



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE E TECNOLOGIE

DELLE PRODUZIONI AGRO-ALIMENTARI

XXII CICLO

**“Caratterizzazione della componente polipeptidica della birra
e identificazione di epitopi potenzialmente immunogenici per i
pazienti celiaci”**

Relatore:

Ch.mo prof.
Pasquale Ferranti

Correlatore:

Dottor
Gianluca Picariello

Dott.ssa Carolina Pepe

INDICE

- PREMESSA.....	3
1. INTRODUZIONE	
1.1. LA BIRRA E I SUOI COMPONENTI.....	4
1.2. PROCESSO DI PRODUZIONE DELLA BIRRA	5
1.2.a. LA MALTAZIONE.....	5
1.2.b. LA LUPPOLATURA.....	8
1.2.c. LA FERMENTAZIONE	9
1.2.d. LA FILTRAZIONE ED IL CONFEZIONAMENTO.....	11
1.3. CELIACHIA	12
1.3.1 FATTORI GENETICI	13
1.3.2 SISTEMA HLA	14
1.3.3 PROTEINE TOSSICHE E/O IMMUNOGENICHE	16
1.4. PROTEINE DELL'ORZO.....	21
1.5. CONTENUTO PROTEICO DELLA BIRRA	26
2. OBIETTIVI DELLA RICERCA	30
3. MATERIALI E METODI	32
3.1. ESTRAZIONE DELLA FRAZIONE PROTEICA DELLA BIRRA	32
3.2. ANALISI ELETTROFORETICA ED IMMUNOBLOTTING	33
3.3. DIGESTIONE IN GEL DELLE BANDE PROTEICHE	36
3.4. CROMATOGRAFIA AD ESCLUSIONE MOLECOLARE (SEC)	37
3.5. ANALISI CROMATOGRAFICA DEGLI ESTRATTI PEPTIDICI DELLA BIRRA	38

3.6. ANALISI IN SPETTROMETRIA DI MASSA MALDI-TOF DELLE MISCELE PEPTIDICHE	38
3.7. CROMATOGRAFIA LIQUIDA – SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM ELECTROSPRAY (LC-ESI MS/MS)	40
3.8. SAGGI ELISA CON METODO COMPETITIVO	41
3.9. ANALISI ELETTROFORETICA DI 5 CAMPIONI DI BIRRA	42
4. RISULTATI	
4.1. CARATTERIZZAZIONE DELLA FRAZIONE PROTEICA DELLA BIRRA	43
4.2. CROMATOGRAFIA AD ESCLUSIONE MOLECOLARE	46
4.3. RILEVAZIONE IMMUNOCHEMICA DELLE ORDEINE NELLA BIRRA	50
4.4. ANALISI CROMATOGRAFICA DEGLI ESTRATTI PEPTIDICI DA BIRRA	52
4.5. ANALISI IN SPETTROMETRIA DI MASSA MALDI-TOF DELLE MISCELE PEPTIDICHE	53
4.6. ANALISI NANO-HPLC MS E MS/MS DEI PEPTIDI DELLA BIRRA	54
4.7. SAGGI ELISA CON METODO “COMPETITIVO”	56
4.8. DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN GLUTINE DI BIRRE ITALIANE ED ESTERE CON KIT COMMERCIALI	59
4.9. CONFRONTO PRELIMINARE DEL CONTENUTO PROTEICO DI BIRRE PRODOTTE CON CEREALI DIVERSI DALL’ORZO	60
5. DISCUSSIONE	62
6. CONCLUSIONI	68
7. BIBLIOGRAFIA	70
8. FIGURE E TABELLE	75

PREMESSA

Il seguente lavoro nasce dal proposito di approfondire le conoscenze relative alla caratterizzazione della frazione proteica e polipeptidica nella birra, allo scopo di determinare, qualitativamente e quantitativamente, sequenze peptidiche potenzialmente immunogeniche, responsabili dell'induzione della malattia celiaca. Dopo una panoramica generale, nella quale si richiamano concetti e acquisizioni sui processi di produzione della birra in considerazione della potenziale permanenza di proteine o loro derivati idrolitici, viene brevemente trattato il problema della malattia celiaca. Si passa quindi alla disamina degli studi condotti in passato e più recentemente sulla caratterizzazione delle proteine dell'orzo (ordeine) nel prodotto finito. La sezione prettamente sperimentale del lavoro di tesi è focalizzata sulla caratterizzazione delle proteine e in particolare del materiale peptidico a basse masse molecolari, in due birre commerciali italiane scelte come campioni rappresentativi. Infine, alla luce delle sequenze polipeptidiche identificate nella birra, viene analizzato e discusso il potenziale ruolo nell'induzione della malattia celiaca.

1. INTRODUZIONE

1.1. LA BIRRA E I SUOI COMPONENTI

Secondo la legge del 16 agosto 1962, n. 1354 e sue successive modifiche, la birra è il prodotto ottenuto dalla fermentazione alcolica con ceppi di *Saccharomyces Carlsbergensis* e di *Saccharomyces Cerevisiae* di un mosto preparato con malto di orzo o di frumento o di loro miscele ed acqua, amaricato con luppolo o suoi derivati o con entrambi. Nella produzione della birra è consentito l'impiego di estratti di malto torrefatto e degli additivi alimentari consentiti dal Decreto del Ministero della Sanità n. 209/96. In alcuni paesi e per certe birre è ammesso l'uso di zucchero. Secondo la stessa legge, la fermentazione alcolica del mosto può essere integrata con una fermentazione lattica.

Due sono le caratteristiche che hanno da sempre contraddistinto la storia della birra nei secoli: la sua presenza pressoché universale, e la sua popolarità in ogni ceto sociale. La birra si compone essenzialmente di acqua, le cui virtù garantiscono la bontà della bevanda. Una birra è buona quando l'acqua è ricca di sostanze minerali e organiche nonché di microrganismi quali batteri, lieviti e altri ancora. Non che i sali minerali influenzino direttamente il sapore della birra; tuttavia questi contribuiscono alle reazioni diastatiche e colloidali che avvengono nel corso della produzione, vale a dire i processi di disgregazione e riagggregazione delle sostanze.

Il cereale più usato è, ed è sempre stato, l'orzo, anche se, a tutt'oggi, esistono birre di frumento, di segale, di riso, di mais e di altre granaglie ancora. Dell'orzo esistono numerose varietà, ma sono solo tre quelle che vengono usate nel mondo birrario: orzo distico, tetrastico ed esastico. Ogni spiga d'orzo è formata da una serie di nodi o rachidi, ciascuna delle quali sostiene sei fiori potenziali. La distinzione tra orzo distico, tetrastico o esastico avviene a seconda che due, quattro o sei fiori vengano resi fertili, sviluppando un pari numero di chicchi sulle rachidi. Le caratteristiche più importanti dell'orzo sono l'umidità (che deve essere inferiore al 15%), la capacità germinativa (non inferiore al 95%), la ricchezza enzimatica ed il contenuto proteico.

1.2. PROCESSO DI PRODUZIONE DELLA BIRRA

In linea generale il processo di birrificazione si articola in cinque fasi:

- a. MALTAZIONE
- b. LUPPOLATURA
- c. FERMENTAZIONE
- d. FILTRAZIONE
- e. CONFEZIONAMENTO

1.2.a. LA MALTAZIONE

La maltazione (o maltaggio) genera l'induzione della germinazione dei semi, ed è fondamentale per l'arricchimento della cariosside di enzimi. Questi, come è noto,

sono indispensabili alle trasformazioni che devono avere luogo nel corso del maltaggio e successivamente durante l'ammortatura. All'inizio della maltazione, l'endosperma contiene sostanze ad elevato peso molecolare, le quali devono essere degradate ed avere molecole a basso peso molecolare per poter essere trasportate con l'aiuto dell'acqua.

Le principali trasformazioni alle quali è soggetto l'orzo nel corso del maltaggio avvengono a carico delle proteine e dell'amido. Dei molti enzimi e complessi enzimatici presenti nell'orzo, quelli che hanno particolare importanza sono: gli enzimi che degradano l'amido α e β -amilasi e le destrinasi; enzimi citolitici endo ed eso B-glucanasi, b-glucano solubilasi e endo xilanasi; enzimi che degradano le proteine proteasi e peptidasi ed infine le lipasi che degradano i grassi. Ad eccezione della α -amilasi che non è ancora presente nell'orzo, tutti gli eso-enzimi sono presenti in piccola quantità nell'orzo. La formazione degli enzimi avviene parallelamente con la respirazione. Gli enzimi proteolitici solubilizzano l'albume (proteine solubili quali albumina e globulina) del corpo farinoso, trasformandolo in peptoni e aminoacidi. L'amido è modificato solo in misura minima durante la germinazione. Gli enzimi emicellulosolitici liberano le amilasi che passano dallo scutello al corpo farinoso e, dopo l'attivazione da parte di enzimi proteolitici, incominciano ad idrolizzare l'amido in destrine (miscele di frammenti di polisaccaridi) e maltosio.

L'orzo è sottoposto a pulitura e vagliatura per eliminare gli eventuali corpi estranei. Segue la fase di macerazione o ammollimento: l'orzo viene messo a bagno

a 12 C° per due, tre giorni, e poi lasciato germinare per sei, dieci giorni a 20 C°. Alla fine della germinazione il malto viene gradualmente portato alla temperatura di 30°C e lasciato a tale temperatura per 25 ore per permettere l'azione enzimatica. Poi viene portato a 50°C e lasciato per 12 ore ad asciugare, perché è necessario che sia completamente asciutto prima di essere tostato per prevenire la distruzione degli enzimi. La tostatura del malto, che avviene a temperature comprese tra i 60 e 90°C, insieme alla modificazione, determina il tipo e il carattere del prodotto. La temperatura poi viene innalzata a circa 140°C, e mantenuta costante fino al raggiungimento del colore desiderato. Il contenuto di albumina delle cariossidi influenza il colore del malto durante la torrefazione. Infatti, per birre chiare si usano cereali con il 9-12% di albumine, mentre per le birre scure, cereali con l'11-13% di albumine. Al termine dell'essiccazione, le cariossidi sono liberate dalle radichette (che essendo secche si staccano facilmente) che impartirebbero sapori anomali e intorbiderebbero la birra. Il prodotto così ottenuto costituisce il malto che contiene: 1,5-3% di umidità, 50-60% di amido, 10-12% di cellulosa e pectine e 8-9% di proteine. Il malto poi passa alla macina attraverso un setaccio ed è ridotto in farina. La farina viene immessa nel tino di miscela assieme ad acqua calda e cotta, al fine di estrarre tutte le sostanze solubili e solubilizzabili attraverso l'azione delle diastasi e di altri enzimi. Segue la fase di ammostatura che può avvenire per infusione o per decozione. Nell'ammostatura per infusione il malto si impasta con acqua a 40°C, quindi si aggiunge acqua a 80°C fino a portare la massa a 63-65°C in circa mezz'ora. La massa viene tenuta sotto agitazione per 1 ora a questa

temperatura. Se invece viene effettuata l'ammostatura per decozione, il malto si impasta con acqua fredda, poi circa la metà dell'impasto di mosto viene trasferito in un tino di saccarificazione dove viene riscaldata fino all'ebollizione e ritrasferita nel primo tino. Tale operazione è ripetuta più volte, fino a che la massa arriva ad una temperatura di circa 75-80°C. Nella fase di ammostatura si ha la demolizione dell'amido in amilosio e amilopectina. L'amilosio viene idrolizzato in maltosio fermentescibile mentre l'amilopectina in destrine non fermentescibili. Alla fine dell'ammostatura tutto l'amido è trasformato per il 60% in amilosio e per il 40% in destrine (saccarificazione). La temperatura ottimale di azione delle amilasi è tra 72 e 78°C. Si formano inoltre peptidi e aminoacidi che favoriscono la formazione della schiuma e la crescita dei lieviti. Il mosto è quindi scaricato nei tini di chiarificazione, dove vengono separate le trebbie.

1.2.b. LA LUPPOLATURA

Al termine dell'operazione di chiarificazione il mosto limpido è trasferito nei tini di cottura e di luppolatura, con il cui termine si indica l'aggiunta di infiorescenze femminili della pianta rampicante *Humulus lupulus*, che, grazie al loro contenuto di umulene, α -umulone, β -luppolone, oli essenziali e tannini, conferiscono alla birra aromi particolari e il tipico sapore amaro. Generalmente si aggiungono da 150 a 400 g/hl per le birre chiare e 100-200 g/hl per le birre scure. Successivamente il mosto viene riscaldato per 1-2 ore. Il luppolo, inoltre, agisce anche come conservante fornendo stabilità alla birra e permettendole di mantenere a lungo le sue

caratteristiche organolettiche. Con questo trattamento di cottura si ha l'inattivazione degli enzimi, la solubilizzazione delle sostanze del luppolo, la coagulazione delle albumine, la concentrazione del mosto e l'eliminazione di microrganismi non desiderati. Segue la separazione delle sostanze proteico-tanniche precipitate con l'ebollizione e le trebbie del luppolo, impiegando un estrattore che spreme il luppolo per mezzo di una vite mentre il mosto chiarificato passa attraverso un setaccio collocato sotto la vite e viene introdotto in un apparecchio detto mulinello che elimina le proteine insolubili per centrifugazione. Quindi il mosto è trasferito nelle vasche di raffreddamento dove è raffreddato a temperature di 12-20°C per la produzione di birre a fermentazione alta .

1.2.c. LA FERMENTAZIONE

Protagonista assoluto della fermentazione è ovviamente il lievito, che viene immesso nel mosto alla temperatura desiderata a seconda del tipo di birra da produrre. Esso trasforma gli zuccheri e gli amminoacidi presenti nel mosto in alcol, anidride carbonica e sostanze aromatiche. I lieviti per la produzione della birra sono colture pure di ceppi che sono selezionati sulla base dei loro caratteri fisiologici, ed in particolare per il loro potere fermentativo a diverse temperature, per la capacità di formazione di schiuma, per il potere flocculante e per la produzione di composti aromatici. Il *Saccharomyces carlsbergensis*, lievito per le birre a bassa fermentazione, opera fra i 5 e gli 8 gradi, poiché oltre i 10 gradi rischierebbe di conferire al prodotto un gusto abbastanza sgradevole. Verso la fine del processo

fermentativo questo tipo di lievito tende a dividersi in due parti: grossi fiocchi che salgono verso la superficie e cellule di sfaldamento che si depositano sul fondo. Il lievito propulsore dell'alta fermentazione, il *Saccaromyces cerevisiae*, lavora invece fra i 16 e i 23°. Questi lieviti sono caratterizzati dal fatto che le cellule, durante la gemmazione, restano attaccate alla cellula madre formando così lunghe ramificazioni (pseudomicelio); essi sono inoltre finemente distribuiti nel mosto e durante la fermentazione tendono a salire in superficie dove formano uno strato compatto detto “coperchio”. I lieviti sono aggiunti al mosto fino a raggiungere concentrazioni finali di 10^7 cellule/ml. Il processo di fermentazione consta di due momenti distinti: la fermentazione tumultuosa, con la quale si ha prevalentemente produzione di alcol e anidride carbonica e la fermentazione secondaria o maturazione, con la quale si completa la fermentazione degli zuccheri fermentescibili e la formazione di altri composti che caratterizzano la birra. Nella produzione di birre di fermentazione bassa, la fermentazione primaria avviene in serbatoi chiusi alla temperatura di 8-10°C e dura da 6 a 10 giorni. Il lievito si moltiplica consumando ossigeno quindi incomincia a fermentare con produzione di CO₂ che porta alla formazione di schiuma. Con il rallentamento della fermentazione, la schiuma si trasforma in uno strato spesso e di colore bruno, mentre i lieviti flocculano depositandosi sul fondo. Per la fermentazione secondaria, la birra è travasata in altri serbatoi, dove viene lasciata maturare a temperature di 5°C prima e a 0 o a -1°C poi, per tempi variabili da qualche settimana fino a qualche mese. In questa fase, oltre a completarsi la fermentazione, vengono prodotti sostanze

aromatiche quali il diacetile, l'acetoino e il 2,3-butandiolo. Nella produzione di birre di fermentazione alta, la fermentazione primaria avviene alla temperatura di 16-20°C e dura 2-3 giorni. La fermentazione secondaria può mancare del tutto o essere piuttosto breve (7-20 giorni). L'andamento della fermentazione è espresso dal grado di attenuazione che rappresenta la diminuzione di densità del mosto per la scomparsa dello zucchero e la produzione di alcol e anidride carbonica.

1.2.d.e. LA FILTRAZIONE ED IL CONFEZIONAMENTO

Prima di essere confezionata in bottiglie o in lattine, la birra è chiarificata per filtrazione o centrifugazione per eliminare tutti i residui. Per una maggiore stabilità microbica, le bottiglie o le lattine di birra sono pastorizzate a 70°C per 30-60 secondi. L'instabilità biologica della birra è legata al fatto che il mosto ottenuto secondo i procedimenti descritti sopra presenta valori di pH di 5,6-6,0, che sono poco selettivi nei confronti di microrganismi contaminanti e alterativi, quali batteri lattici, acetobatteri, sporigeni e anche lieviti. Per ovviare a questa instabilità è possibile acidificare il mosto con acidi (HCl, H₃PO₄) oppure, come è regolamentato in Italia, con l'impiego di batteri lattici del genere *Lactobacillus*. Di solito è utilizzato *Lb. delbrueckii subsp. delbrueckii*, che è specie omofermentante e termofila, quindi in grado di produrre apprezzabili quantità di acido lattico e di non crescere alle basse temperature utilizzate per la produzione della birra. Può essere aggiunto durante la fase di ammollatura dell'orzo oppure al mosto prima della luppolatura.

