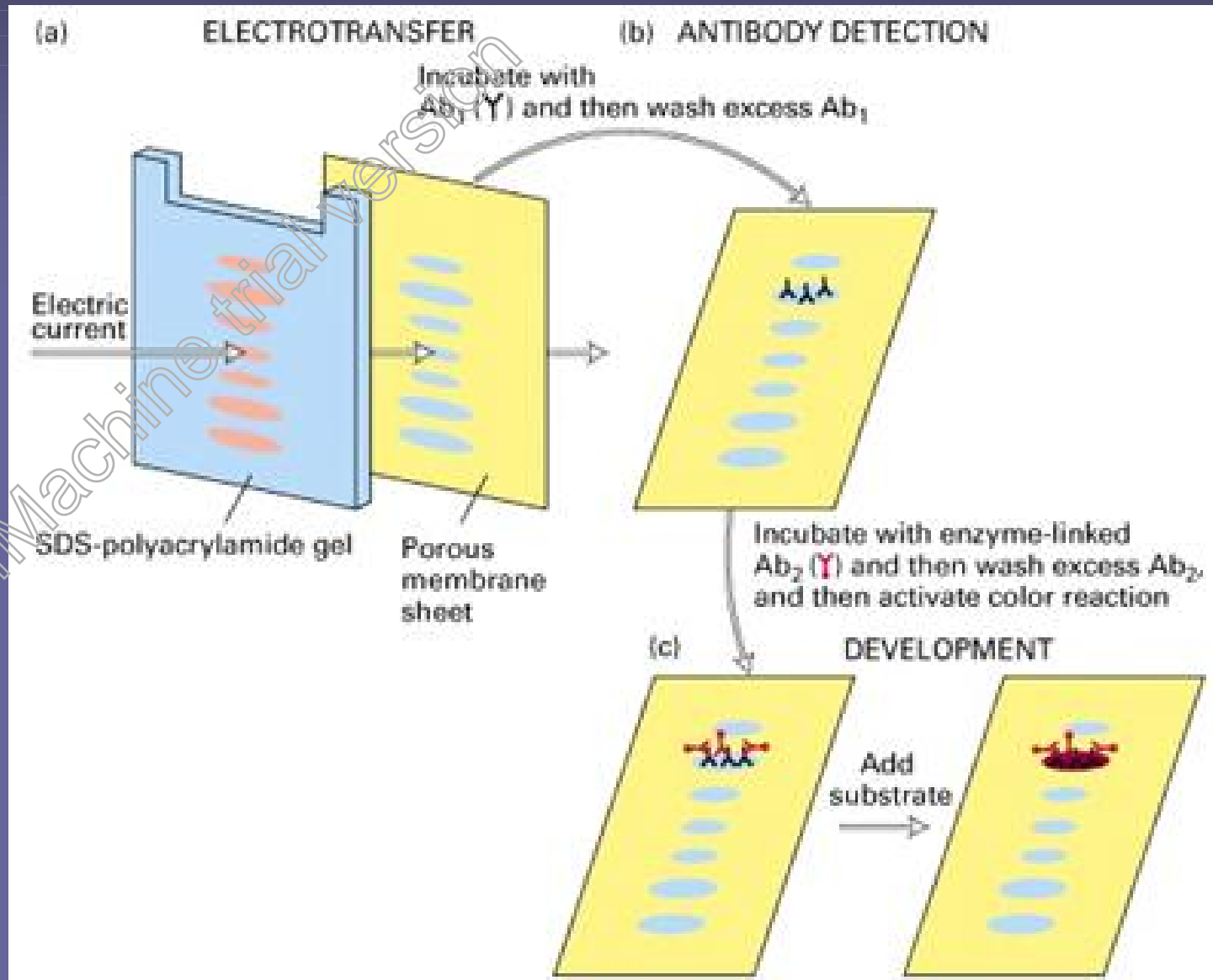


Seme intero



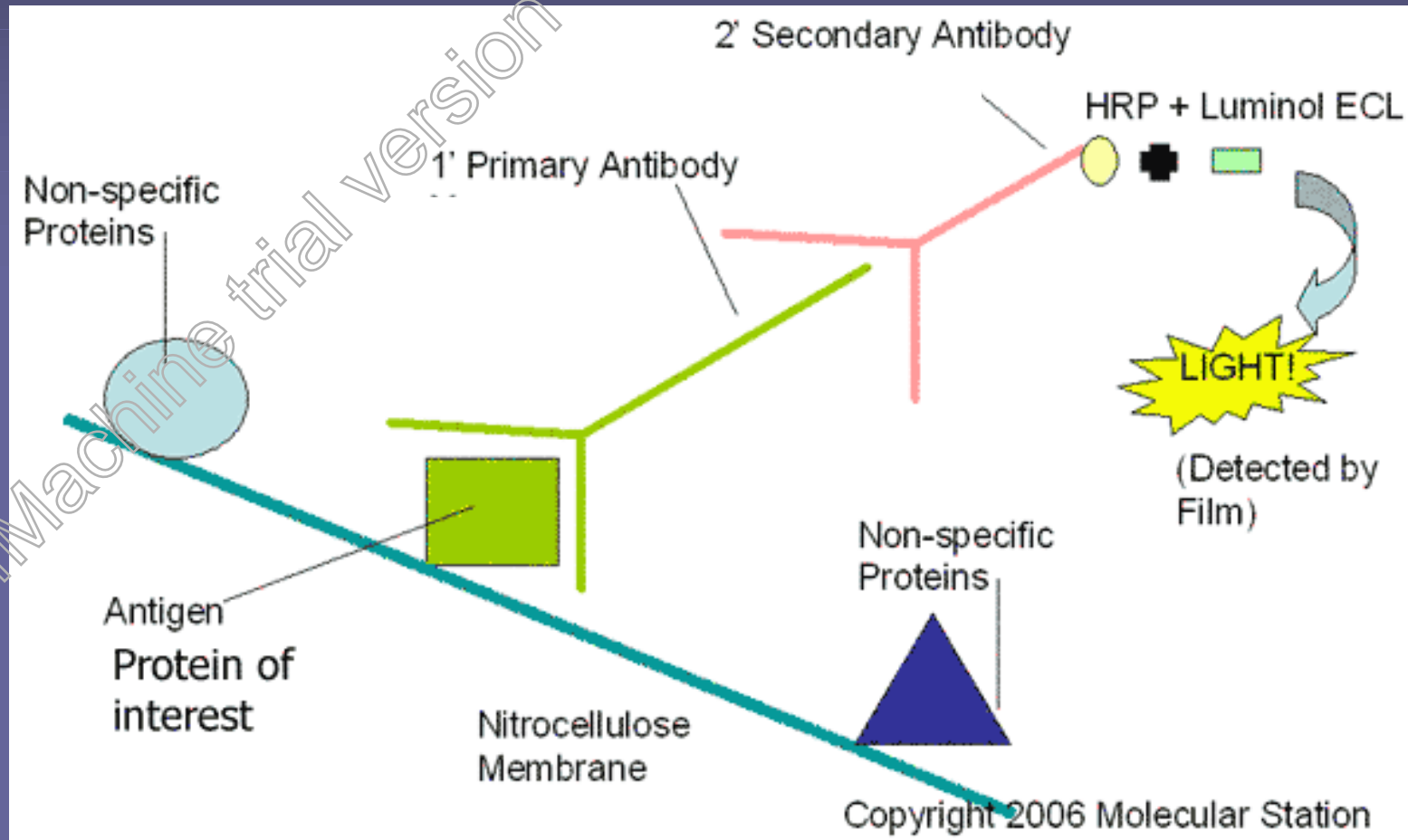
Farina proteica

## 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	$\beta$ conglucina	$\alpha$ subunità	63 kDa
		$\alpha'$ subunità	74 kDa
		$\beta$ 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***