

MARCO GOBBETTI*

Il paradosso: l'antica biotecnologia del *lievito naturale* per fronteggiare l'emergenza dell'intolleranza al glutine

Lettura tenuta il 4 luglio 2013

I. LA MALATTIA CELIACA

L'intolleranza al glutine o malattia celiaca (MC) è un'enteropatia immuno-mediata, dovuta all'ingestione di prodotti alimentari, contenenti glutine, in soggetti geneticamente predisposti. Tale definizione riassume le caratteristiche principali della patologia, quali la genesi autoimmunitaria del disturbo, la necessità di possedere un corredo genetico predisponente e la glutine-dipendenza del disordine (Francavilla e Catassi, 2010). La prima descrizione della malattia fu opera di Samuel Gee nel 1888, il quale osservò i classici sintomi, diarrea e arresto della crescita, e ipotizzò che la causa di tale indigestione cronica fosse legata all'alimentazione. Da allora, le conoscenze sulla MC sono notevolmente mutate e, ora, è conclamata come una malattia sistemica, a patogenesi autoimmune, le cui manifestazioni cliniche sono molto variabili. La celiachia può presentarsi a qualsiasi età e, talvolta, può essere clinicamente silente (Francavilla e Catassi, 2010). In base alla presentazione clinica e alle alterazioni istologiche e immunologiche al momento della diagnosi, sono state a lungo riconosciute quattro forme cliniche della MC: classica o tipica, atipica, silente e latente o potenziale (Francavilla e Catassi, 2010). Recentemente, la classificazione è stata modificata, introducendo una nomenclatura più semplice e chiara, con la quale sono distinti tre modi di presentazione clinica: MC maggiore, MC minore e MC silente (Di Sabatino e Corazza, 2009).

L'impiego di migliorate tecniche diagnostiche e la disponibilità di test sierologici (anticorpi anti-endomisio e anti-transglutaminasi) altamente efficienti hanno consentito un'accurata definizione della prevalenza della MC. I test

* Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari Aldo Moro

AREA GEOGRAFICA	PREVALENZA SULLA BASE DELLA PRESENZA DI MANIFESTAZIONI CLINICHE	PREVALENZA SULLA BASE DI SCREENING
Brasile	?	1:400
Danimarca	1:10,000	1:500
Finlandia	1:1000	1:67 (1:99)
Germania	1:2300	1:500
Italia	1:1000	1:184
Olanda	1:4500	1:198
Norvegia	1:675	1:250
Sahara	?	1:70
Slovenia	?	1:550
Svezia	1:330	1:190
Regno Unito	1:300	1:112
Stati Uniti d'America	1:10,000	1:111
Popolazione mondiale	1:3345	1:266

Tab. 1 *Prevalenza della malattia celiaca (MC) nelle differenti aree geografiche (adattata da Francavilla e Catassi, 2010)*

sierologici consentono l'identificazione dei casi in cui sono necessarie indagini più approfondite (biopsie), mirate alla definizione della diagnosi. In età pediatrica, è stimato che la prevalenza della MC possa variare da 1:285 a 1:77 in Svezia o da 1:230 a 1:106 in Italia. Una simile prevalenza è riscontrata in altre popolazioni di origine prevalentemente europea, quali quelle residenti in Nuova Zelanda, Australia, Argentina e Israele. Negli Stati Uniti, la prevalenza nella popolazione pediatrica è pari a ca. 1:100 e recenti dati epidemiologici mostrano una simile frequenza nella popolazione adulta. La tabella 1 mostra la prevalenza della MC nei vari Paesi. A oggi, è stimato che per ogni diagnosi di MC vi siano da 3 a 7 casi non diagnosticati, e che il 3% della popolazione Europea e Nord Americana possa sviluppare la MC nel corso della vita (Francavilla e Catassi, 2010).