1.3. CELIACHIA

La Malattia Celiaca è un'intolleranza permanente del piccolo intestino al glutine, un complesso proteico contenuto nella cariosside del frumento. In fase di attiva malattia, il glutine causa lesioni a livello della mucosa dell'intestino tenue, con conseguente alterazione della funzione di assorbimento. L'espressione tipica di malattia celiaca è rappresentata, infatti, da atrofia dei villi intestinali associata ad iperplasia delle cripte del Lieberkühn, quadro che recede dopo eliminazione dell'agente causale dalla dieta¹. E' oggi noto che l'anomala sensibilità nei confronti del glutine è conferita da una predisposizione associata sia a geni di tipo HLA sia a geni non appartenenti a tale sistema. Nei soggetti geneticamente predisposti, il consumo alimentare di glutine innesca una risposta immunitaria sia di tipo umorale che cellulo-mediata, la quale porta al rimodellamento mucosale responsabile del quadro istologico tipico di malattia¹. I continui sviluppi nel campo della ricerca e la disponibilità di test diagnostici a sempre più alta sensibilità e specificità hanno permesso di definire la celiachia come la malattia infiammatoria cronica più frequente del genere umano², con un rapporto uomo/donna pari a 1:2³. Dal punto di vista storico, i primi studi epidemiologici sulla malattia celiaca sono stati eseguiti nell'Europa degli anni '50 sulla base dell'osservazione clinica dei sintomi tipici di malassorbimento (diarrea cronica e perdita di peso). In quegli anni, la prevalenza nei diversi paesi europei oscillava tra 1:4000 e 1:8000⁴. Poiché i bambini risultavano essere i soggetti maggiormente colpiti, la malattia celiaca venne inizialmente definita come una condizione di competenza prettamente pediatrica. Negli ultimi anni, con

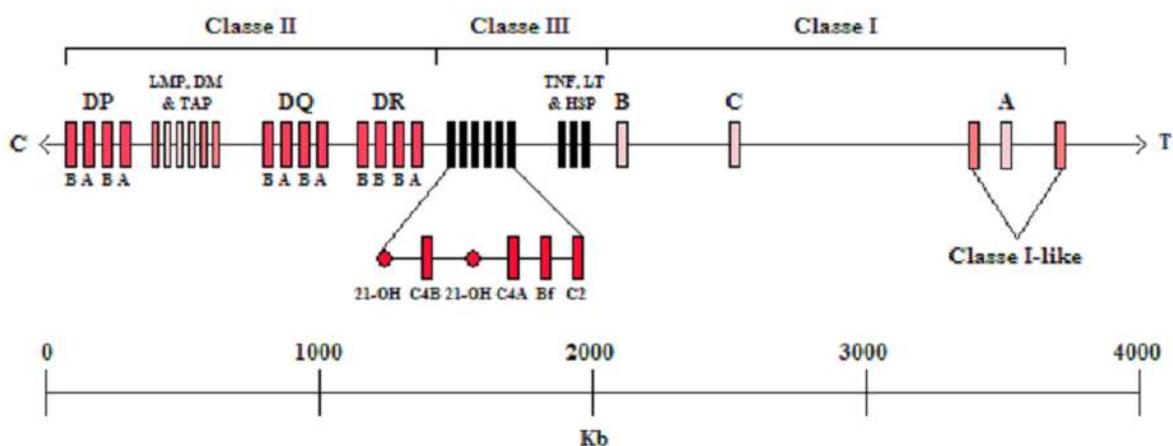
l'introduzione di nuovi marcatori sierologici altamente sensibili e specifici, quali gli anticorpi anti-gliadina (AGA), anti-endomisio (EMA) ed anti-transglutaminasi tessutale (anti-tTG), in associazione alla tipizzazione dei geni HLA, è stato possibile registrare un drastico aumento nelle diagnosi di malattia celiaca, soprattutto a carico dei soggetti adulti. Inoltre, grazie a questi strumenti, si è potuto dimostrare come la celiachia sia distribuita in modo piuttosto omogeneo, ferme restando le differenze nelle abitudini alimentari e nella frequenza della predisposizione genetica esistenti tra le diverse popolazioni del mondo². Accanto a questa forma classica intestinale, esistono forme atipiche, con sintomatologia prevalentemente extraintestinali, e la forma silente, caratterizzata da sintomi sfumati o del tutto assenti, in cui l'unico segno è, per esempio, l'anemia da carenza di ferro o la presenza di osteoporosi.

1.3.1. FATTORI GENETICI

Poiché la MC colpisce individui geneticamente predisposti ed è caratterizzata da processi immuno-mediati diretti contro il glutine, può essere definita come una patologia di tipo multifattoriale⁵, in cui l'intestino (sede della risposta immunitaria e, allo stesso tempo, organo bersaglio) agisce da interfaccia tra i fattori genetici e quelli ambientali. Inizialmente il coinvolgimento genetico nella MC è stato suggerito dall'alta prevalenza della stessa (10%) tra i fratelli dei pazienti celiaci e dalla quasi assoluta concordanza (70-100%) tra i gemelli monozigoti^{6,7}.

1.3.2. SISTEMA HLA

Il Complesso Maggiore di Istocompatibilità (Major Histocompatibility Complex, MHC) è un insieme di geni che codificano per diverse glicoproteine di membrana, le cui funzioni principali rientrano nel riconoscimento cellulare, nella discriminazione tra “self” e “non self” e, grazie alla capacità di presentare gli antigeni ai linfociti T, nello sviluppo delle risposte immunitarie in molte specie animali. Il Recettore dei Linfociti T (T Cell Receptor, TCR) è infatti in grado di riconoscere un antigene solo se associato a una molecola MHC. L’MHC umano (Human Leukocyte Antigen, HLA) è anch’esso un insieme di geni distribuiti in un ampio tratto di DNA (circa 4000 paia di 7 kilobasi), localizzato sul braccio corto del cromosoma 6. I geni dell’HLA sono organizzati in regioni che codificano per quattro diverse classi di molecole: I, I-like, II e III.



I geni di classe I codificano per glicoproteine espresse su quasi tutte le cellule nucleate e costituite da una catena α di 44 kD e da un'altra di 12 kD, detta β 2-microglobulina, codificata da una regione genica distinta situata sul cromosoma 15. La loro funzione è quella di presentare peptidi antigenici endogeni, della lunghezza di 8-10 aminoacidi, ai linfociti T Cluster Determinant (CD)8+ (linfociti T citotossici o CTL). I geni di classe I-like, così chiamati perché localizzati tra quelli di classe I, codificano per proteine isolate e caratterizzate solo di recente, anch'esse implicate nei processi immunologici. I geni di classe II codificano per glicoproteine espresse sulle Cellule Presentanti l'Antigene (APC) e costituite da una catena α di 32-34 kD e da una β di 29-32 kD. La loro funzione è quella di presentare peptidi antigenici esogeni, della lunghezza di 13-17 aminoacidi, ai linfociti T CD4+ (linfociti T helper o Th). Specifiche varianti alleliche di due di questi geni codificano per proteine in grado di presentare frammenti di glutine ai linfociti Th, influenzando la risposta immunitaria verso questi stessi antigeni e conferendo, così, parte della predisposizione genetica alla MC. La regione di classe II comprende, inoltre, alcuni geni che codificano per proteine accessorie (LMP, DM e TAP), le quali partecipano attivamente al processo di presentazione antigenica. In particolare, vi è una forte associazione della malattia celiaca con i geni del complesso HLA II codificanti gli eterodimeri DQ2 e DQ8. Tale malattia ha, infatti, una caratteristica componente immunogenetica, in quanto nel 90% dei celiaci è presente l'aplotipo DQ2, mentre i celiaci DQ2 negativi sono per la maggior parte positivi per il DQ8. Tuttavia esiste un 25-30% della popolazione che, pur possedendo questi "geni predisponenti", non svilupperà mai la malattia⁸.

1.3.3. PROTEINE TOSSICHE E/O IMMUNOGENICHE

In base alla loro funzione e localizzazione, le proteine dei semi (o chicchi) del frumento possono essere classificate in tre tipi:

1. proteine di membrana, localizzate in tutte le parti del chicco;
2. proteine di deposito, presenti esclusivamente nello strato impermeabile (endosperma);
3. proteine metaboliche, localizzate sia nell'aleurone che nell'embrione.

Le sequenze di interesse per la malattia celiaca sono comprese fra le proteine di deposito dell'endosperma che, in base alla loro solubilità, possono essere classificate in quattro tipi:

1. albumine, solubili in soluzioni acquose;
2. globuline, solubili in soluzioni saline;
3. gliadine, solubili in soluzioni alcoliche;
4. glutenine, solubili in soluzioni debolmente acide.

L'insieme delle gliadine e glutenine costituisce il glutine, che può essere definito come la massa coesiva che rimane dopo il lavaggio di un impasto farinoso in acqua.

Le qualità reologiche degli impasti farinosi dipendono proprio dall'abilità del glutine di intrappolare il diossido di carbonio. Di norma, al glutine non viene attribuito alcun

valore nutrizionale^{9,10}. Le frazioni alcool-solubili provenienti dai semi di più cereali vengono chiamate collettivamente prolamine, un termine che riflette la loro composizione amminoacidica, il più delle volte caratterizzata da un alto contenuto in prolina e glutamina, mentre amminoacidi essenziali come l'acido glutammico, l'acido aspartico, la lisina, la metionina e il triptofano sono inaspettatamente rari. Per questa ragione, da un punto di vista nutrizionale, una dieta priva di glutine non è svantaggiosa per i pazienti celiaci^{11,12}. A seconda del cereale di provenienza, le prolamine vengono designate come gliadine dal frumento, ordeine dall'orzo, secaline dalla segale, avenine dall'avena, orizine dal riso, zeine dal mais. Il contenuto di prolamine nelle farine ottenute a partire da diversi cereali dipende dalla specie, dalla varietà e dalle condizioni di crescita. In questo senso, la farina di frumento esibisce il maggior contenuto in prolamine (4-5 g/100 g di farina) fino a giungere al riso che, di norma, ne è quasi privo^{9,10}. Come riportato nella tabella successiva, le prolamine di alcuni di questi cereali sono ritenute responsabili delle lesioni che si generano nella mucosa intestinale dei pazienti celiaci^{10,13,14}.

Tabella - Cereali e relative prolammine in relazione alla malattia celiaca

<u>Cereale</u>	<u>Prolammine</u>	<u>Composizione</u>	<u>Tossicità</u>
Frumento	Gliadine	35% Q; 17-25% P	+++
Orzo	Ordeine	35% Q; 17-25% P	+
Segale	Segaline	35% Q; 17-25% P	+
Avena	Avenine	↑ Q; ↓ P	?
Riso	Orizine	↓ Q; ↑ A, L	-
Mais	Zeine	↓ Q; ↑ A, L	-

(Legenda: A = alanina; L = leucina; P = prolina; Q = glutamina.)

Le prolammine più studiate in relazione alla malattia celiaca sono le gliadine, un complesso proteico estremamente eterogeneo contenente più di cento elementi monomerici lunghi circa 250-300 residui amminoacidici che, sulla base della loro mobilità elettroforetica in ambiente acido, sono stati inizialmente ripartiti in quattro gruppi: α -, β -, γ - e ω -gliadine. Le conoscenze attuali indicano che vari peptidi del glutine sono coinvolti nella MC con diverse modalità, così che alcuni frammenti vengono definiti tossici ed altri immunogenici. Nello specifico, un frammento viene definito tossico se è in grado di indurre un danno mucosale in vitro (colture di biopsie duodenali) o in vivo (intestino prossimale e/o distale). Parimenti, un frammento viene definito immunogenico se è in grado di stimolare linee cellulari T HLA DQ2- o DQ8-ristrette e cloni cellulari T derivati dalla mucosa duodenale o dal sangue periferico dei pazienti celiaci. Innanzitutto, tramite l'uso delle colture di biopsie

duodenali, è stato possibile dimostrare che le gliadine hanno un grado di tossicità decrescente nei tipi $\alpha \rightarrow \gamma \rightarrow \omega$. La presenza di tratti simili (sequenze ripetute ricche in prolina e glutamina) nelle porzioni N-terminali delle prolammine di frumento, orzo e segale, ha poi suggerito che, virtualmente, una certa sequenza amminoacidica può costituire il determinante tossico. A seguito del sequenziamento di una frazione delle α -gliadine lunga 266 residui amminoacidici, alcuni peptidi gliadinici sono stati sintetizzati e testati allo scopo di valutare il loro grado di tossicità nella malattia celiaca¹⁵.

Tabella - Peptidi gliadinici tossici

Sequenza amminoacidica	Posizione	Tossicità
VPVPQLQPQNPSQQQPQEQ	α -gliadina: 3-21	-
PGQQQPFPPQQPY	α -gliadina: 31-43	+
PGQQQPFPPQQPYYPQPQPF	α -gliadina: 31-49	+
PGQQQPFPPQQPYYPQPQPFPSQQPY	α -gliadina: 31-55	+
PQPQPFPSQQPY	α -gliadina: 44-55	+
SQQPYLQLQPFPPQPQLPY	α -gliadina: 51-70	+
LQLQPFPPQPQLPYYPQPQLPY	α -gliadina: 56-75	+
QQYPLGQGSFRPSQQNPQA	α -gliadina: 202-220	-
LGQGSFRPSQQN	α -gliadina: 206-217	+

(Legenda: A=alanina; E=acido glutamico; F=fenilalanina; G=glicina; L=leucina; N=asparagina; P=prolina; Q=glutamina; R=arginina; S=serina; V=valina; Y=tirosina.)

Negli ultimi anni, grazie all'uso combinato della cromatografia liquida a fase inversa e la spettrometria di massa, un numero ragguardevole di peptidi gliadinici e

gluteninici sono stati purificati e testati per la loro immunogenicità. Tra i peptidi, alcuni sono stati definiti epitopi immunodominanti, altri peptidi ad attività immunogenica, altri ancora semplicemente inattivi. Altre caratteristiche di questi dati sono:

- gli epitopi immunodominanti elicitano una forte risposta T cellulo-specifica in quasi tutti i pazienti, mentre quelli ad attività immunogenica stimolano le cellule T solo in alcuni di loro;
- alcuni dei peptidi definiti inattivi, o semplicemente immunogenici nella loro forma nativa, diventano potenti stimolatori delle cellule T dopo deamidazione di specifici residui di glutammina, una reazione che comporta la perdita di un gruppo aminico (NH_3) e la trasformazione della glutammina bersaglio in acido glutammico; a seguito di riesposizione antigenica in vivo eseguita su pazienti celiaci “guariti”, nel loro sangue periferico è possibile rilevare alcune cellule T responsive verso gli epitopi immunodominanti, prima ancora che le stesse cellule T possano rispondere a questo insulto, suggerendo un fenomeno di memoria immunologica¹⁵.

Poiché un peptide definito tossico non necessariamente è in grado di attivare cellule T-specifiche e viceversa, i dati sopra riportati esprimono una certa discrepanza tra la tossicità e l'immunogenicità, anche se non escludono che una o più frazioni proteiche possano avere simultaneamente entrambe le competenze. Ulteriori studi sono auspicabili per dirimere questo e altri dubbi, nonché per completare la già nutrita mappa di peptidi del glutine coinvolti nella patogenesi della MC.

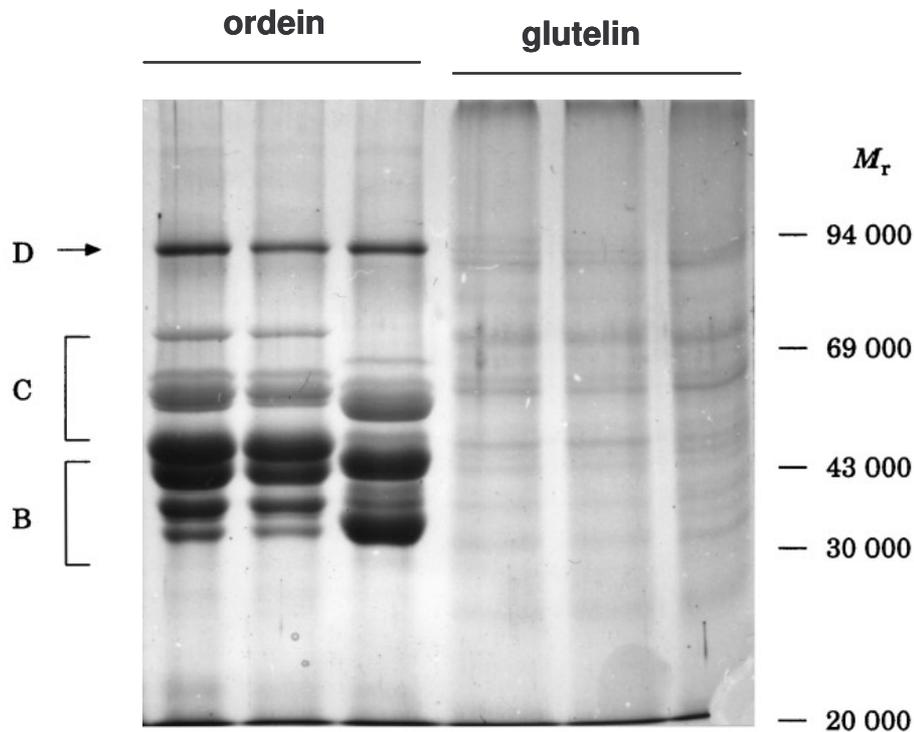
1.4. PROTEINE DELL'ORZO

La frazione proteica alcol-solubile dei chicchi d'orzo contiene le principali proteine di riserva: le ordeine che rappresentano, in relazione alle varietà e a parametri di variabilità climatica e stagionale, dal 30 al 50% del contenuto proteico totale dell'orzo¹⁶.

Le ordeine vengono generalmente classificate in sottogruppi comprendenti le B-ordeine, ricche in amminoacidi solforati, le C-ordeine, povere di amminoacidi solforati e due sottofrazioni, quantitativamente meno abbondanti, le γ -ordeine (ricche in zolfo) e le D-ordeine, ad alto peso molecolare. Le sottoclassi di ordeine si differenziano sia nella composizione amminoacidica sia in base alla loro mobilità elettroforetica¹⁷.

Le ordeine B e C costituiscono insieme circa il 70-80% e il 10-20% rispettivamente dell'intera frazione ordeinica; le γ e le D-ordeine sono rappresentate, complessivamente, per quantità inferiori al 5%¹⁶.

Ordeine



Le ordeine vengono sintetizzate in uno stadio tardivo del processo di maturazione del chicco e vengono depositate in appositi corpi proteici che si distorcono e si rompono durante il riempimento del chicco per formare una matrice proteica all'interno dell'endosperma. Le ordeine, in tale matrice proteica, vengono degradate durante la germinazione al fine di fornire un substrato per la sintesi delle proteine necessarie alla crescita embrionale. La mobilizzazione delle ordeine dipende dalla sintesi e dall'attività delle peptidasi e delle proteasi e dal passaggio di tali enzimi degradativi

attraverso l'endosperma. Si può ipotizzare, e alcuni studi preliminari lo dimostrano, che un processo degradativo analogo avviene a carico delle proteine di riserva dell'orzo nel corso del processo di maltazione¹⁶. Come detto in precedenza, il morbo celiaco è caratterizzato da intolleranza a specifici componenti proteici del frumento e, a livelli minori ma comunque significativi, dell'orzo e della segale, mentre il dibattito scientifico è ancora aperto riguardo alla possibile tossicità dell'avena. In realtà alcuni autori ritengono che la tossicità dell'orzo e della segale nei pazienti celiaci è da ridiscutere o è quanto meno atipica, in quanto i frammenti ottenuti da digestione peptica e triptica (PT) delle rispettive prolamine non sarebbero in grado di indurre la produzione di anticorpi anti-endomisio da parte del tessuto intestinale¹⁶. Tali anticorpi sono altamente specifici e diagnostici per la malattia celiaca e vengono prodotti quando il tessuto intestinale è trattato con PT di prolamine del frumento. La reattività degli anticorpi sviluppati nel siero di pazienti celiaci non mantenuti a dieta gluten-free è già stata estensivamente accertata in studi che risalgono alla seconda metà degli anni '80. In tali studi si ipotizza la presenza di epitopi antigenici, sia comuni che distinti rispetto a quelli accertati per le prolamine del frumento¹⁷. In uno studio del 2003 è valutata l'omologia di sequenze epitopiche del frumento con sequenze amminoacidiche delle prolamine di altri cereali, quali l'orzo, la segale, e l'avena. I peptidi omologhi sono stati poi sintetizzati e sono state caratterizzate in vitro le proprietà stimolatorie verso le cellule T. Solo una delle sequenze peptiche del frumento a nota attività stimolatoria per le cellule T è identica a sequenze contenute in altri cereali²². Tuttavia criteri di omologia meno stringenti hanno consentito di

identificare 11 sequenze omologhe nelle ordeine, segaline e avenine in regioni proteiche simili a quelle delle proteine del glutine di frumento; sette di tali 11 peptidi sono stati riconosciuti da linee cellulari T (o loro cloni) di pazienti affetti da morbo celiaco. Il confronto fra sequenze che stimolano le cellule T e sequenze ad alto grado di omologia, che non sono in grado di stimolare la proliferazione delle cellule T, ha anche consentito di avere indicazione sugli amminoacidi chiave coinvolti nell'induzione della risposta immunitaria dei pazienti celiaci¹⁸.

Le sequenze interessate condividono i seguenti motivi comuni Pro-Ser-Gln-Gln e Gln-Gln-Gln-Pro. In effetti, queste stesse sequenze amminoacidiche tossiche erano già state ipotizzate in uno studio del 1995, in cui era stata accertata la risposta degli anticorpi di pazienti affetti da enteropatia sensibile al glutine e dermatite erpetiforme contro le prolamine di frumento, orzo, segale avena¹⁹. Gli anticorpi monoclonali prodotti contro le prolamine del frumento, inoltre, riconoscevano le prolamine dell'orzo, della segale e dell'avena, ma non quelle del mais (immuno-cross-reattività). La marcata immuno-cross-reattività delle prolamine degli altri cereali verso gli anticorpi contro le gliadine è stata imputata proprio alle sequenze riportate sopra, che sono quelle altamente conservate e ripetute per le diverse prolamine. Anche altre sequenze epitopiche possono tuttavia essere presenti.

Ellis et al. nel 1994 hanno dimostrato la presenza nel malto d'orzo, che contiene un parziale idrolizzato di ordeine, di epitopi gliadin-like che inducono risposta autoimmune nei pazienti celiaci²⁰. In questo caso è stato impiegato un anticorpo monoclonale prodotto utilizzando il peptide B3144, residuo 3-56 dell'a-gliadina

proveniente da digestione triptica. Gli stessi autori nel 1990 riportavano valori di 1.5 mg di ordeine per pinta di birra (0.568 litri) con una quantificazione effettuata mediante test ELISA, condotti impiegando anticorpi policlonali²¹. Ammesso che tale quantificazione possa essere considerata affidabile, i valori di tolleranza resi noti nel Codex Alimentarius perché un alimento possa essere considerato gluten-free, sono difficilmente applicabili al caso di una bevanda quale la birra²². La grande diversità delle birre commercializzate in tutti i paesi, europei e non, le notevoli differenze nelle tecnologie di produzione (in particolare la maltazione), le diverse cultivar di orzo utilizzate per la produzione della bevanda, complicano notevolmente la possibilità di un monitoraggio comprensivo e rappresentativo di tutte le specie di birra prodotte in relazione alla questione della celiachia. In un recente studio si è esaminata la composizione ed il contenuto amminoacidico prima e dopo la bollitura del mosto di due varietà di orzo: *Baudin* e *Guangmai*.

In seguito alla bollitura del mosto, si è evidenziato che il contenuto amminoacidico dell'orzo *Baudin* decresce, mentre quello *Guangmai* cambia debolmente; si è constatato poi che l'acido glutammico e la prolina sono gli amminoacidi più rappresentati in entrambe le cultivar. Tutto questo suggerisce la possibilità che le ordeine siano presenti nel mosto. Inoltre, le due varietà avevano livelli simili di tutti gli amminoacidi essenziali tranne la leucina e l'istamina. In aggiunta, si è notata una piccola differenza tra le due varietà di mosto relativamente al contenuto proteico e amminoacidico.

1.5. CONTENUTO PROTEICO DELLA BIRRA

La birra contiene circa 500 mg/L di materiale proteico, includendo anche una varietà di polipeptidi con massa molecolare compresa tra 5 e 100 kDa. Questi polipeptidi, che, come detto in precedenza, derivano principalmente dalle proteine dell'orzo e in misura pressoché trascurabile dai lieviti²³, sono il prodotto delle modificazioni proteolitiche e chimiche che avvengono durante il processo di birrificazione.

La frazione proteica ad alto peso molecolare della birra è rappresentata da due proteine presenti in quantità relativamente elevate, appartenenti alla frazione idrosolubile dell'endosperma dell'orzo, già ampiamente descritte, la Z4-barley protein e la non-specific Lipid Transfer Protein (ns-LTP) presente in due isoforme. La Z4 appartiene alla famiglia delle serpine e si ritiene sia un inibitore di serina proteasi²⁴; la ns-LTP è una piccola proteina ricca di cisteine impegnate in legami disolfuro intramolecolari. Le particolari caratteristiche strutturali conferiscono a queste proteine resistenza all'idrolisi enzimatica e stabilità termica e questo potrebbe essere all'origine della loro sopravvivenza nella birra^{25,26,27}. La presenza di queste due proteine nella birra è già stata ampiamente descritta e si ritiene che esse possano indurre fenomeni allergici IgE mediati, non correlati alla celiachia, in soggetti predisposti²⁸. La frazione polipeptidica, invece, sicuramente più abbondante nella birra, è rappresentata da una complessa ed eterogenea serie di peptidi con masse molecolari inferiori a 6-7 kDa.

Parte dei frammenti peptidici potrebbero derivare dall'idrolisi delle ordeine (proteine di riserva dell'orzo) con caratteristiche simili a quelle delle gliadine del frumento e

conservare gli epitopi gliadin-like coinvolti nell'induzione della malattia celiaca. Possiamo supporre infatti, sulla base della loro nota solubilità, che frazioni prolamminiche, ordeine non frammentate, possono permanere nella birra solo in quantità trascurabili. La presenza nella birra di ordeine non idrolizzate è ancora da definire e solo di recente tracce di g3-ordeina sono state descritte utilizzando l'approccio proteomico classico basato su elettroforesi 2D e conseguente identificazione con MALDI-TOF e peptide mass mapping²⁶.

L'importanza del materiale proteico nel determinare le caratteristiche di qualità del prodotto finito è stata riconosciuta da lungo tempo. In particolare si ritiene che i polipeptidi siano coinvolti sia nei meccanismi di intorbidimento sia nella stabilità della schiuma. Di particolare interesse è la simultanea presenza sia di gruppi idrofili che idrofobi nella stessa struttura molecolare, il che permette alle molecole di attraversare lo strato liquido tra le bolle e di interagire con il gas e con i gruppi idrofobi di altre molecole tra lo strato di bolle²⁹. In uno studio molto recente³⁰ è stata messa in evidenza la relazione tra lo stadio di modificazione del malto (indice di Kolbach), fattore determinante per controllare la stabilità della schiuma, e la stabilità della schiuma stessa. In questo lavoro sono state analizzate tre frazioni di birra, derivanti da tre cultivar diverse di orzo, a diversi livelli di modificazione, mediante elettroforesi bidimensionale. Alcuni ritengono che una delle più importanti caratteristiche delle proteine che promuovono la formazione di schiuma sia la loro idrofobicità. E' ben noto che le proteine LTP-1 e la Z4 sopravvivono nella birra per la loro resistenza ai trattamenti termici e per essere inibitrici di proteasi. Quindi

Yoshihiro et al. hanno suggerito che le proteine stabilizzanti della schiuma siano delle proteine con caratteristiche molto simili alle proteine sopraccitate. Mediante spettrometria di massa MALDI TOF MS è stata identificata la proteina barley dimeric-amylase inhibitor (BDAI-I). Siccome dagli spot analizzati sono emerse stesse masse molecolari con differenti punti isoelettrici, si può ritenere che la BDAI-I subisca alcune modificazioni post-traslazionali, come la glicosilazione e la fosforazione e che possa essere associata ad una proteina idrofobica. Inoltre non si esclude il contributo delle proteine LTP-1 e Z4 alla stabilità della schiuma.

Un'altra caratteristica che determina la qualità della birra è l'intorbidimento. Le cause dell'intorbidimento sono state attribuite all'interazione di proteine e alcuni polifenoli³¹. Un modo per ridurre questi effetti è rappresentato dall'utilizzo del gel di silice per allontanare questi polipeptidi³². E' importante sottolineare che questa rimozione è selettiva e quindi non vengono rimossi i polipeptidi che contribuiscono favorevolmente alla formazione della schiuma. In un lavoro di Leiprer³² et al del 2003, è stato dimostrato che la maggior parte dei polipeptidi nella birra sono glicosilati e che il gel di silice assorbe prevalentemente glicoproteine, particolarmente quelle proteine ricche di prolina. Il gel di silice ha una struttura estremamente porosa con un largo sviluppo superficiale. Questa faccia è coperta di gruppi silanolicci (SiOH) che si legano alle proline presenti nei polipeptidi. Per molti anni è stato ritenuto che gli amminoacidi prolina e acido glutammico erano costituenti importanti dell'intorbidimento. Il gel di silice è in genere utilizzato nei processi tecnologici di produzione della birra per rimuovere le proteine idrofobiche ad alto contenuto di

glutammina e prolina (>30%), coinvolte nella formazione di torbidità³³. Alcuni studi precedenti hanno attribuito alle ordeine un ruolo determinante nella stabilizzazione della schiuma e nel causare l'indesiderato intorbidimento³⁴. In uno studio svolto mediante SDS-PAGE seguito da spettrometria di massa e mirato all' identificazione di proteine nella schiuma di birra, si scoprirono solo deboli quantità di proteine associate alle ordeine, mentre il maggior numero di polipeptidi era formato da albumine di orzo. Allo stesso modo, in una recente analisi proteomica dei polipeptidi che promuovono la stabilità della schiuma da birre ottenute da cultivar di orzo Giapponese e del Nord America di Okada et al³⁰, non sono state identificate ordeine o loro frammenti proteolitici. Anche se è risaputo che la stabilizzazione della schiuma generalmente decresce man mano che la modificazione del malto aumenta e progredisce l'idrolisi proteolitica, un importante ruolo nella stabilizzazione della schiuma dovrebbe essere giocato anche da peptidi di piccola taglia molecolare e ricchi dell'amminoacido prolina.

2. **OBIETTIVI DELLA RICERCA**

Per tutte queste ragioni, la birra viene esclusa dalla dieta del paziente celiaco sulla base di un concetto “*a priori*”. Nel presente lavoro è descritta l’applicazione di tecniche di analisi proteomica finalizzata alla caratterizzazione della frazione proteica e peptidica di due birre italiane commercializzate dallo stesso produttore (singolo e doppio malto rispettivamente). Obiettivo dello studio è, come dicevamo, la determinazione qualitativa e quantitativa di sequenze peptidiche nella birra potenzialmente immunogeniche. In particolare, le proteine sono state identificate mediante MALDI-TOF “mass mapping” dopo separazione in elettroforesi mono- e bi-dimensionale, mentre la caratterizzazione strutturale della componente peptidica a basse masse è stata realizzata con la spettrometria di massa tandem electrospray accoppiata alla separazione cromatografica HPLC (LC-ESI MS/MS). Mediante la combinazione di dati elettroforetici, cromatografici spettrometrici ed immunoenzimatici di tipo Western-blotting ed ELISA competitivo, effettuati mediante l’utilizzo di anticorpi monoclonali R5^{35,36}, è stato possibile acquisire nuove informazioni relativamente alla presenza nella birra di sequenze gliadin-like potenzialmente coinvolte nell’induzione della malattia celiaca.

Una tale caratterizzazione non offre certamente soluzioni definitive alla questione del consumo della birra da parte dei pazienti celiaci, ed il riscontro effettivo sarebbe solo di natura clinica. Questo è dovuto ad una serie di fattori che vanno presi in considerazione:

- il contenuto proteico della birra è estremamente eterogeneo, come emergerà dalla presente ricerca, nonché enormemente variabile in base alle materie prime utilizzate (cultivar di orzo, presenza di altri cereali) ed alla tecnologia di produzione;
- dal punto di vista immunochimico, il comportamento *in vitro* potrebbe essere anche molto diverso da quello *in vivo*;
- la persistenza di frammenti immunoreattivi nella birra non implica una loro resistenza, totale o parziale, ai fenomeni di digestione gastrointestinale e quindi non equivale alla certezza che i potenziali epitopi persistano anche in sede di assorbimento intestinale (a livello degli enterociti intestinali con assorbimento passivo o attivo fino alla lamina propria);
- la risposta agli epitopi è fortemente dipendente dalle caratteristiche genetiche e fenotipiche di ogni paziente.

La caratterizzazione del materiale peptidico/proteico della birra potrebbe tuttavia contribuire a progettare strategie tecnologiche o microbiologiche per l'eliminazione o la riduzione delle componenti potenzialmente immunogeniche.

3. MATERIALI E METODI

Acrilammide, N,N'-bis-acrilammide, HKNaPO_4 , acido iodoacetico (ICH_2COOH), Ditiotreitolo (DTT), cloruro di sodio, SDS, CHAPS, AMBIC, α -ciano-4-idrossicinammico (matrice per peptidi) sono prodotti dalla Sigma (St.Luis, MO, USA). Acido acetico, Acetonitrile (ACN), 2-propanolo provenivano dalla J.T. BAKER. Il Coomassie Brilliant Blue R-250, il TEMED, l'APS, l'urea sono stati acquistati dalla Bio-Rad (Milano). Acido formico, etanolo, sono prodotti dalla Carlo Erba (Milano). Reagenti e solventi erano del grado di purezza più alto disponibile in commercio e sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione.

Gli enzimi utilizzati (tripsina) sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich (USA).

Sono state analizzate due birre italiane (singolo e doppio malto), prodotte da solo malto d'orzo, commercializzate dallo stesso produttore.

3.1. ESTRAZIONE DELLA FRAZIONE PROTEICA DALLA BIRRA

Le frazioni proteiche dai campioni di birra sono state isolate per estrazione in fase solida utilizzando colonne pre-impaccate con resina a fase inversa Sep-pak® (Waters, Milford, Massachusetts, USA). I campioni di birra sono stati degassati per sonicazione e agitazione in beuta sottovuoto; 3 ml sono stati poi caricati nelle cartucce Sep-pak preventivamente equilibrate in 0.1% (v/v) acido trifluoroacetico (TFA). Gli estratti su fase solida sono stati lavati con 10 ml di 0.1% TFA e successivamente eluiti in 3 ml di 70% acetonitrile (ACN) contenente 0.1% TFA.

Infine, la soluzione di eluizione è stata concentrata in centrifuga Speed-Vac e liofilizzata.

Nel caso della precipitazione della componente proteica in acido tricloroacetico (TCA), 40 ml di birra sono stati aggiunti a 10 ml di soluzione di 100% TCA (w/v) per raggiungere una concentrazione finale delle birre del 20% TCA. Le sospensioni sono state tenute a 4°C per 1 h e poi centrifugate a 4500 rpm, 4°C per 20 min., scartando il surnatante. I precipitati sono stati lavati 3 volte con acetone freddo (-20 °C) e infine liofilizzati.

Le proteine idrofobiche minoritarie, soprattutto quelle coinvolte nella stabilizzazione della schiuma, sono state arricchite per adsorbimento su gel di silice. Brevemente, 1 g di silica gel (Merk, Darmstadt, Germany) è stato sospeso in blanda agitazione per 4 ore a temperatura ambiente nella schiuma generata da 50 ml di birra. Il gel di silice è stato poi recuperato mediante centrifugazione (4500 x g for 10 min) e il surnatante è stato scartato. Dopo ripetuti lavaggi con buffer 100 mM Na₂HPO₄ a pH 7.2 le proteine sono state poi eluite dalla resina con 3 ml di NH₄OH al 2% e liofilizzate.

3.2. ANALISI ELETTROFORETICA ED IMMUNOBLOTTING

L'elettroforesi monodimensionale (1D) SDS-PAGE degli estratti polipeptidici della birra è stata condotta su gel di poliacrilammide al 15% su lastre verticali, secondo le istruzioni del fornitore, usando il sistema Mini-Protean fornito dalla Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Gli estratti liofilizzati sono stati sciolti in sample buffer e ~ 20 µg sono stati caricati sul gel. La concentrazione proteica è stata stimata con saggio

colorimetrico di Bradford, utilizzando il blu di Comassie come dye e misurando l'assorbanza delle soluzioni proteiche a 595 nm, dopo aver costruito opportuna curva di calibrazione con soluzioni a titolo noto di BSA. Proteine standard prediluite (Broad Range, Biorad) sono state impiegate come marcatori di massa molecolare.

L'elettroforesi bidimensionale (2D) IPG/SDS-PAGE è stata eseguita su estratti proteici congelati (300 µg), disciolti in 250 µl of 8 M urea, 2% w/v CHAPS, 2% v/v IPG buffer pH 3–10 (Amersham Biosciences/GE Healthcare, Uppsala, Sweden), blue di bromophenolo (tracce), 20 mM DTT, e centrifugati 15 min a 10.000. L'isoelettrofocalizzazione (IEF) in prima dimensione è stata effettuata su strips di Immobilized pH Gradient (IPG) 18 cm, pI 3-10 (Amersham Biosciences) usando il sistema Pharmacia Biotech IPGphor electrophoresis (Amersham Biosciences). Prima della separazione in seconda dimensione (SDS-PAGE), le strip IPG sono state equilibrate 10 min con un tampone di equilibratura (50 mM Tris/HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, bromophenol blue in traces) contenente 10 mg/mL DTT e poi 10 min con 25 mg/mL iodoacetamide. La seconda dimensione è stata realizzata su gel di poliacrilammide 15% con il sistema Ettan Dalt-six vertical (Amersham Biosciences). Per garantire la riproducibilità, i campioni sono stati caricati in triplicato. Infine le bande proteiche di entrambe le analisi, 1D e 2D, sono state colorate con il blu silver³⁷, procedura di colorazione compatibile con la spettrometria di massa, molto più sensibile rispetto alla classica colorazione con il blue di Comassie G-250.