2. IL GLUTINE

Il glutine, assente come tale nelle farine di frumento e di altri cereali, è un reticolo proteico che si forma durante la fase d'impastamento con acqua, per interazione tra gliadine e glutenine. Tali proteine di riserva sono particolarmente ricche di due aminoacidi, prolina e glutammina. La prolina è l'unico degli aminoacidi naturali ad avere una struttura ciclica che impone restrizioni steriche ai legami peptidici di cui esso fa parte, rendendoli particolarmente

resistente ai processi d'idrolisi. Una volta ingerito, il glutine è soggetto a un processo digestivo che non completa la sua idrolisi, a causa della mancanza a livello intestinale di enzimi con specifica attività prolil-endoropeptidasica. Il glutine è, quindi, degradato in prodotti d'idrolisi intermedi, peptidi di medie/piccole dimensioni, alcuni dei quali presentano attività immunogenica per i soggetti predisposti allo sviluppo di MC (Francavilla e Catassi, 2010). Dei peptidi generati in seguito alla parziale idrolisi digestiva, uno, in particolare, è considerato il principale responsabile dello sviluppo della lesione glutine-dipendente, il 33-mer. Tale peptide immuno-dominante, costituito da 33 aminoacidi (frammento 57-89 della α -gliadina), presenta un'eccezionale resistenza all'azione proteolitica degli enzimi digestivi e contiene tre distinti epitopi (PFPQPQLPY, PQPQLPYPQ e PYPQPQLPY) capaci di stimolare la risposta auto-immunitaria (Shan et al., 2002). Alcuni dei potenziali epitopi tossici che si possono generare dalla digestione del glutine sono elencati nella tabella 2.

3. LA DIETA SENZA GLUTINE E LE POTENZIALI ALTERNATIVE

A oggi, l'unica terapia della MC è la completa esclusione dalla dieta di tutti gli alimenti contenenti glutine, quali, ad esempio, i derivati di frumento, orzo e segale. Pertanto, pasta, pane e tutti gli altri prodotti da forno convenzionali non sono ammessi nella dieta. Essi devono essere sostituiti dagli corretti dieto-terapeutici contrassegnati dal marchio spiga barrata, indicante l'assenza di glutine. La dieta senza glutine (*gluten-free diet*, GFD) o aglutinata, introdotta dal pediatra olandese Dicke all'inizio degli anni '50, favorisce la graduale normalizzazione della mucosa intestinale, la scomparsa nel sangue degli anticorpi presenti in fase di malattia attiva e la remissione dei sintomi presenti prima della diagnosi. Il trattamento con GFD deve essere rigoroso e continuo per tutta la vita (Francavilla e Catassi, 2010). Per mantenere un apporto di glutine inferiore a 10 mg al giorno, come raccomandato dalla GFD, è opportuno consumare prodotti dieto-terapeutici, il cui limite massimo di glutine contaminante sia di 20 ppm, pari a 20 mg per kg di prodotto alimentare. L'elenco dei cereali e pseudo-cereali ammessi nella GFD è riportato nella tabella 3.

Monotonia della dieta, proprietà organolettiche notevolmente inferiori rispetto alla controparte dei prodotti a base di glutine, rifiuto della dieta, soprattutto negli adolescenti, in particolare per quanto concerne il consumo alimenti socializzanti (es. pizze, panini, dolci, merendine), eccessi calorici e squilibri nutrizionali, riguardo al consumo di fibre e all'assunzione di alcune