Per verificare l'immunoreattività delle proteine della birra è stata condotta analisi

western blotting degli estratti proteici da birra ottenuti mediante SPE. Le proteine sono state separate in SDS-PAGE monodimensionale nelle stesse condizioni utilizzate per la separazione elettroforetica monodimensionale e trasferiti su membrana di nitrocellulosa (0.45 μ m) mediante applicazione di un campo elettrico costante di 25 V overnight a 4°C, in tampone di trasferimento (192 mM glicina , 25mM Tris-base , 20% acqua [v/v] metanolo, pH 8.3). Dopo il trasferimento la membrana è stata incubata per 2 h a temperatura ambiente in blocking solution (5% non-fat dry milk [Bio-Rad] in PBST, 80 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 0.3% Tween-20, pH 7.5) sotto una leggera agitazione.

Sono stati utilizzati diversi anticorpi:

1. un anticorpo policlonale commerciale (Sigma) sviluppato nel coniglio immunizzato con l'intero estratto etanologico di frumento (diluizione 1/1000). In questo caso è stato usato come anticorpo secondario un anti-IgG sviluppato nell'asino e coniugato alla perossidasi (diluizione 1/8000), acquistato dalla Amersham;
2. un antisiero sviluppato presso l'Istituto di Scienze dell'Alimentazione del CNR (Avellino) nel guinea pig immunizzato con il peptide sintetico 1-19 dell' α -gliadina coniugato alla BSA;
3. l'anticorpo monoclonale R5-Ridascreen (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany).

In tutti i casi, l'immunorilevazione ECL (Enhanced Chemiluminescence revelation) è stata effettuata utilizzando un kit della Biorad costituito da due soluzioni formate

da luminolo/enhancer e buffer contenente il substrato della perossidasi (H_2O_2). Una lastra fotografica (Kodak) è stata esposta in camera oscura alla membrana di nitrocellulosa attivata a diversi tempi di esposizione e, infine, sviluppata.

Le frazioni proteiche da farina di frumento e d'orzo solubili in 70% etanolo (utilizzate come controllo) sono state estratte secondo la procedura di Wieser³⁸.

3.3. DIGESTIONE IN GEL DELLE BANDE PROTEICHE

Le bande proteiche sono state tagliate manualmente e decolorate con ripetuti lavaggi con ACN 50% (v/v) in 25mM NH_4HCO_3 , seguiti da disidratazione con 100 μ L di 100% ACN. Le proteine sono state poi ridotte mediante incubazione con 10 mM di DTT (56°C per 1 h) e alchilate con iodoacetammide 55mM (45 min. a temperatura ambiente). Gli spot sono stati poi lavati con 25 mM NH_4HCO_3 e poi con ACN. Le bande proteiche sono state disidratate in ACN e poste in una centrifuga Speed-Vac in modo da allontanare l'ACN residuo. I pezzi di gel (completamente anidri) sono stati reidratati in bagno a ghiaccio con ~ 10-20 μ L di una soluzione 12,5 ng/ μ l di tripsina (Proteomic grade) sciolta in 25 mM NH_4HCO_3 , pH =8.5, un enzima proteolitico specifico che idrolizza polipeptidi a livello dei residui C-terminali della lisina (Lys) e dell'arginina (Arg). La quantità aggiunta ad ogni campione è stata tale da coprire interamente la banda proteica. Dopo circa 45 minuti è stata verificata la completa reidratazione delle bande proteiche e l'eccesso di soluzione enzimatica è stato rimosso; infine gli spot sono stati ricoperti completamente con 25 mM NH_4HCO_3 ed incubati a 37°C, per 16 ore (overnight). I peptidi sono stati estratti mediante

l'aggiunta di 40 μ L di 50% ACN/ 5% acido formico (v/v). I surnatanti provenienti da tre estrazioni consecutive sono stati riuniti, concentrati in centrifuga Speed-Vac e liofilizzati. Prima dell'analisi in spettrometria di massa le miscele peptidiche sono state ri-dissolte in 0.1% TFA e desalificate con micro colonne a fase inversa C₁₈ Zip-Tip (Millipore, Badford, USA) preventivamente equilibrate con 0.1% TFA, lavate con 0.1% TFA ed eluite con 50% ACN/0.1% TFA.

3.4 CROMATOGRAFIA AD ESCLUSIONE MOLECOLARE (SEC)

La SEC è stata effettuata su un cromatografo modulare ad elevate pressioni , modello 152 A (Gilson Inc., Middleton, WI, USA), dotato di una colonna Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Biosciences), ottimale per separazione di polipeptidi nel range di MW 1-70 kDa. I polipeptidi estratti da 3 ml di campione di birra, sono stati ridissolti in 1 ml di tampone di eluizione e 100 μ l sono stati iniettati per ciascuna analisi.

I polipeptidi sono stati eluiti isocraticamente con lo stesso tampone, ad un flusso costante di 0.5 ml/min, monitorando l'effluente con detector UV a 280 nm. Le frazioni cromatografiche sono state raccolte manualmente e congelate a -20°.

Per l'analisi elettroforetica SDS-PAGE le frazioni cromatografiche sono state preventivamente desalificate con cartucce C₁₈Sep-pak. La separazione elettroforetica 1D è stata effettuata nelle stesse condizioni descritte ed è stato colorato sia al blu silver che al nitrato d'argento.

3.5. ANALISI CROMATOGRAFICA DEGLI ESTRATTI PEPTIDICI DA BIRRA

Gli estratti proteici dalla birra, ottenuti dall'estrazione a fase inversa e successivamente liofilizzati, sono stati sciolti in soluzione 0.1 % TFA e frazionati utilizzando un sistema HPLC modulare HP 1100 (Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA). Per la separazione delle componenti proteiche è stata impiegata una colonna a fase inversa C18 5µm; 250 mm x 4.6 mm (Vydac, Hesperia, CA, USA). I solventi A e B erano 0.1 % TFA rispettivamente in H₂O e in ACN (HPLC grade, Carlo Erba, Milano, I). L'eluente B è stato tenuto per 5 minuti al 5% mentre l'eluizione è avvenuta con un gradiente lineare dal 5 % al 60 % di B in 60 minuti, ad un flusso costante 1ml/min. La rilevazione UV è stata fatta a 220 e 280 nm. Le frazioni cromatografiche sono state raccolte manualmente, concentrate e liofilizzate ed utilizzate in parte per analisi in spettrometria di massa MALDI-TOF e in parte per effettuare saggi ELISA specifici al fine di valutarne l'immunoreattività.

3.6. ANALISI IN SPETTROMETRIA DI MASSA MALDI-TOF DELLE MISCELE PEPTIDICHE

Prima dell'analisi di spettrometria di massa, la miscela polipeptidica liofilizzata e rigenerata in etanolo 70% (200µl), ha subito una ulteriore purificazione dagli zuccheri residui, che avrebbero potuto interferire con l'analisi spettrometrica, utilizzando colonnine pre-impaccate a fase inversa C-18 Zip-Tip (Millipore) come descritto in precedenza. La spettrometria di massa è stata condotta utilizzando uno spettrometro di massa modello PesSeptive Biosistem (Framingham, MA, USA)

Voyager DE-Pro equipaggiato con sorgente MALDI che impiega un laser a N₂ (337 nm, 3 n-sec pulse width). Il potenziale di accelerazione degli ioni era 20 kV. La soluzione dell'analita (0.5 µl) è stata depositata su un'apposita piastrina in acciaio inossidabile (target) miscelandola a 0.5 µl di matrice. Sono state impiegate come matrici l'acido α-ciano, 4-idrossi-cinnamico (α-ciano) e l'acido 3,5 dimetossi-4-idrocinnamico (acido sinapinico), per analizzare peptidi e proteine, rispettivamente. Le matrici sono state preparate disciogliendo 10 mg di polvere cristallina in 1 ml di 0.1% TFA acquoso/0.1% TFA in acetonitrile (1/1; v/v). Gli analiti sono stati fatti co-cristallizzare con la matrice lasciando evaporare il solvente all'aria. Gli spettri di massa delle miscele triptiche degli spot proteici sono stati acquisiti in modalità di ioni positivi, usando l'α-ciano come matrice. L'identificazione delle proteine tramite "peptide mass fingerprinting" è stata eseguita con l'aiuto del motore di ricerca Mascot (Matrix Science, London, UK) interrogando database proteici e genomici traslati (Swiss-Prot, TREMBLE and NCBI) disponibili on-line. Le ricerche sono state estese a tutte le specie considerando la possibilità di errore nella misurazione della massa molecolare di 0.3 Da. Le identificazioni sono state assegnate manualmente analizzando in maniera critica i valori degli score forniti dal software di ricerca.

3.7. LIQUID CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-ESI MS/MS)

La caratterizzazione dei peptidi con nanoLC-ESI MSMS è stata condotta impiegando un nano-flow HPLC LC-Packings (Dionex) accoppiato con uno spettrometro ESI-Q-TOF Ultima (Waters /Micromass, Manchester, UK). La separazione dei peptidi nano-flow RP-HPLC è stata realizzata con un flusso calibrato di 0.2 μ l/min, per mezzo di una nano-colonna Atlantis (Waters) (15 cm x 75 μ m i.d., 3 μ m), usando un gradiente lineare da 0 a 50 % B in 60 min. La fase mobile A consisteva di acido formico 0.1% in acqua Milli-Q (v/v) e la fase mobile B consiste di acido formico 0.1% in ACN (v/v). L'energia di collisione per la frammentazione dei peptidi era regolata dallo strumento in base al rapporto massa/carica dello ione. Gli spettri di frammentazione sono stati realizzati in data dependent acquisition (DDS): lo spettro MS veniva registrato per 1s, e i 3 ioni più abbondanti presenti nello spettro venivano automaticamente selezionati e frammentati in collision induced decay (CID) (4 s/MS/MS spectrum). Gli spettri di massa tandem sono stati poi convertiti in peak-list text files (formato .pk1) usando MassLynx 4.0 software (Waters). I file pk1 sono stati utilizzati per cercare nei database NCBI e Swiss-Prot utilizzando il tool MS/MS ion search di Mascot (Matrixscience, UK). Lo score di identificazione è stato valutato con il sistema MOWSE di cui è provvisto Mascot e valori di score superiori a 38 ($p < 0.05$) venivano considerati come match significativi, corrispondenti all'identità dei peptidi o ad estesa omologia.

3.8. SAGGI ELISA CON METODO “COMPETITIVO”

Le determinazioni ELISA di tipo competitivo sugli estratti proteici SPE da birra singolo (P) e birra doppio malto (DM) e sulle frazioni cromatografiche sono state realizzate con kit basati sull'anticorpo R5-Ridascreen[®] (R-Biopharm), sviluppato come descritto da Hernando et al³⁶. Il kit contiene un'apposita piastra in materiale plastico da 96 posizioni. Ad alcune posizioni è legata covalentemente una quantità fissa di gliadina standard quale antigene, mentre in altre è possibile coniugare le miscele peptidiche che si intende testare. I saggi sono stati eseguiti in accordo con le procedure standard suggerite dal produttore del kit. Le soluzioni dei campioni sono state ottenute prima ridisciogliendo l'estratto in etanolo 70% e poi diluiti 100 o 500 volte in relazione al loro contenuto proteico. Il contenuto di specie immunoreattive, misurate come “contenuto in gliadina” è stato rilevato in duplice copia.

Il primo kit sviluppato da Ridascreen cronologicamente impiegava l'anticorpo monoclonale R5 con misurazione ELISA a sandwich. L'ELISA sandwich, data la natura della tecnica, pur essendo altamente specifico, tende a sottostimare il contenuto antigenico in quanto richiede due sequenze epitopiche su uno stesso polipeptide. Per tale motivo è stato sviluppato un secondo kit R5-Ridasceen, che fa uso dell'ELISA competitivo, che fornisce misurazioni del contenuto in sequenze gluten-like molto più attendibili.

Le frazioni proteiche da farina di frumento e d'orzo solubili in 70% etanolo (utilizzate come controllo) sono state estratte secondo la procedura di Wieser³⁸.

3.9. ANALISI ELETTROFORETICA DI 5 CAMPIONI DI BIRRA

E' stato inoltre intrapreso uno studio sulla frazione proteica di 5 birre prodotte a partire da cereali diversi dall'orzo come materia prima. In particolare sono state confrontate: birra Peroni doppio malto, Peroni (prodotta con il 20% di mais), Carlsberg, Weisse (birra di frumento), Riedenburger (birra gluten-free, prodotta con miglio e altri cereali). La frazione proteica è stata isolata per estrazione in fase inversa (SPE) o precipitazione in TCA 20% come descritto in precedenza.

Le analisi preliminari della frazione proteica sono state effettuate mediante 1D SDS-PAGE con colorazione al blu silver, nelle condizioni operative già descritte.

4. RISULTATI

4.1. CARATTERIZZAZIONE DELLA FRAZIONE PROTEICA DELLA BIRRA

La componente proteica della birra è notevolmente complessa e richiede tecniche di analisi altamente risolutive per una completa caratterizzazione. Inoltre il materiale peptidico della birra è altamente eterogeneo, essendo costituito da proteine, peptidi idrolitici e prodotti di modificazione dovuti ai trattamenti tecnologici di produzione. La nostra analisi si è concentrata in maniera particolare su due campioni di birra di fabbricazione italiana prodotte dalla stessa azienda che sono rispettivamente una birra a singolo malto (definita in seguito campione “P”) ed a doppio malto (DM), prodotte utilizzando esclusivamente orzo quale cereale.

Ulteriore fattore che complica notevolmente l’analisi della componente proteica è la presenza, in grosse quantità, di sostanze interferenti quali mono- e oligo-saccaridi, metaboliti e sali. La frazione proteica dei due campioni di birra, è stata prima isolata mediante estrazione in fase solida e, alternativamente, per precipitazione in TCA 20% ed analizzata preventivamente con elettroforesi 1D SDS-PAGE (*figura 1*). Dalla separazione elettroforetica si evince chiaramente la presenza di due intense bande proteiche rispettivamente a circa 45kDa e 10kDa, come stimato in base alla contemporanea separazione degli standard di masse molecolari. Una banda di MW stimata ~7-8 kDa è anche visibile, anche se parzialmente sovrapposta alla banda di ~10 kDa. Inoltre, sembrano completamente assenti bande proteiche nell’intervallo delle masse molecolari compreso tra 30 e 40kDa, che corrispondono alle dimensioni

delle più abbondanti proteine di riserva dell'orzo (ordeine), con caratteristiche simili alle prolamine del frumento. E' importante sottolineare che le bande proteiche rilevate sono comuni ai due campioni di birra analizzati, anche se il contenuto proteico della DM, stimato per gravimetria, era più elevato (circa il doppio) della P. Le bande maggiormente rappresentate sono state poi analizzate mediante MALDI-TOF "peptide mass mapping", dopo digestione in situ con tripsina. Le proteine più abbondanti sono state identificate come la Z4 barley protein e della ns-LTP, quest'ultima presente in due isoforme: ns-LTP1 (con massa molecolare 10kDa) e ns-LTP2 (con massa molecolare 7.5kDa). In figura 2 e 3 sono riportati gli spettri di massa del digerito triptico della Z₄ e della ns-LTP₁, rispettivamente. Le masse peptidiche sono state usate per la ricerca nei database proteici e genomici, utilizzando i programmi MASCOT e Protein prospector. Le identificazioni hanno permesso di assegnare i segnali di massa ai peptidi delle proteine, così come riportato in figura.

La presenza nella birra di queste proteine è stata già ampiamente descritta e si ritiene che esse possano indurre manifestazioni allergiche IgE mediate, non correlate alla celiachia, in soggetti predisposti²⁸. Alcuni autori ritengono che queste proteine siano coinvolte in fenomeni indesiderati che possono compromettere le caratteristiche di qualità, come l'intorbidimento e la stabilità della schiuma^{26,39}. Con lo scopo di rilevare la presenza di proteine minori, sugli estratti di birra, è stata condotta un'analisi elettroforetica bidimensionale IPG/SDS 2DE, che prevede IPG/IEF in prima dimensione e SDS-PAGE in seconda dimensione. I profili elettroforetici dei due campioni di birra analizzati (singolo e doppio malto) sono molto simili, e come

esempio, in *figura 4* è mostrato il profilo elettroforetico proteico 2D della birra P. Anche in questo caso gli spot proteici sono stati identificati mediante MALDI-TOF *peptide mass mapping*. Le identificazioni proteiche sono riportate in *tabella 1*. Questa analisi ha confermato l'abbondante presenza delle proteine Z4-barley protein e ns-LTP. Le proteine possono legare saccaridi in maniera non enzimatica (reazione di Maillard) per effetto dei trattamenti termici e questo si riflette, ad esempio per la Z4-barley protein, nella dispersione degli spot proteici lungo un range ampio di pI. I fenomeni di glicazione interessano legami fra la proteina e glucosio o maltosio che sono il mono- e di-saccaride, rispettivamente, più abbondanti nella birra. Nonostante questi zuccheri siano neutri, le specie glicate subiscono variazioni in pI dal momento che la reazione di Maillard interessa le lisine e quindi riduce progressivamente il carattere basico della proteina. E' importante sottolineare che gli spot proteici corrispondenti alla Z4 e localizzati a pI progressivamente più acidi producono un numero minore di peptidi, come verificato in MALDI-TOF MS. Questo dato probabilmente riflette proprio il fatto che il coupling delle lisine con i saccaridi maschera quest'ultime, prevenendo il riconoscimento dei naturali siti di taglio da parte della tripsina. Non sono stati tuttavia identificati segnali peptidici riconducibili alle forme glicosilate. Questo è dovuto sia al legame non esclusivo verso specifiche lisine, sia al fatto che i glicopeptidi sono intrinsecamente poco rilevabili con tecniche di spettrometria di massa.

Due fra gli spot meno rappresentati derivano dal pathway glicolitico del

Saccharomyces cerevisiae (spot 6 e 7), mentre non sono stati rilevati spot proteici riconducibili ad ordeine intatte.

L'identificazione di spot proteici come Z4-barley anche a masse più elevate di quella attesa (serie di Spot 2 e 3 in *Figura 4*) è già stata riportata da altri autori²⁶ e può essere dovuta o a fenomeni di N-glicosilazione parziale a carico della proteina, giustificabili anche dalla presenza di due siti consenso per la glicosilazione, o a cross-link proteici non S-S mediati che si verificano in seguito ai trattamenti termici subiti dalla birra durante la produzione. Il fatto che la serie di spot 2 e 3 sia a pI più acidi fa protendere per la prima ipotesi, cioè la glicosilazione non enzimatica che introduce monosaccaridi acidi quali gli acidi sialici. La glicosilazione di questa proteina non è mai stata investigata.

4.2. CROMATOGRAFIA AD ESCLUSIONE MOLECOLARE

L'analisi HPLC e MALDI-TOF degli estratti proteici/peptidici della birra ha mostrato che la componente prevalente dal punto di vista quantitativo è costituita da peptidi di media e piccola taglia molecolare. Per arricchire la componente proteica ad elevata massa molecolare è stata effettuata una separazione cromatografica ad esclusione molecolare degli estratti proteici della birra della frazione proteica con tecniche di cromatografia ad esclusione molecolare. E' stata utilizzata una colonna FPLC impaccata con fase stazionaria di Sephadex, che ha un optimum di separazione fra 1 e 75 kDa, con esclusione delle masse molecolari maggiori di 75 kDa. La colonna è stata preventivamente calibrata con uno apposito standard proteico. Il

cromatogramma (*Figura 5*) dimostra la presenza di una componente minoritaria con MW stimata di ~ 45 kDa raccolta nella frazione 1 mentre la componente prevalente (oltre l'80%) dell'estratto di birra è costituita da una miscela eterogenea di polipeptidi di bassa massa molecolare (MW<10 kDa). Questa componente peptidica eluisce sottoforma di un picco slargato, non risolto, che è stato raccolto nelle frazioni 2-8. Le frazioni a tempi di ritenzione più alti (fraz. 9-12) sono costituite da oligopeptidi (di-, tri-peptidi) o, probabilmente, da componenti non proteici quali metaboliti dell'orzo (es. polifenoli, vitamine, pigmenti etc.).

Dal profilo cromatografico non si evince la presenza di ordeine intatte (le più abbondanti nell'orzo hanno massa attesa di 32-38 kDa) o di loro grossi frammenti. Al fine di confermare l'assenza di ordeine intatte anche con le tecniche cromatografiche ed elettroforetiche, è stata messa a punto una strategia di eventuale arricchimento. Diversi autori hanno ipotizzato che le ordeine avessero un ruolo determinante nella stabilità della schiuma, grazie alle loro proprietà strutturali e che quindi fossero maggiormente concentrate proprio in essa. Come detto, le ordeine sono ricche dell'amminoacido prolina; questa caratteristica le rende particolarmente affini al gel di silice, al quale le proteine si legherebbero con legami a idrogeno. La silice, infatti, è comunemente utilizzata nella pratica birrificatoria per eliminare e prevenire la "haze formation" ossia la formazione di torbidità, dovuta per lo più ad addotti covalenti proteina-polifenoli, che abbassa notevolmente la qualità del prodotto. Per arricchire le eventuali ordeine, la frazione proteica della schiuma di un campione di birra a singolo malto è stata fatta adsorbire su gel di silice e desorbita con una

soluzione ammoniacale, dopo aver effettuato ripetuti lavaggi per rimuovere proteine specificamente interagenti con la silice. La frazione cromatografica n1 da SEC e l'eluato dopo arricchimento su silice sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e colorazione al nitrato di argento. Come si può notare in figura 6 in entrambi i campioni di arricchimento è stata rilevata la presenza di una intensa banda proteica con massa molecolare di circa 17 kDa. In uno studio precedente di Robinson LH et al.⁴⁰ una banda a masse molecolari simili era stata identificata come α -amylase/trypsin inhibitor BTI-CMe1 da *Hordeum vulgare* (MW reale 13.6 kDa). Il successivo MALDI-TOF MS *peptide mapping* del digerito triptico della banda proteica (figura 7), ridotta ed alchilata con iodoacetammide, ha dimostrato che la banda a 17 kDa non coincideva con la BTI-CMe1; tuttavia, la semplice mappatura peptidica non è stata sufficiente ad identificare univocamente la proteina nei comuni database quali Uniprot o NCBI, utilizzando i motori di ricerca classici per l'identificazione proteomica in *peptide mass fingerprinting* (Mascot, Protein Prospector). L'analisi nanoESI-MS e la successiva frammentazione MS/MS dell'intenso ione doppiamente caricato m/z 908.5 ha permesso di sequenziare interamente il peptide di massa $[M+H]^+$ 1816.8 ottenendo la seguente sequenza di 16 amminoacidi: **QQCCQPLAQISEQAR**, con le cisteine carbamidometilate dalla iodoacetammide (Figura 8). Da una ricerca BLAST, per allineamento proteico, è emerso che questa sequenza è interamente contenuta in un "*avenin-like protein*" da Triticacee (Primary Accession Number Expasy Q2A784). L'analisi ESI MS/MS di ioni di altri peptidi ha confermato la stretta omologia della proteina di 17 kDa con

altre proteine “*avenin-like*”, che erano state identificate come proteine “*avenin like*” della specie *Hordeum*. La “*avenin-like protein*” da Triticacee è costituita da 148 amminoacidi, con massa molecolare teorica di 16.3 kDa. L’analisi BLAST ha evidenziato anche una notevole omologia tra questa proteina e le B-ordeine. Come le ordeine, la proteina *avenin like* è ricca dell’amminoacido glutammina. Infatti 34 dei suoi amminoacidi sono Gln (23%) e ciò giustifica anche la parziale formazione di alcuni residui di acido piroglutammico che sono stati osservati nello spettro MALDI dalla contemporanea presenza di segnali che differiscono di 17 dalton (la formazione di acido piroglutammico dalla glutammina comporta perdita di ammoniaca e uno shift, quindi, di 17 unità) (*figura 7*). Sono presenti inoltre 14 cisteine che potrebbero essere impegnate nella formazione di 7 ponti disolfuro. Questo impartirebbe alla proteina una conformazione particolarmente compatta, rendendola poco accessibile alle proteasi. E’ molto probabile che tali fattori strutturali, similmente a quanto si verifica per la Z4 e per le ns-LTP, rendano l’*avenin-like protein* stabile ai fenomeni degradativi, giustificandone quindi il ritrovamento nella birra. Per quanto è a nostra conoscenza, è la prima volta che viene descritta nella birra questa proteina. Inoltre, la sequenza proteica è stata dedotta dalla traduzione della sequenza nucleotidica e, sebbene per essa esistano evidenze a livello di trascritto RNA, la proteina non era mai stata descritta a livello proteico. Data la presenza in quantità rilevanti nella schiuma e il contenuto elevato di prolina e glutammina, l’*avenin-like protein* potrebbe essere coinvolta nella stabilizzazione della schiuma. Questa stessa proteina potrebbe coincidere, almeno parzialmente, con delle bande a MW simili rilevate da altri autori

con elettroforesi SDS-PAGE. Data l'immunoreattività di queste bande verso gli anticorpi antigliadina, alcuni autori avevano suggerito che esse fossero grossi frammenti ordeinici. Le nostre osservazioni, invece, escludono la presenza di ordeine intatte o loro grossi frammenti proteolitici.

4.3. RILEVAZIONE IMMUNOCHEMICA DELLE ORDEINE NELLA BIRRA

Le tecniche di rilevazione immunochimica sono fra le più impiegate nell'analisi biochimica grazie alla loro sensibilità e specificità. Sfruttando la nota cross-reattività fra le prolamine del frumento (gliadine) e quelle dell'orzo (ordeine) abbiamo applicato la tecnica del Western blotting o immunoblotting per la ricerca di eventuali tracce di prolamine nella birra o di epitopi immunoreattivi.

L'immunoblotting consente di individuare proteine separate in elettroforesi dopo il loro trasferimento su un foglio di nitrocellulosa che viene immerso in una soluzione contenente l'anticorpo specifico contro la proteina che si intende ricercare; la posizione sul gel dell'antigene ricercato viene identificata attraverso il legame con l'anticorpo generato contro di esso. La nitrocellulosa è in grado di legare così tenacemente le proteine tanto da interferire con la loro identificazione immunochimica. In particolare sono stati usati come anticorpi primari: a) un antisiero sviluppato nel topo immunizzato con le porzioni N-terminali dell' α -gliadina, coniugate alla BSA come carrier; b) un anticorpo (anti-rabbit) policlonale commerciale (Sigma) sviluppato dal sistema immunitario di un coniglio tenuto dalla nascita a dieta gluten-free, in risposta all'immunizzazione con la frazione proteica

totale del frumento solubile in etanolo 70% (gliadine); c) un anticorpo monoclonale, prodotto con l'antigene R5 (Ridascreen, commerciale)⁴¹ ottenuto dalle sequenze tossiche della gliadina, contenente 5 residui amminoacidici ritenuti quelli antigenici del 33-mer della gliadina, sicuramente coinvolti nell'induzione della malattia celiaca. Come riferimento positivo sono stati usati estratti etanoliche di gliadine e ordeine, preparati secondo la procedura classica di Wieser. Come atteso, le gliadine danno una risposta intensa all'antisiero che riconosce numerose bande proteiche in un range di masse molecolari molto ampio che va da circa 10 fino a circa 90 kDa. La risposta degli estratti etanoliche da farina d'orzo risulta essere meno intensa ma comunque altamente significativa e riguarda proteine anche in questo caso distribuite su un range di masse molecolari piuttosto ampio (*figura 9*). Anche se in molti lavori precedenti era stata riscontrata la presenza di ordeine nella birra⁴², la nostra analisi immunochimica conferma l'assenza di queste proteine nei due campioni di birra analizzati. Le proteine Z4 barley protein e la ns-LTP1 sono debolmente riconosciute dall'anticorpo policlonale a causa di una bassa specificità che ha generato falsi positivi (*figura 10*), ma non sono state riconosciute dall'anticorpo altamente specifico R5. In precedenti lavori erano state identificate ordeine nelle birre utilizzando proprio l'anticorpo policlonale Sigma. E' ragionevole supporre che alcune di queste bande reattive corrispondono alla Z4-barley o a suoi grossi frammenti idrolitici ed alla ns-LTP, piuttosto che a regioni di ordeine. In ogni caso la proteina "avenin-like" di 17 kDa non è risultata immunoreattiva verso nessuno dei diversi anticorpi.

4.4. ANALISI CROMATOGRAFICA DEGLI ESTRATTI PEPTIDICI DA BIRRA

A causa dell'elevata complessità della miscela peptidica, si è ritenuto necessario una preliminare fase di separazione della frazione peptidica mediante cromatografia liquida ad alta pressione su fase inversa (RP-HPLC). La rilevazione cromatografica è stata effettuata contemporaneamente con due lunghezze d'onda diverse: 220 nm, lunghezza d'onda di max assorbimento del legame peptidico, e 280 nm, lunghezza d'onda di max assorbimento dei gruppi fenilici degli amminoacidi aromatici (Phe, Tyr, Trp). Qualitativamente i cromatogrammi alle diverse lunghezze d'onda mostrano gli stessi assorbimenti, dando indizi significativi che le molecole separate sono effettivamente di natura peptidica.

Si può notare in entrambi i cromatogrammi (*figura 11*) la presenza di picchi di bassa intensità, a tempi di ritenzione compresi tra 40 e 45 minuti (picchi 18,19,20 in P e picchi 21,22,23 in DM). Probabilmente si tratta di materiale proteico di massa molecolare più elevata, ma, nonostante il tentativo di caratterizzazione mediante "peptide mass mapping", non è stato possibile risalire alla loro identità. In linea generale non sono state rilevate differenze significative nel profilo peptidico cromatografico fra le due varietà di birre analizzate. Le frazioni cromatografiche, manualmente raccolte e liofilizzate, sono state utilizzate per le determinazioni immunoenzimatiche di tipo ELISA impiegando l'anticorpo monoclonale R5 Ridascreen, come vedremo in seguito. Le frazioni cromatografiche sono state anche singolarmente analizzate in MALDI-TOF MS, ma una definitiva identificazione delle

componenti non è stata possibile, data la grossa complessità anche delle frazioni cromatografiche e l'assenza di specificità nell'idrolisi delle proteine dell'orzo che produce la serie di peptidi osservati.

4.5. ANALISI IN SPETTROMETRIA DI MASSA MALDI-TOF DELLE MISCELE PEPTIDICHE

L'analisi della frazione peptidica, sia a basse che ad alte masse, è stata realizzata mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. Questa tecnica è particolarmente adatta per l'analisi in miscela di frazioni peptidiche complesse. Infatti la grande maggioranza delle componenti peptidiche, durante la ionizzazione MALDI, viene singolarmente protonata; pertanto ogni singola specie molecolare genera un singolo segnale e i valori di rapporto m/z presenti nello spettro di massa corrispondono alla massa molecolare aumentata di una unità (H^+). A causa della scarsa sensibilità di questa tecnica nei confronti di proteine ad elevato peso molecolare, e della difficoltà di rilevazione di proteine glicosilate, non è stata evidenziata la presenza della Z₄-barley protein. Al contrario, la ns-LTP1, m/z teorico 9695.9, è stata chiaramente identificata e, come atteso, risultava essere interessata da fenomeni di glicazione, in quanto lega unità di glucosio, il che si riflette in un incremento progressivo del peso molecolare di 162 Da. La ns-LTP1 genera un complesso numero di segnali, alcuni dei quali possono anche essere dovuti alla modificazione post-traduzionale della proteina che consiste nell'esterificazione cis-14-idrossi-10,13-diossi-7-eptadecanoico dell'Asp già descritta.^{43,44,45}

La frazione più abbondante nella birra è rappresentata da una complessa miscela di peptidi con basse masse molecolari. I segnali con massa nel range di 7100-7700 Da sono stati assegnati a ns-LTP2 e a sue forme glicosilate (*figura 12*). E' stato possibile caratterizzare, per tentativi, alcuni tra i segnali nello spettro MALDI, partendo dalle proteine precedentemente descritte nella birra, sulla base della loro massa molecolare attesa. Questi segnali derivano dai frammenti C-terminali della proteina Z₄-barley, dai peptidi delle ns-LTP e dalla CMd, una proteina dell'endosperma dell'orzo ampiamente idrolizzata nella birra ma identificata anche come proteina intatta²⁶. Per esempio, facendo riferimento allo spettro della birra P i segnali predominanti *m/z* 2566.9, 3819.7 e 4033.9 corrispondono ai peptidi 376-399, 365-399 e 363-399 dei frammenti C-terminali della Z₄-barley. Analogamente i segnali *m/z* 2891.7 e *m/z* 3119.5 sono stati assegnati a frammenti 120-147 e 122-147 di CMd α -amilase-inhibitor (3119.7 e 2893.4).

4.6. ANALISI NANO-HPLC MS E MS/MS DEI PEPTIDI DELLA BIRRA

La frazione peptidica della birra è stata analizzata mediante HPLC a *nano*-flussi, interfacciato con uno spettrometro di massa ibrido quadrupolo-TOF a sorgente electrospray. Secondo la tecnica electrospray le molecole vengono ionizzate e portate in fase gas a partire da soluzioni dell'analita. Con lo strumento impiegato è possibile selezionare, sulla base del caratteristico rapporto *m/z*, ioni prescelti, frammentarli in una cella di collisione e ottenere spettri di frammentazione dei singoli ioni selezionati (tandem MS o MS/MS). I peptidi frammentano secondo regole ben note e, pertanto,

dai relativi spettri di frammentazione è virtualmente possibile ottenere sequenze amminoacidiche *de novo*.

In electrospray i peptidi conservano, in prima approssimazione, lo stato di carica che avevano in soluzione e pertanto, trattandosi di polielettroliti, ogni specie molecolare può dar luogo a più segnali a seconda del suo stato di carica. I dati di frammentazione sono stati usati per l'identificazione automatizzata delle proteine genitrici (mediante MASCOT search engine) o per il sequenziamento manuale di peptidi. In tabella 2 è riportato il sequenziamento *de novo* di alcuni peptidi isolati dalla birra e l'identificazione delle proteine da cui questi peptidi derivano secondo la tecnica proteomica "bottom up". La complessità della miscela polipeptidica dei campioni di birra nel range 0.5-5 kDa impedisce tuttavia la caratterizzazione dei peptidi. Inoltre, la natura non triptica di questi peptidi, l'assoluta mancanza di specificità nell'idrolisi polipeptidica e i fenomeni di glicosilazione non enzimatica complicano notevolmente l'identificazione dei peptidi. Di conseguenza sono stati sequenziati solo pochi peptidi di piccola taglia molecolare, con massa molecolare di circa 1661 Da. Oltre alla presenza di peptidi derivanti dalle proteine idrosolubili dell'orzo, sono state identificati peptidi derivanti dall'idrolisi delle ordeine. Alcune sequenze epitopiche, la cui tossicità per i celiaci è già stata accertata, sono comuni alle gliadine, alle ordeine ed alle proteine di riserva della segale. In particolare, fra le sequenze sono stati riscontrati alcuni dei motivi amminoacidici comuni, ritenuti responsabili della tossicità del glutine: **QQPYP, PQQPY, QQPFP**. Alcune di queste sequenze sono state ritrovate nei peptidi della birra, come riportato in tabella 2, e potrebbero essere

proprio quelle riconosciute dall'anticorpo R5 nei saggi ELISA sulle frazioni cromatografiche, come vedremo in seguito.

4.7. SAGGI ELISA CON METODO “COMPETITIVO”

Il saggio ELISA competitivo è, come quello di tipo “sandwich”, un saggio immunoenzimatico utilizzato per l'analisi quantitativa di sequenze peptidiche o di prolamine nel frumento (gliadine), nella segale (secaline) e nell'orzo (ordeine). Lo svantaggio nell'impiego di un saggio ELISA “ sandwich” consiste nella naturale tendenza a sottostimare l'antigene, dal momento che il riconoscimento anticorpale richiede la presenza di due apteni contemporaneamente sulla stessa molecola, il secondo necessario al legame dell'anticorpo secondario-POD coniugato. Data la probabile presenza di epitopi peptidici anche di piccole dimensioni negli estratti di birra, sono stati impiegati per una quantificazione più accurata saggi ELISA competitivi, che richiedono la presenza di un singolo sito di riconoscimento e sono meno affetti da fenomeni di interferenza.