SEQUENZE AMINOACIDICHE	POSIZIONE	IMMUNOGENICITÀ
VRVPVQLQPQNPSQQQPQ	α-gliadina: 1–19	+
QNPSQQQPQEQQVPLVQQQ	α-gliadina: 11–28	+
QVPLVQQQQFPGQQQFPFPQ	α-gliadina: 21–40	+
PGQQQFPFPQQPYQPQPF	α-gliadina: 31–49	+
FPGQQQFPFPQQPYQPQPF	α-gliadina: 30–49	+
QPYQPQFPFPQQPYLQL	α-gliadina: 41–58	+
PQPFPQQPYLQLQFPFQ	α-gliadina: 46–63	+
PQPQLPYQPQLPY	α-gliadina: 62–75/(a)	+ / + + +
QLQFPFPQQLPY	α-gliadina: 57–68 (a)	+ / + + +
QLQFPFQ	α-gliadina: 57–63 (a)	+ + +
LQLQFPFPQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF	α-gliadina: 57–89/(a)	+ / + + +
QLQFPFPQQLPY	α-gliadina: 58–69/(a)	+ / + + +
PQPQLPYQPQLPY	α-gliadina: 63–76/(a)	+ / + + +
PFRPQQPYQPQPF	α-gliadina: 93–106 (a)	+
LIFCMDVVLQ	α-gliadina: 123–132	+
QQPLQQYPLGQGSFRPSQQNPQAQG	α-gliadina: 198–222	+
QYPLGQGSFRPSQQNPQA	α-gliadina: 203–220/(a)	+ / +
PSGQGSFQPS	α-gliadina: 205–214	–
PSGQGSFQPSQQ	α-gliadina: 205–216/(a)	+ / + + +
SGQGSFQPSQQN	α-gliadina: 206–217/(a)	+ / + + +
QGSFQPSQQN	α-gliadina: 208–217/(a)	– / + + +
LQPQQFPFPQQPYQPQPF	γ-gliadina: 60–79	+
FPQQPQQPYQPQPF	γ-gliadina: 66–78	+
FSQPQQQFPFPQ	γ-gliadina: 102–113/(a)	– / +
OQPQQSFPEQQ	γ-gliadina: 134–153/(a)	+ / + + +
VQGQGIIQPQQPAQL	γ-gliadina: 222–236/(a)	+ / +
QQQQPFPSPQQSPFSQQQQ	Glutenina: 40–59/(a)	– / +
QQPFPSPQQQLPLQ	Glutenina: 46–60/(a)	– / +
SGQGQRPGQWLQPGQGQQGYPTSPQQSGQGQLGQ	Glutenina: 707–742/(a)	+ / +
PGQGQQGYPTSPQQSGQ	Glutenina: 719–736	+
GYPTSPQQSGQGQQLGQ	Glutenina: 725–742	+
GYPTSPQQSG	Glutenina: 725–735	+
QGYPTSPQQS	Glutenina: 724–734/(a)	+ –
QQGYPTSPQQSG	Glutenina: 723–735	+
GQQGYPTSPQQSG	Glutenina: 722–735	+
GQQGYPTSPQQS	glutenina: 722–734	+

Tab. 2 *Epitopi generati durante la digestione del glutine e responsabili della malattia celiaca (MC) (adattata da Francavilla e Catassi, 2010)*

vitamine, limitazioni sul piano psico-sociale, per quanto concerne l'alimentazione fuori casa, e presenza di fonti insospettabili di glutine (es. farmaci, creme, gelati, salse, insaccati) sono alcuni dei fattori che rendono decisamente

Cereali che devono essere evitati Frumento (spelt, kamut, semolino, triticale), segale, orzo (anche maltato).
Cereali o pseudo-cereali permessi Riso, amaranto, grano saraceno, mais, miglio, quinoa, teff, avena.
Fonti di amidi senza glutine che possono essere utilizzate come alternativa alla farina di frumento Farina di cereali: amaranto, grano saraceno, mais (polenta), miglio, quinoa, teff, riso (raffinato e non, basmati, jasmine, indiano). Tuberi: maranta, jicama, patata, tapioca. Legumi: ceci, lenticchie, fagioli, piselli, arachidi, soia. Noci: mandorla, noce, castagna, nocciola, anacardio. Semi: girasole, lino, zucca.

Tab. 3 *Cereali e pseudo-cereali e dieta senza glutine (adattata da Francavilla e Catassi, 2010)*

impegnativo seguire rigorosamente la GFD. Non sorprende, pertanto, che la ricerca sia orientata verso l'individuazione di possibili strategie alternative al trattamento GFD.

In quest'ottica è stata proposta una terapia enzimatica a base di prolil-endopeptidasi (PEP) esogene (glutenasi), di origine batterica, fungina o vegetale, con lo scopo di ottenere la completa digestione del glutine e l'eliminazione degli epitopi più immunogenici (es. 33-mer), prima che essi attraversino la barriera intestinale (Shan et al., 2004; Stepniak e Koning, 2006; Stepniak et al., 2006). Sebbene alcuni risultati preliminari su sistemi modello siano stati promettenti, la stabilità delle glutenasi a livello gastrointestinali e, soprattutto, l'incompatibilità del tempo necessario per l'idrolisi degli epitopi (troppo lungo) con quello di una normale digestione non hanno ancora prodotto conferme circa l'efficacia e sicurezza di questa terapia enzimatica sostitutiva (Greco et al., 2011).