Operativamente, ai pozzetti di un'apposita piastra ELISA in plastica, si lega covalentemente una piccola quantità di gliadine standard (quale antigene) e si aggiunge la soluzione campione contenente l'antigene da saggiare e l'anticorpo anti-gliadina (anticorpo-R5 monoclonale) marcato con l'enzima perossidasi (POD). Gli anticorpi marcati si legano alle gliadine in soluzione all'antigene da testare, mentre si legano all'antigene sulla piastra nel caso in cui sono liberi. Mediante un lavaggio con acqua viene allontanato l'enzima coniugato legato presente in soluzione, ossia i

complessi antigene-anticorpo già formati, mentre l'enzima coniugato che ha il sito di legame libero riconosce l'antigene sulla piastra. Prima di procedere all'incubazione al buio, ai pozzetti viene aggiunto un substrato enzimatico colorato di rosso (urea perossidasi) ed un cromogeno (tetrametilbenzidina). L'enzima coniugato legato converte il cromogeno in un prodotto blu. L'aggiunta di un reagente bloccante la reazione enzimatica, porta ad una ulteriore variazione del colore da blu a giallo. La determinazione finale consiste in una lettura spettrofotometrica, a 450 nm, della soluzione contenente il cromogeno colorato in giallo. L'assorbimento è inversamente proporzionale alla concentrazione di gliadine nel campione.

Il kit ELISA competitivo commerciale contiene gliadine standardizzate per poter costruire una retta standard ai fini delle determinazioni di incogniti. La retta standard ottenuta in questo modo è lineare nel range di risposta che comprende un contenuto gliadinico fra 0 e 80 ppb (pari a 0.004 ng), con un coefficiente di correlazione lineare $R^2 = 0.999$. In prima analisi, abbiamo effettuato saggi ELISA di tipo sandwich, con un kit commerciale. Con tale tecnica si è quantificato il contenuto gliadinico nelle due birre analizzate; tale valore risulta essere ben al di sotto di 20 ppm, che rappresenta il limite imposto dal Codex Alimentarius, per poter considerare un alimento gluten-free. Il contenuto gliadinico è 10.4 ppm e 10.3 ppm, per la birra P e DM rispettivamente.

Sono state saggiate mediante ELISA competitivo anche le frazioni cromatografiche derivanti dalla separazione peptidica RP-HPLC (*Tabella 3*). Il contenuto gliadinico è 5.46 ppm per la birra doppio malto e <5 ppm per la birra singolo malto, valore

inferiore a quello ottenuto con il saggio ELISA classico. Questo risultato ha confermato la specificità dell'anticorpo R5, rispetto a quello policlonale, nella determinazione di epitopi tossici. In maniera inattesa, i dati ELISA competitivo fornivano valori più bassi dell'ELISA sandwich sul contenuto di sequenze immunoreattive. In entrambi i campioni di birra analizzati, le frazioni cromatografiche raccolte a tempi di ritenzione minori di 19.5 minuti, hanno mostrato una risposta al test competitivo al di sotto del limite di rilevabilità. Una significativa immunoreattività è stata riscontrata solo per le frazioni 15, 16, 17 nella birra singolo malto e le frazioni 18 e 20 nella birra doppio malto, a tempi di ritenzione compresi tra 20 e 28 minuti. La determinazione con ELISA competitivo ha confermato la presenza di epitopi riconosciuti dall'anticorpo monoclonale R5, in frazioni cromatografiche che eluiscono negli stessi tempi di ritenzione e nelle stesse regioni del cromatogramma per entrambi i campioni di birra analizzati. Del resto la risposta intensa si verifica per frazioni cromatografiche contigue e ciò suggerisce la possibilità che a rispondere siano o epitopi diversi strutturalmente molto simili, al punto che le proprietà cromatografiche varino solo leggermente, oppure sia un singolo epitopo che contamina le poche frazioni contigue che cadono in range di tempi di ritenzione molto stretto. Pertanto i possibili epitopi immunogenici nella birra, potenzialmente coinvolti nell'induzione della malattia celiaca, sono stati ristretti ad un numero molto limitato e sono ben localizzati lungo il cromatogramma.

4.8. DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN GLUTINE DI BIRRE ITALIANE ED ESTERE CON KIT COMMERCIALI

Sulla base dei risultati ottenuti, è stato effettuato uno screening di 22 birre commerciali per valutare il loro contenuto in materiale peptidico gluten-like immunoreattivo. Sono stati utilizzati a questo scopo dei kit ELISA commerciali ad uso dei pazienti celiaci per determinare il contenuto in glutine di alimenti. La valutazione è stata effettuata in “ring test” con analogia determinazione da parte del laboratorio del “Food Research Institute” di Praga, Repubblica Ceca.

I kit ELISA usati erano basati su determinazioni “sandwich” con anticorpi policlonali sviluppati dall’Immunotech, Beckman Coulter Company. Gli anticorpi erano certificati per l’assenza di falsi positivi dovuti a cross-reattività con riso, mais, avena e grano saraceno. I controlli e le calibrazioni sono stati effettuati con lo standard gliadinico fornito dall’associazione europea “Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity”.

I risultati di questo screening sono riassunti nella Tabella 4. A parte un singolo campione di birra (Menabrea) che mostrava un contenuto in glutine di 33.4 ppm, per tutti i campioni analizzati è stato misurato un contenuto inferiore ai 20 ppm proposto come limite precauzionale del contenuto in glutine di alimenti gluten-free dal Codex Alimentarius.

E’ importante sottolineare che il contenuto stimato dal laboratorio estero è stato, in tutti i casi, inferiore a quello stimato da noi; con ogni probabilità, questo è correlato alle procedure di formulazione delle soluzioni utilizzate per le misurazioni. Questo

dato pone anche in evidenza come la valutazione del contenuto in glutine può essere complicata e non affidabile, se effettuata secondo procedure non perfettamente standardizzate e da personale non adeguatamente formato.

Come mostrato in *figura 13*, l'analisi SDS-PAGE (in questo caso effettuata con gel in gradiente di poliacrilammide 9-18%) di alcune delle birre estere selezionate in questo studio non ha mostrato differenze significative sul contenuto proteico almeno per quanto riguarda le componenti più abbondanti, dato che in tutti i casi le proteine prevalenti erano le ben note Z4-barley e le nsLTP.

4.9. CONFRONTO PRELIMINARE DEL CONTENUTO PROTEICO DI BIRRE PRODOTTE CON CEREALI DIVERSI DALL'ORZO

E' stato infine intrapreso un confronto fra le frazioni proteiche di cinque birre, alcune delle quali prodotte con malto d'orzo, puro (Peroni doppio malto) o con aggiunte di altre cereali (Peroni, contenente mais 20%). Le altre sono prodotte con frumento al 100% o con cereali quali il miglio (birra gluten free), considerati sicuri per l'alimentazione del celiaco.

Il confronto del contenuto proteico di tali birre è stato effettuato in SDS-PAGE con colorazione al blu silver (*figura 14*).

Le analisi preliminari non hanno evidenziato bande riconducibili a prolamine, neanche nella birra prodotta con frumento. Questo dato era in parte atteso, data la nota insolubilità delle prolamine del frumento in soluzioni a base fondamentalmente acquosa. Le gliadine sono infatti solubili in etanolo 60-70%,

mentre le glutenine necessitano per la solubilizzazione di condizioni denaturanti e riducenti, o solventi quali l'isopropanolo, o condizioni fortemente acide. Per escludere comunque la presenza di prolamine o grossi derivati idrolitici, è comunque necessario applicare tecniche analitiche più sensibili e frazionamenti mirati della componente proteica. E' interessante notare la presenza di bande omologhe della Z4 (serpine) e delle LTP che sembrano essere abbastanza conservate anche nelle birre prodotte con cereali diversi dall'orzo.

5. *DISCUSSIONE*

Solo un numero relativamente piccolo di proteine dell' orzo sopravvive ai processi di maltazione, di fermentazione e bollitura che si verificano nella produzione della birra. La maggior parte del materiale proteico è, infatti, rimossa o degradata in amminoacidi e piccoli peptidi. Zhang e Jones⁴⁶ hanno identificato almeno 42 diverse proteasi attive nella degradazione delle proteine durante la maltazione dell'orzo e le hanno classificate in 5 diverse categorie sulla base del sito attivo e della loro specificità d'idrolisi. Tali proteasi contribuiscono ad idrolizzare sia le proteine idrosolubili che le proteine di riserva vere e proprie dell'orzo. Il malto opportunamente modificato contiene meno della metà di ordeine presenti nell'orzo originario⁴⁷. Le D-ordeine si degradano più rapidamente delle loro analoghe di tipo B, e queste ultime si degradano più rapidamente delle C-ordeine⁴⁷. Inoltre, le ordeine non sono idrosolubili e in grossa parte precipitano dalla soluzione della birra che è sostanzialmente acquosa (4-8% etanolo). Altre prove dimostrano che l'aggregazione di ordeine attraverso legami disolfuro intramolecolari indotti dalla macerazione provoca un'ulteriore rimozione di ordeine dal mezzo acquoso. Altri evidenti fenomeni degradativi si verificano nel processo di fermentazione da parte dei lieviti. Le proteine predominanti nella birra sono le due albumine dell'orzo, la Z₄ (Mr ~43 kDa) e la ns-LTP₁ (~ 9.6 kDa), entrambe glicosilate non-enzimaticamente dai processi termici (reazione di Maillard) con un numero variabile di esosi. La proteina Z₄ è strutturalmente collegata alle serpine, e si ritiene sia un inibitore di serina

proteasi. Sebbene alcuni autori hanno ritenuto in passato che la ns-LTP funzionasse come inibitore delle proteasi endogene dell'endosperma dell'orzo ed in particolare fosse un inibitore cistein-proteasi, oggi questa ipotesi è stata tralasciata, in quanto è stato dimostrato che la ns-LTP non ha azione proteasica⁴⁸. Dal punto di vista della fisiologia dell'orzo, la ns-LTP sembra essere attiva nei meccanismi di difesa contro insetti ed agenti patogeni. La ns-LTP è oggi considerata un "panallergene", data la sua presenza quasi ubiquitaria negli alimenti di origine vegetale e il ruolo di "major allergen" negli alimenti. La Z₄ e la LTP sono particolarmente stabili al calore e resistenti agli enzimi proteolitici. In particolare le ns-LTP sono fortemente stabilizzate nella loro struttura da quattro ponti disolfuro raggruppati in catene di 91 (ns-LTP₁) e 67 (ns-LTP₂) amminoacidi. L'azione allergenica potrebbe essere attribuita principalmente alla forte stabilità alla digestione di questa proteina, conferitagli dalla presenza di quattro ponti disolfuro in catene proteiche relativamente piccole. I ponti disolfuro, infatti, stabilizzerebbero fortemente la forma compatta globulare, rendendo tra l'altro inaccessibili i siti interni alle proteasi. L'utilizzo di anticorpi specifici come l'anticorpo monoclonale R5 ha permesso di confermare che Z₄ e ns-LTP non sono cross-reattive con sequenze "gluten-like".

Comunque, l'aver trovato nella birra numerosi frammenti C-terminali di Z₄ e di peptidi derivanti da LTP₁, suggerisce che essi sono in parte degradati dall'orzo e/o dalle proteasi del lievito durante la birrificazione, dimostrando che i processi degradativi che si verificano sono drastici. Pertanto l'arricchimento relativo di albumine nella birra è il risultato della precipitazione o della degradazione

proteolitica delle ordeine. Tutti assieme questi dati supportano l'ipotesi che le ordeine possano essere del tutto assenti o presenti solo in tracce nella birra. Nei campioni di birra esaminati nel presente lavoro, non abbiamo rilevato la presenza di ordeine intatte, mentre si è trovato solo una piccola quantità di un polipeptide, identificato come proteina "*avenin-like*", la quale esibiva omologia con le ordeine stesse. L'analisi ESI-MS/MS del triptico della banda a 16 kDa ed il sequenziamento de novo di un peptide di 16 amminoacidi **QQCCQPLAQISEQAR**, hanno permesso di riscontrare l'omologia di questa proteina con diverse proteine tipiche delle Triticacee, di "*avenin-like protein*". Pur essendo stata accertata una notevole omologia di queste proteine con le B-ordeine mediante BLAST, la "*avenin-like protein*" non era immunoreattiva verso nessuno degli anticorpi considerati in questo studio. La nostra ricerca non ha consentito di rilevare la presenza di ordeine intere nei due campioni di birra italiana presi in esame. D'altro canto, studi precedenti hanno indicato che le ordeine possono giocare un ruolo cruciale nella stabilizzazione della schiuma e, particolarmente, nella formazione di intorbidimento^{31,32,40}. I nostri risultati, relativi all'assenza di ordeine nella birra, suggeriscono che le proteine più attive nella promozione di schiuma dovrebbero essere le albumine sopravvissute. Evans DE ed altri, hanno dimostrato che il processo di stabilizzazione della birra mediato dal gel di silice rimuove le proteine ricche in prolina e glutammina che causano l'indesiderato intorbidimento; il fatto che le ordeine siano effettivamente ricche sia in prolina che glutammina, ha fatto ritenere in passato che le proteine adsorbite alla silice fossero effettivamente prolamine. L'identificazione

dell' "*avenin-like protein*", che, come abbiamo discusso, è effettivamente ricca in glutammine e proline ed ha un certo grado di omologia con le ordeine, suggerisce che altre proteine della frazione idrosolubile dell'orzo possono essere implicate nei fenomeni di stabilizzazione della schiuma e nell'intorbidimento. Le nostre indicazioni confermano anche le già descritte proprietà di stabilizzazione della schiuma della Z₄ e ns-LTPs. Le indagini precedenti, in cui sono descritte le ordeine nell'orzo, sono state condotte, per la gran parte, con tecniche poco specifiche o impiegando sistemi ormai datati. I nostri dati concordano con due dei lavori di letteratura in cui sono state applicate moderne tecniche di proteomica, che prevedono la separazione in elettroforesi 2D ad alta risoluzione, e tecniche immunochimiche con anticorpi monoclonali e l'identificazione con spettrometria di massa. Mediante elettroforesi 2D accoppiata con la spettrometria di massa non sono state identificate proteine o grossi frammenti riconducibili alle ordeine nella schiuma di birra³⁰, mentre solo tracce di una γ 3-ordeina, appartenente ad una classe di gran lunga minoritaria delle prolamine dell'orzo, sono state identificate nella birra²⁶.

Come discusso, nonostante la componente peptidica sia molto complessa e resa ulteriormente eterogenea da fenomeni di glicazione non enzimatici che si verificano in conseguenza dei trattamenti termici subiti dalla birra nel corso della sua produzione, le tecniche separative ad alta risoluzione come l'HPLC a nano flussi accoppiate di spettrometria di massa ESI-MS/MS hanno permesso di identificare alcune delle potenziali sequenze immunoreattive nella birra.

E' la prima volta che viene accertata con sequenziamento diretto la presenza di potenziali sequenze "gliadin-like" nella birra e che viene caratterizzata, sebbene parzialmente. Sono stati identificati cinque peptidi derivanti dalla proteolisi ordeina $\gamma 3$, cinque da ordeina B, due da ordeina B₁ dell'*Hordeum vulgare*, e uno da ordeina B AAU06229 (Swiss-Prot PAN Q67061) da *Hordeum brevisubulatum* subsp. *Turkestanicum*. Poiché solo poche sequenze di ordeine sono riportate nei data-base, questa ultima identificazione deve essere considerata una identificazione derivante dalla stretta omologia con l'*Hordeum vulgare*.

Cornell e Mothes⁴⁹ hanno suggerito che la presenza di sequenze **QQPY** e **QPYP** nei peptidi derivati da gliadina potrebbe essere associata a tossicità celiaca. Nei peptidi identificati nella birra sono state trovate le sequenze **PQQPY** e **QQPYP** che contengono i motivi tossici; queste sequenze sono comuni solo ai tre cereali celiaco-tossici grano, segale e orzo⁴⁹. Anche i motivi estesi di sei amminoacidi **PQQPYP** e **QQPYPQ**, contenenti le sequenze tossiche **QPY** e **QQPYP**, si trovano solo nella segale e nel grano, oltre all'orzo. La sequenza di sette amminoacidi **PQQPYPQ** che abbiamo caratterizzato (*tabella 2*) contiene entrambi i motivi tossici di quattro amminoacidi. Interessante il fatto che questa sequenza è relativamente omologa al dominio ripetuto di parecchie gliadine α e β del grano. **PQQP** si ripete nei peptidi tossici 26-mer identificati da Shan et al⁵⁰. Il motivo **PQQPY** è contenuto nel peptide tossico 31-43 dell' α -gliadina che si è dimostrata in grado di stimolare l'espressione di interleuchina (IL)-15, dell'enzima cicloossigenasi-2 (COX-2) e dei markers di attivazione cellulare CD25 e CD83 su macrofagi, monociti, e cellule dendritiche della

lamina propria, senza stimolare le cellule T CD4⁺ ⁵¹. Inoltre, uno dei pezzi di sequenza dell'ordeina B identificato negli estratti di birra **QPQFP**, è contenuto nel peptide potenzialmente immunogenico 25-mer identificato da Mamone et al⁵², come resistenti alla digestione gastrointestinale e come potenziale attivatore della malattia celiaca. Sulla base delle considerazioni precedenti, le sequenze in grassetto nella tabella 2 sono probabilmente responsabili del riconoscimento da parte dell'anticorpo R5 in questo studio, e la loro possibile tossicità per i pazienti celiaci meriterebbe ulteriore approfondimento. Da questo punto di vista, sarebbe interessante sintetizzare questi peptidi per verificare le loro proprietà immunologiche al fine di sviluppare adeguate tecnologie analitiche per la rivelazione di peptidi potenzialmente tossici e quindi per valutare la sicurezza di una specifica birra.

Uno studio preliminare di valutazione in vitro dell'azione tossica della frazione peptidica della birra su linfociti intestinali in coltura da pazienti celiaci, condotto presso il laboratorio di Immunobiologia dell'Istituto di Scienze dell'Alimentazione del CNR di Avellino, ha confermato che l'estratto peptidico da birra risulta tossico, in grado variabile, sulle linee linfocitarie di 5 pazienti celiaci pediatrici. Il saggio viene effettuato valutando il contenuto di interleuchine linfocitarie proliferative e pro-infiammatorie dopo incubazione con colture di cloni linfocitari estratti dalla lamina propria di pazienti celiaci.

E' in corso il frazionamento cromatografico dei peptidi per isolare le specie responsabili della stimolazione linfocitaria.

6. CONCLUSIONI

L'applicazione di tecniche elettroforetiche e cromatografiche e delle più sensibili tecniche immunochimiche (Western blotting), così come l'impiego della spettrometria di massa per l'analisi diretta di polipeptidi, non ha consentito di rilevare la presenza di ordeine intere nei due campioni di birra italiana presi in esame. L'utilizzo di anticorpi monoclonali specifici R5 ad alta specificità ha confermato l'assenza in quantità rilevabili di prolammine, in contrasto con i dati riportati in letteratura in lavori cronologicamente datati ma, d'altro canto, in pieno accordo con ricerche più recenti condotte con tecniche aggiornate di proteomica.

Dopo isolamento con elettroforesi e sequenziamento *de novo* nanoESI MSMS di frammenti peptidici e analisi BLAST, è stata identificata per la prima volta una cosiddetta "*avenin-like protein*", strettamente correlata dal punto di vista strutturale alle ordeine ma priva di immunoreattività, particolarmente arricchita nella schiuma. Oltre all'identificazione di questa proteina è stata confermata la già ben documentata prevalenza nella frazione proteica della birra della Z₄-barley e delle ns-LTP 1 e 2, il cui coinvolgimento in fenomeni di sensibilizzazione di tipo allergico IgE mediati, non correlati alla celiachia, è già stato dimostrato. I dati sulla caratterizzazione della frazione proteica suggeriscono che il ruolo principale negli aspetti tecnologici relativi alla produzione e alla qualità della birra, come la "haze-formation" e la "foam-stabilization", è svolto da albumine dell'orzo piuttosto che da prolammine. La caratterizzazione delle proteine della birra ha anche permesso di formulare un'ipotesi

sul rispettivo ruolo giocato dalla temperatura e dai fenomeni fermentativi nella degradazione delle proteine dell'orzo, nel corso della produzione della birra. Più in dettaglio, data la rilevante presenza di ordeine nel malto d'orzo, i trattamenti di bollitura, l'insolubilità delle prolammine e l'idrolisi proteolitica da parte dei lieviti sembrano incidere di gran lunga, in modo più importante, sulla degradazione delle proteine rispetto alla degradazione da parte delle proteasi endogene dell'orzo.

Grazie all'applicazione complementare della spettrometria di massa MALDI-TOF ed ESI-MS e tandem MS, quest'ultima anche accoppiata alla separazione HPLC, è stata parzialmente caratterizzata per la prima volta la frazione peptidica della birra a basse masse molecolari. E' stato dimostrato che nella birra sono presenti frammenti idrolitici delle ordeine, alcuni dei quali conservano le sequenze amminoacidiche ritenute responsabili dell'induzione della risposta immunitaria nei celiaci.

I saggi ELISA, tuttavia, suggeriscono che le sequenze immunoreattive sono ristrette a solo pochi peptidi e che il contenuto di sequenze "gluten-like" è molto limitato. Stando alla determinazione immunochimica, infatti, praticamente tutte le birre analizzate e le due birre nazionali considerate in maniera prevalente in questo studio, sono da considerarsi "gluten-free", in quanto il contenuto totale in gliadina è abbondantemente al di sotto del limite precauzionale di tossicità di 20 ppm suggerito dal Codex Alimentarius per i pazienti celiaci. Comunque solo un follow-up clinico mirato può accertare in maniera definitiva se il consumo di birra da parte dei celiaci può essere potenzialmente pericoloso.

7. BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Fasano A, Catassi C, Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* **2001**;120:636-51.
- ² Accomando S, Cataldo F, The global village of celiac disease. *Digestive and Liver Disease* **2004**;36:492-8.
- ³ Ciclitira PJ, AGA technical review on celiac sprue. *Gastroenterology* **2001**;120:1526-40.
- ⁴ Davidson LSP, Fountain JR. Incidence of sprue syndrome with some observations on the natural history. *BMJ* **1950**;1:1157-61.
- ⁵ Sollid LM, Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Reviews Immunology* **2002**;2:647-55
- ⁶ Ellis A, Celiac disease: previous family studies. In: McConnell RB, editor. The genetics of celiac disease. *Lancaster: MTP Press, Copenhagen*, **1981**, pp. 197-9
- ⁷ Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* **1993**;105:910-22.
- ⁸ Peci G, Genetic associations and immunopathogenesis of coeliac disease. *Acta Physiol Hungarica* **2000** 87(4):339-53
- ⁹ Kreis M, Forde BG, Rahman S, Miflin BJ, Shewry PR, Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *Journal of Molecular Biology* **1985**;183:499-502
- ¹⁰ Sturgess RP, Ellis HJ, Ciclitira PJ, Cereal chemistry, molecular biology, and toxicity in celiac disease. *Gut* **1991**;32:1055-60
- ¹¹ Wieser H, Seilmeier W, Belitz HD. Comparative investigations of partial amino acid sequences of prolamines and glutelins from cereals. II. Fractionation of glutelins. *Z Lebensm Unters Forsch* **1980**;171:430-6
- ¹² Wieser H, Seilmeier W, Eggert M, Belitz HD. Tryptophan content of cereal proteins. *Z Lebensm Unters Forsch* **1983**;177:457-60
- ¹³ Kasarda DD. Grains in relation to celiac disease. *Cereal Foods World* **2001**;46:209-10

-
- ¹⁴ Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* **2000**;119:234-42
- ¹⁵ Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR. The immune recognition of gluten in celiac disease. *Clinical & Experimental Immunology* **2005**;140:408-16
- ¹⁶ Howard K. A, Gayler KR, Eagles HA and Halloran GM, The Relationship Between D Hordein and Malting Quality in Barley. *Journal of Cereal Science* **1996**; 24: 47–53
- ¹⁷ Shewry PR, Kreis M, Parmar S, Lew E JL and Kasarda DD Identification of c-type hordeins in barley *FEBS Letters* **1985**; 190: 61–64
- ¹⁸ Sabbatella L, Di Tola M, Vetrano S, Di Cello T, Maffia C, Picchi C, De Vincenzi M, Anania MC, Picarelli A, Immunologic evidence of no harmful effects of oats in celiac disease *Proceedings of 10th International Symposium on Celiac Disease* **2000**; Paris-02-05
- ¹⁹ Friis SU, Sjostrom H, Noren O, Rudiger N, Anthonsen D, The prolamin antibody reactivity against hordein polypeptides in sera from patients with coeliac disease, *Clinica Chimica Acta* **1988**; 15;176(3): 241-50
- ²⁰ Vader LW, Stepniak DT, Bunnik EM, Kooy YM, DE Haan W, Drijfhout JW, Van Veelen PA, Koning F, Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains, *Gastroenterology* **2003**; 1105-13
- ²¹ Vainio E, Varjonen E, Antibody response against wheat, rye, barley, oats and corn: comparison between gluten-sensitive patients and monoclonal antigliadin antibodies, *International Archives of Allergy and Applied Immunology* **1995**; 106(2): 134-8
- ²² Iametti S, Bonomi F, Ferranti P, De Martino A, Picariello G, Characterization of peptides and proteins in beer by different approaches, Proceedings of Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity 20th meeting, Tubingen (Germany) **2005**; M. Stern Edition
- ²³ Cortacero-Ramírez S, Hernáinz-Bermúdez de Castro M, Segura-Carretero A, Cruces-Blanco C, Fernández-Gutiérrez A, Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. *Trends in Analytical Chemistry*, Volume 22, Issue 7, July-August **2003**; 440-455
- ²⁴ Finnie C, Maeda K, Østergaard O, Bak-Jensen KS, Larsen J and Svensson B,

Aspects of the barley seed proteome during development and germination
Biochemical Society Transactions **2004**; 32, part 3

²⁵ Jegou S, Douliez JP, Molle D, Boivin P, Marion D, Evidence of the glycation and denaturation of LTP1 during the malting and brewing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001** 49(10):4942-9

²⁶ Perrocheau L, Rogniaux H, Boivin P, Marion D, Probing heat-stable water-soluble proteins from barley to malt and beer,
Proteomics. **2005**; 5(11):2849-58

²⁷ Perrocheau L, Bakan B, Boivin P, Marion D, Stability of barley and malt lipid transfer protein 1 (LTP1) toward heating and reducing agents: relationships with the brewing process *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**;19;54(8):3108-13

²⁸ Garcia-Casado G, Crespo JF, Rodriguez J, Salcedo G, Isolation and characterization of barley lipid transfer protein and protein Z as beer allergens *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2001**;108(4):647-9

²⁹ Curioni A, Pressi G, Furegon L, Peruffo DB, A Major Protein of Beer and Their Precursors in Barley: Electrophoretic and Immunological Studies *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**;43, 2620-2626

³⁰ Okada Y, Iimure T, Takoi K, Kaneko T, Kihara M, Hayashi K, Ito K, Sato K, Takeda K, The Influence of Barley Malt Protein Modification on Beer Foam Stability and Their Relationship to the Barley Dimeric α -Amylase Inhibitor-I (BDAI-I) as a Possible Foam-Promoting Protein *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**;56 (4), 1458–1464

³¹ Asano, Shinagawa K, Hashimoto N, Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation *The Journal of the American Society of Brewing chemists* **1982**; 40, 147-154

³² Leiper KA et al., Beer Polipeptides and silica gel. *The Journal of the Institute of Brewing* **2003**; 109(1),73-79

³³ Evans DE et al, Investigation of the Impact of Proline Specific Endoproteinase on Malt Haze-Active and Foam- Active Proteins *The Journal of the American Society of Brewing chemists Chem* **2003**

³⁴ Kanerva P et al, Determination of Prolamins in Beer by ELISA and SDS-PAGE. *The Journal of the Institute of Brewing* **2005**; 111(1), 61–64

-
- ³⁵ Ferre S, García E, Méndez E, Measurement of hydrolysed gliadins by a competitive ELISA based on monoclonal antibody R5: Analysis of syrups and beers. In: M Stern, editor. Proceedings of the 18th Meeting Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity, Stockholm, Sweden, *Verlag Wissenschaftliche Scripten*.**2003**. 65–69
- ³⁶ Hernando A, García E, Llorente M, Mujico JR, Lombardia M, Mäki M, Kaukinen K, Collin P, Méndez E, Measurement of hydrolysed gliadins in malts, breakfast cereals, heated/hydrolysed foods, whiskies and beers by means of a new competitive R5 ELISA. In: Stern M, ed. Proceedings of the 19th Meeting Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity, 30 September-3 October, 2004, Prague, Czech Republic. Zwickau: *Verlag Wissenschaftliche Scripten*.**2005**; 31-37
- ³⁷ Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG, Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis *Electrophoresis*. **2004**;25(9):1327-33
- ³⁸ Wieser, H, Antes S, Seilmeier W, Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high performance liquid chromatography *Cereal Chemistry* **1998**; 75:644-650
- ³⁹ Mortz, E, Krogh TN, Vorum H, and Görg A, Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis *Proteomics* **2001**; 1: 1359-1363
- ⁴⁰ Robinson LH, The Identification of barley haze active protein that influences beer haze stability: the genetic basis of a barley malt haze active protein *Journal of Cereal Science* **2007**; Iimure T, Construction of a novel beer proteome map and its use in beer quality control *Journal of Cereal Science* **2009**
- ⁴¹ Osman AA, Uhlig HH, Valdés I, Amin M, Méndez E, Mothes T, A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* **2001**;13:1189-1193
- ⁴² Dostálek P, Hochel I, Méndez E, Hernando A, Gabrovská D, Immunochemical determination of gluten in malts and beers *Food Additives & Contaminants* **2006**;23(11):1074-8

-
- ⁴³ Jegou S, Douliez JP, Molle D, Boivin P, Marion D, Purification and structural characterization of LTP1 polypeptides from beer *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**; 48(10):5023-9
- ⁴⁴ Jegou S, Douliez JP, Molle D, Boivin P, Marion D, Evidence of the glycation and denaturation of LTP1 during the malting and brewing process *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**; 49(10):4942-9
- ⁴⁵ Lindorff-Larsen K, Lerche MH, Poulsen FM, Roepstorff P, Winther JR, Barley lipid transfer protein, LTP1, contains a new type of lipid-like post-translational modification *The Journal of Biological Chemistry* **2001**;276(36):33547-53. Epub 2001
- ⁴⁶ Zhang, N, Jones BL, Characterization of germinated barley endoproteolytic enzymes using two-dimensional gels *Journal of Cereal Science* **1995**; 21, 145–153
- ⁴⁷ Celus I, Brijs K, Delcour JA, The effects of malting and mashing on barley protein extractability *Journal of Cereal Science* **2006**; 203–211
- ⁴⁸ Davy A, Svendsen I, Bech L, Simpson DJ, Cameron-Mills V, LTP is not a Cysteine Endoprotease Inhibitor in Barley Grains *Journal of Cereal Science* **30.1999**;237–244
- ⁴⁹ Cornell, H, Mothes T, Further studies of the in vitro activity of synthetic gliadin peptides in coeliac disease *Biochemical and Biophysical Research Communication* **1995**;Acta 1270, 168–172
- ⁵⁰ Shan L, Qiao SW, Arentz-Hansen H, Molberg Ø, Gray GM, Sollid LM, Khosla C, Identification and Analysis of Multivalent Proteolytically Resistant Peptides from Gluten: Implications for Celiac Sprue *Journal of Proteome Research* **2005**, 4, p. 1732
- ⁵¹ Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S et al, Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in celiac disease *Lancet* **2003**, 362, p.30
- ⁵² Ferranti P, Addeo F, Mamone G, Rossi M, Roepstorff P, Fierro O, Malorni A, Identification of a peptide from α -gliadin resistant to digestive enzymes: implications for celiac disease *Journal of Chromatography B* **2007**, 855, p.236-41

8. FIGURE E TABELLE

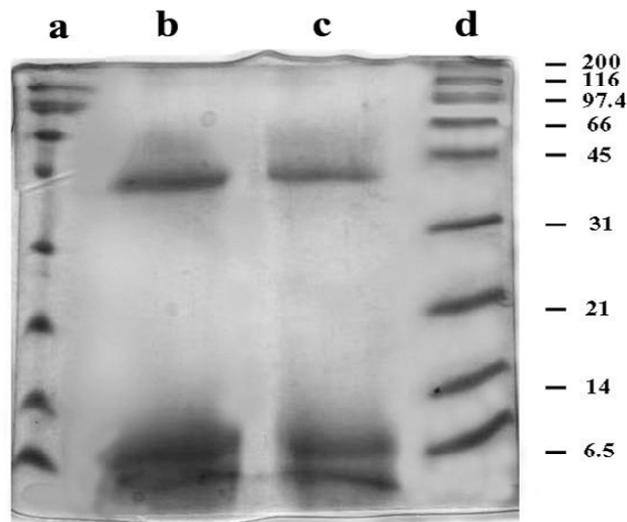


Figura 1: Separazione SDS-PAGE dei polipeptidi da campioni di birra singolmalto (b) e doppio malto (c). Le linee (a) e (d) rappresentano i range dei pesi molecolari

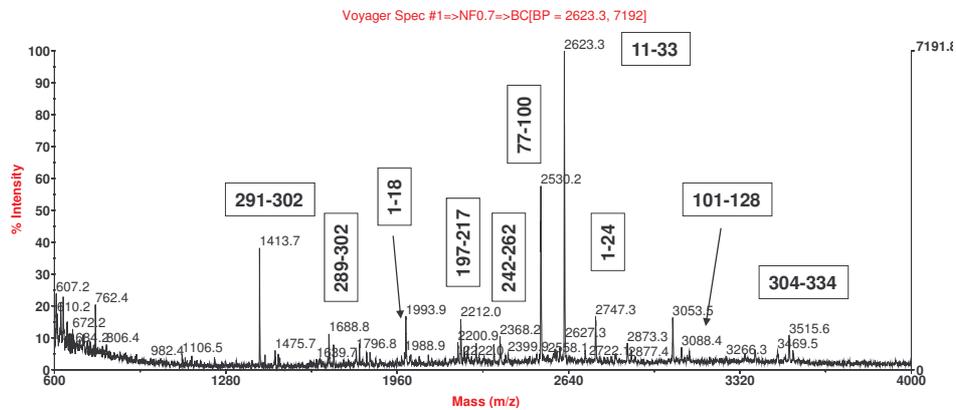


Figura 2: Identificazione della proteina Z4-barley mediante MALDI-TOF mass mapping

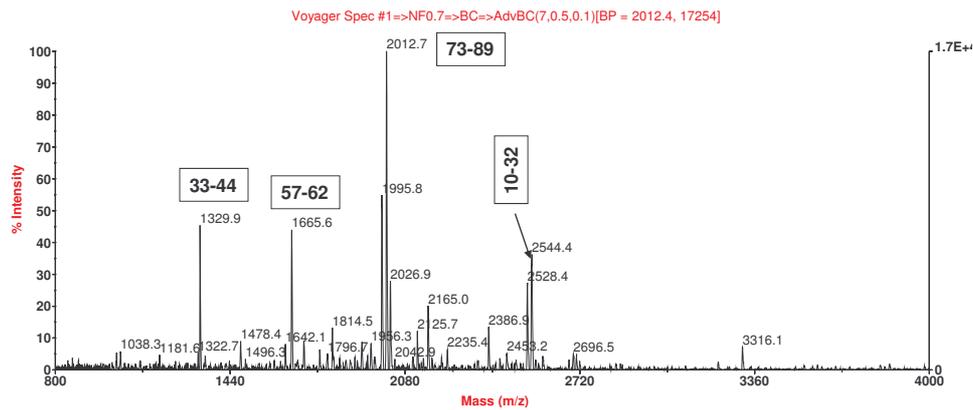


Figura 3: Identificazione della ns-LTP 1 da *Hordeum vulgare* mediante MALDI-TOF mass mapping

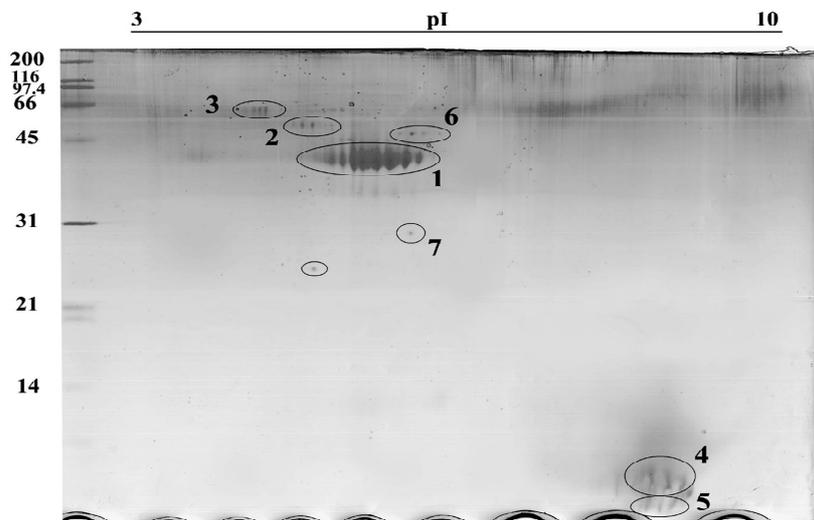


Figura 4: Separazione bidimensionale IPG-PAGE/SDS-PAGE delle proteine dalla birra singolo malto. Gli spot proteici sono stati identificati mediante MALDI-TOF mass mapping (come riportato in Tab.1)

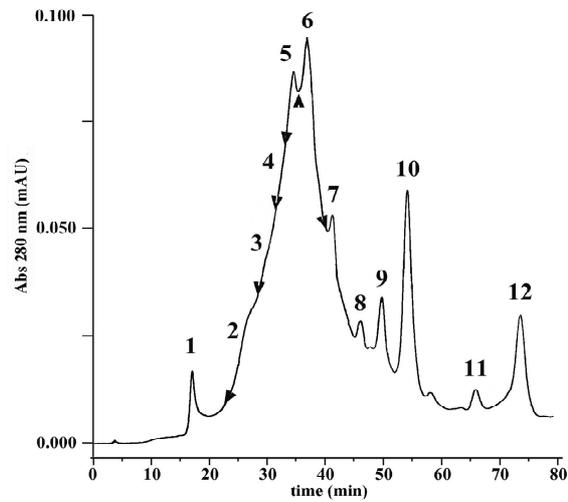


Figura 5 : SEC di polipeptidi da birra singolo malto.
 Le frazione sono state analizzate mediante SDS-PAGE dopo una fase di desalificazione. La frazione 1 conteneva la proteina Z4 e la frazione 2 la ns-LTP.