La modulazione della permeabilità intestinale rappresenta un'altra possibilità, la quale ha destato notevole interesse sia nell'ambito della MC e sia per altre patologie di natura autoimmune. Le alterazioni della permeabilità intestinale nel celiaco in fase florida costituiscono un momento essenziale nel meccanismo della patogenesi. In tale ambito, sono state avviate sperimentazioni su un inibitore del rilascio di zonulina, in grado di prevenire il conseguente aumento di permeabilità paracellulare. Dopo una valutazione positiva su modelli animali con autoimmunità diabetica (Watts et al., 2005), la sperimentazione ha presentato alcune limitazioni durante le prove cliniche condotte sull'uomo (Geco et al., 2011).

Altre possibilità terapeutiche, tuttora in fase di valutazione, sono rappresentate dall'inibizione del legame dei peptidi derivati dal glutine alle molecole HLA (*Human Leucocyte Antigens*) (cosiddetta vaccinazione) e dall'inibizione selettiva della tTG (*tissue Transglutaminase*) (Sollid e Khosla, 2005). Il ruolo importante dell'immunità innata nella patogenesi della MC potrebbe, inol-

tre, aprire la strada ad approcci che blocchino tale via, come la sintesi di anticorpi diretti contro l'IL 15 (*Interleukin 15*) (Francavilla e Catassi, 2010). Un'ulteriore e interessante prospettiva può essere rappresentata dalla terapia antigenica, mediante l'impiego di epitopi immunodominanti, in grado di ripristinare la tolleranza nei confronti del glutine (Larche e Wraith, 2000).

4. IL LIEVITO NATURALE

La storia dei prodotti lievitati da forno, al pari di altri alimenti tradizionali, ha seguito l'intero arco dello sviluppo della civiltà dell'uomo, dalla preistoria all'epoca attuale. Il pane e gli altri alimenti derivanti da impasti di cereali fermentati e cotti sono prodotti che racchiudono in sé diversi saperi, dalle tecniche della coltivazione, raccolta e trasformazione delle granelle, a quelle della preparazione e fermentazione degli impasti, della cottura e conservazione dei lavorati (Di Giandomenico, 2010). Secondo tradizione, l'agente fermentante impiegato per la produzione di lievitati da forno è il *lievito naturale* e cioè, un impasto di farina (grano e/o segale), acqua ed eventualmente sale, fermentato, senza l'intervento di microrganismi volontariamente aggiunti, e ottenuto grazie a una serie successiva di rinfreschi che hanno ottimizzato la capacità di acidificazione e lievitazione (Corsetti et al., 2010). La fermentazione è opera di lieviti e batteri lattici endogeni della farina, cui si aggiungono quelli di derivazione ambientale. Nell'ultimo decennio, numerosi studi hanno dimostrato l'elevata diversità microbica, con particolare riferimento ai batteri lattici, che contraddistingue i *lieviti naturali* impiegati per la fermentazione di prodotti da forno tradizionali (Minervini et al., 2010). I batteri lattici sono, quindi, i microrganismi che dominano nel *lievito naturale* e che maggiormente determinano la qualità sensoriale, reologica e nutrizionale dei prodotti lievitati da forno (Gobbetti et al., 2010). Recenti studi condotti mediante tecniche di sequenziamento di nuova generazione (pirosequenziamento) (Ercolini et al., 2013), hanno caratterizzato l'ecologia microbica durante la preparazione del *lievito naturale*. Le farine di frumento o segale e, quindi, l'impasto in precedenza alla prima fermentazione, sono fortemente contaminati da un'eterogenea popolazione batterica, metabolicamente attiva e appartenente principalmente ai generi *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Enterobacter*, *Erwinia* e *Sphingomonas*. La presenza dei batteri lattici, in queste condizioni, è notevolmente minoritaria. Immediatamente, dopo un giorno di propagazione (es. 8 h a 25°C), la popolazione maggioritaria è completamente inibita, in