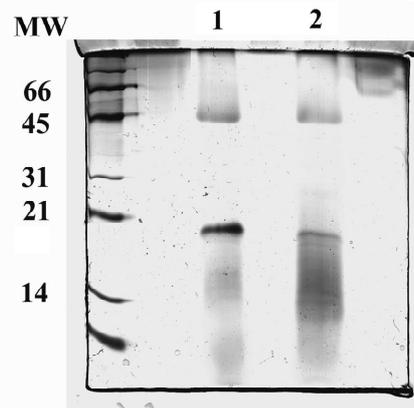


Figura 6: Colorazione al nitrato di argento della separazione SDS-PAGE di proteine dalla birra singolo malto:
 (1) frazione SEC n.1;
 (2) proteine arricchite con gel di silice.

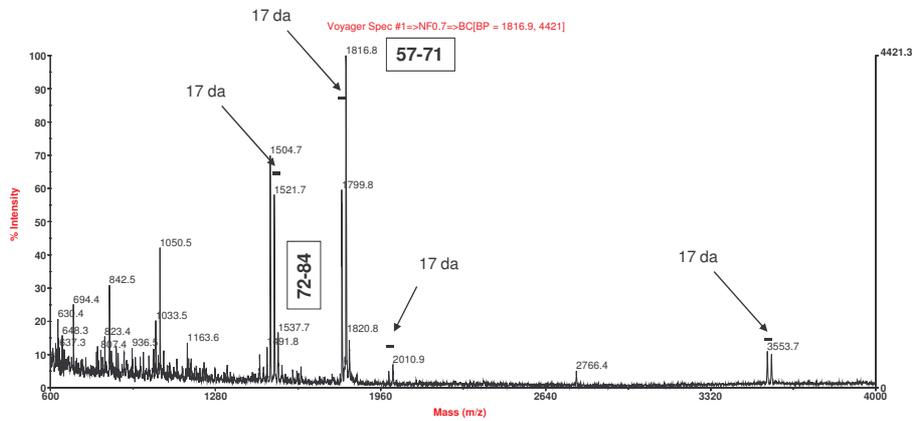


Figura 7: MALDI-TOF peptide mass mapping della banda proteica a 17 kDa. Le differenze di 17 sono dovute alla formazione di acido piroglutammico da peptidi con Q (o C alchilate con iodoacetammide) all'N-terminale

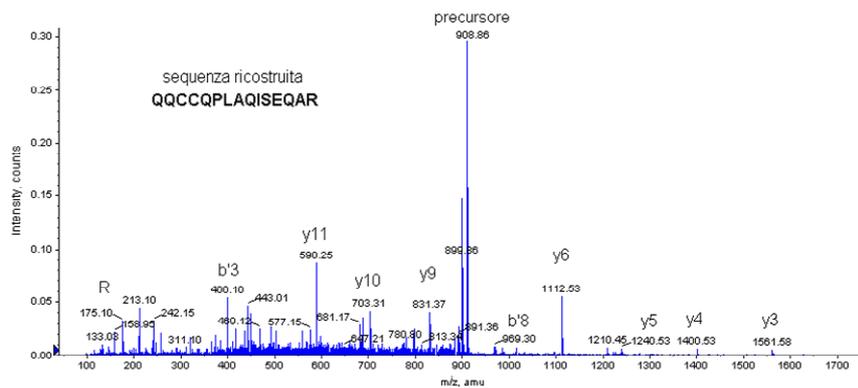


Figura 8: Frammentazione MS MS del segnale $m/z = 908.5$

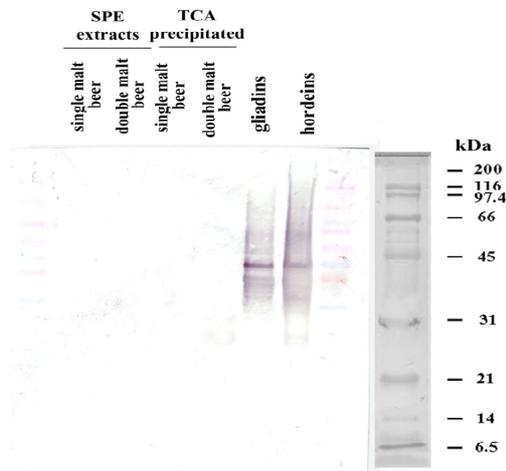


Figura 9: Immunoblotting di proteine estratte da birra utilizzando l'anticorpo monoclonale R5 (Ridascreen) come anticorpo primario, e donkey anti-rabbit Ig, coniugato alla perossidasi, come anticorpo secondario.

1 minuto di esposizione

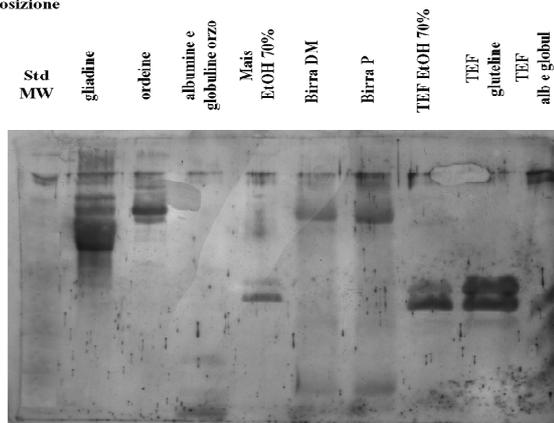


Figura 10: Immunoblotting di proteine estratte da birra utilizzando l'anticorpo antigliadina policlonale *Sigma*

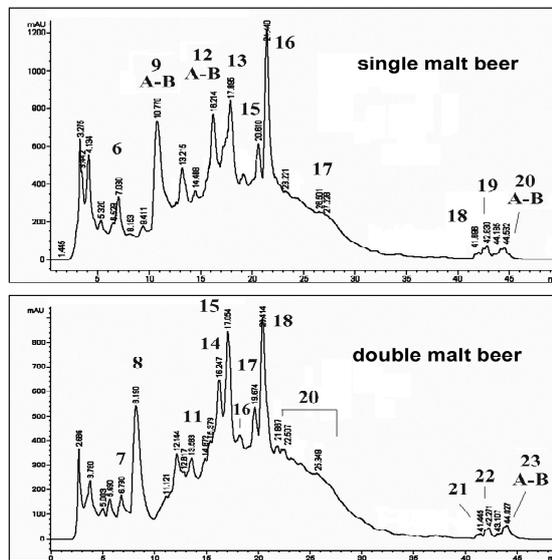


Figura 11: Separazione RP-HPLC di proteine/peptidi estratti da campioni di birra singolo e doppio malto

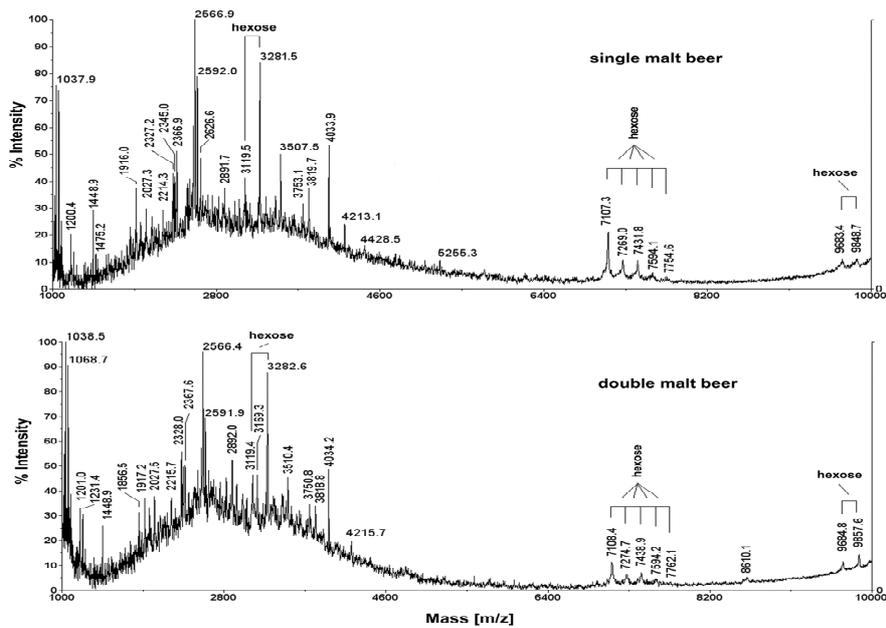


Figura 12: Spettri di massa MALDI-TOF delle miscele peptidiche

SDS-PAGE (GRADIENT) OF THE PROTEIN FRACTIONS FROM BEER

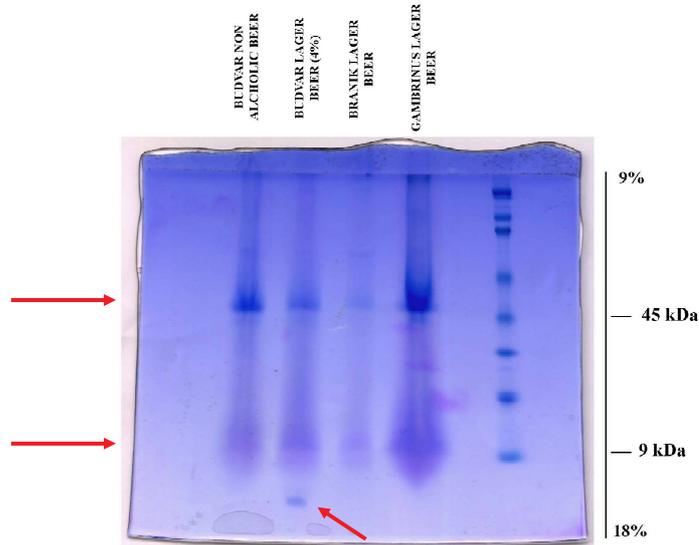


Figura 13: analisi SDS-PAGE in gradiente di poliacrilammide di estratti proteici SPE da birre estere

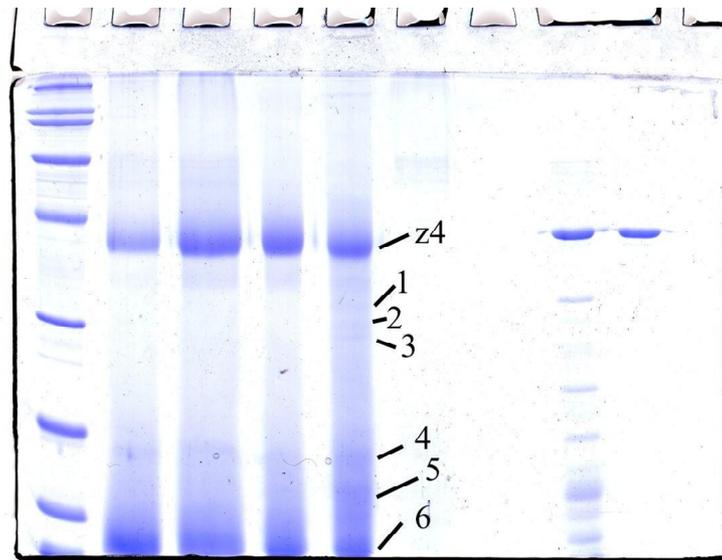


Figura14: SDS-PAGE di cinque birre: Peroni Doppio Malto, Peroni (prodotta con il 20% di mais), Carlsberg, Weisse (birra di frumento), Riedenburger (birra gluten-free)

Tabella 1

SPOT	IDENTIFICATI ON	Accession number	Mr (kDa)	pI
Water-soluble proteins from barley				
1	Protein Z4	P06293	43.27	5.72
2	Protein Z4	P06293	43.27	5.72
3	Protein Z-type serpin	CAA66232.1	43.19	5.85
4	LTP1	P07597	9.69	8.19
5	LTP2	P20145	6.98	6.98
Proteins from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
6	Enolase 2	P00925	46.63	6.04
7	Triosephosphate isomerase	P00942	26.79	5.74

IDENTIFICAZIONE PEPTIDI DELLA BIRRA MEDIANTE LC-ESI MS/MS

Tabella 2

PROTEIN IDENTIFICATION	PEPTIDE MW	PEPTIDE SEQUENCE	POSITION
E13 <i>Hordeum vulgare</i> (BARLEY) H354 2	956.4637	(G)MGLSPNPLE(G)	9-17
γ -3 HORDEIN (<i>Hordeum chilense</i>)	432.2407	(H)AIVM(Q)	9-12
γ -3 HORDEIN (<i>Hordeum chilense</i>)	772.4694	(R)SLVIQTL(P)	63-69
γ -3 HORDEIN (<i>Hordeum chilense</i>)	839.3774	(F)PQQDPQQ(Q)	34-40
γ -3 HORDEIN (<i>Hordeum chilense</i>)	861.3981	(L)IQPESQQQ(Q)	47-53
β -HORDEIN (<i>Hordeum brevisubulatum</i> subsp. <i>turkestanicum</i>)	839.3813	(F)PQQPVPQ(Q)	39-45
β -HORDEIN (<i>Hordeum vulgare</i>)	933.5032	(F)LQPHQIAQ(L)	11-18
β -HORDEIN (<i>Hordeum vulgare</i>)	571.2966	(R)GVGSPVGV(V)	236-242
β -HORDEIN (<i>Hordeum vulgare</i>)	1248.7230	(Q)VQIPFVHPSIL(Q)	37-47
β -HORDEIN (<i>Hordeum vulgare</i>)	1376.7816	(Q)VQIPFVHPSIL(Q)	37-48
β -HORDEIN (<i>Hordeum vulgare</i>)	1661.7837	(Q)pyrQQPYPQPOQPPQ(Q)	64-77
LTP 1 (<i>Hordeum vulgare</i>)	893.4719	(R)GIHNLNLN(N)	57-64
LTP 1 (<i>Hordeum vulgare</i>)	478.2427	(S)VPYT(I)	76-79
LTP 1 (<i>Hordeum vulgare</i>)	1236.6208	(R)GIHNLNLNNAAS(I)	57-68
LTP 1 (<i>Hordeum vulgare</i>)	658.3137	(T)ISPDI(C)	81-86
α -amylase/trypsin inhibitor C1CH ₂ /MeOH-soluble protein (CMe) (<i>Hord. vulgare</i>)	1031.5511	(G)DALPHNPLR(A)	33-41
β 1-HORDEIN (<i>Hordeum vulgare</i>)	554.3064	(Q)TLPQ(G)	23-27
β 1-HORDEIN (<i>Hordeum vulgare</i>)	823.4188	(G)QPPQVPQ(S)	128-134
Putative glu-decarboxylase (<i>Hord. vulgare</i>)	586.2962	(S)KDDL(P)	229-233
P-type ATPase (<i>Hordeum vulgare</i>)	558.3312	(V)TVVLQ(V)	518-522
α -amylase/trypsin inhibitor C1CH ₂ /MeOH- soluble (CMd) protein (<i>Hord. vulgare</i>)	760.4120	(A)FPTNLLG(H)	27-33
S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (<i>Hordeum chilense</i>)	920.4483	(I)FPGAQPAPH(R)	120-128
γ -3 HORDEIN (<i>Hordeum vulgare</i>)	602.3428	(A)FVLPQ(Q)	241-245

QQPP
PQPY
QQPP

Tabella 3

Single-malt beer		Double-malt beer	
Chromatographic fraction (RT)	Gliadin content, ng	Chromatographic fraction	Gliadin content, ng
6 (7.03 min)	< 0.0005	7 (6.79 min)	< 0.0005
/	/	8 (8.19 min)	< 0.0005
10 (13.21 min)	< 0.0005	11 (13.58 min)	< 0.0005
12 (16.21 min)	< 0.0005	14 (16.25 min)	< 0.0005
/	/	15 (17.05 min)	< 0.0005
13 (17.89 min)	0.0021	16 (18.21 min)	< 0.0005
/	/	17 (19.67 min)	< 0.0005
15 (20.61 min)	> 0.004	18 (20.41 min)	0.0031
16 (21.44 min)	> 0.004	20 (22.50 min)	> 0.004
17(26.50 min)	> 0.004	/	/
18 (41.70 min)	0.00061	21 (41.44 min)	< 0.0005
19 (42.83 min)	0.00067	22 (42.27 min)	< 0.0005
20A (44.16 min)	0.00105	23A (43.11 min)	< 0.0005
20B (44.50 min)	< 0.0005	23B (43.03 min)	< 0.0005

Contenuto in epitopi responsivo:
5.46 ppm S.M
< 5 ppm DM

Sample name	Gliadin content, ppm)	
	Italy	Czech Republic
Nastro Azzurro	7.5	2.0
Splügen	12.6	5.0
Wührer	13.6	2.7
Peroni	10.4	3.0
Budweiser ^b	n.d. ^a	0.8
Dreher	5.0	2.5
Falter	3.2	1.6
Heineker	8.2	3.0
Ichnusa	11.5	3.6
Kronenbourg	12.1	4.3
Menabrea	32.4	11.5
Tuborg	11.8	4.6
Von Wunster	8.4	4.5
Budvar non alcoholic	n.d. ^a	0.8
Budvar lager (5%)	n.d. ^a	0.7
Budvar lager (4%)	2.8	1.0
Branik lager	3.6	1.4
Gambrinus lager	5.1	3.5
Gambrinus low sugar	n.d. ^a	2.0
Kozel lager beer	4.7	5.0
Kozel Premium lager	7.7	2.7
Kozel dark	10.3	3.0

Tabella 4

Determinazioni con ELISA classico (sandwich) COMMERCIALE da differenti laboratori

ITALY	Gliadin
PERONI	10.4
DOPPIO MALTO	< 2.5