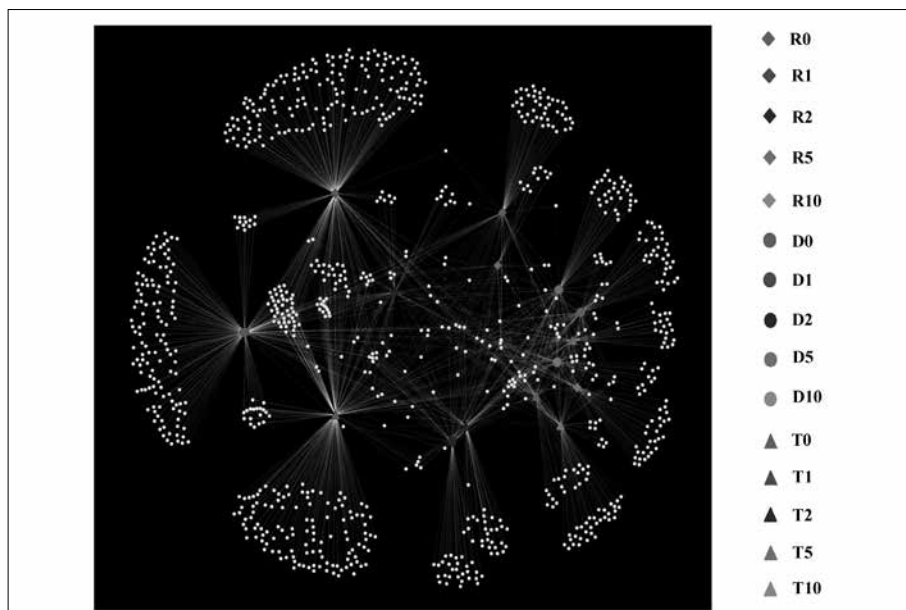


Fig. 1 Rappresentazione del network microbico durante la preparazione di lievito naturale basata su analisi di pirosequenziamento (RNA). I campioni riportati in figura corrispondono a lieviti naturali di segale (R), grano duro (D) e grano tenero (A) prima della fermentazione (R0, D0, A0) e durante il processo di preparazione dopo 1 (R1, D1, A1), 2 (R2, D2, A2), 5 (R5, D5, A5) e 10 (R10, D10, A10) giorni. Adattata da Ercolini et al. 2013

favore del phylum *Firmicutes*, già rappresentato, quasi esclusivamente, da diversi generi di batteri lattici. Il processo di acidificazione lattica, nonché la versatilità metabolica e l'adattamento alle condizioni ambientali di processo da parte dei batteri lattici, sono i principali fattori in grado di determinare il rapido mutamento dell'ecologia microbica del *lievito naturale*. Successive fermentazioni determinano una sequenza di specie di batteri lattici, fino a raggiungere una maturità e costanza delle proprietà del *lievito naturale* (fig. 1), almeno in termini tecnologici (Ercolini et al., 2013). Sebbene siano state identificate specie appartenenti ai generi *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Weissella* e *Leuconostoc* (Gobbetti et al., 2010), i batteri lattici più frequentemente isolati e impiegati nel *lievito naturale* appartengono al genere *Lactobacillus*, con specie, in alcuni casi, tipiche di questo ecosistema. Nelle condizioni ottimali d'impiego, i batteri lattici, originati in seguito a tale selezione naturale, operano il metabolismo dei carboidrati, delle sostanze azotate e altri meccanismi biochimici che risultano di fondamentale importanza per la qualità dei prodotti lievitati da forno.

5. IL LIEVITO NATURALE E LA DEGRADAZIONE DEL GLUTINE

Durante la fermentazione mediante *lievito naturale*, i batteri lattici sono in grado di operare una moderata idrolisi proteica, soprattutto dei peptidi originati dalle proteine del grano e della segale, favorendo la liberazione di aminoacidi che contribuiscono direttamente o indirettamente, come precursori, alle caratteristiche sensoriali dei prodotti lievitati da forno (Gobbetti et al., 2010). Enfatizzare tale attitudine biochimica in condizioni di fermentazione specifiche e avere a disposizione un'ampia diversità di batteri lattici, sulla base della quale eseguire una selezione, sono stati gli elementi presi in considerazione in un primo studio volto, appunto, a verificare la capacità di degradazione del glutine durante i processi di trasformazione alimentare (Di Cagno et al., 2002).

5.1 I primi risultati

Un pool di batteri lattici, costituito dalle specie *Lactobacillus alimentarius* 15M, *Lactobacillus brevis* 14G, *Lactobacillus sanfranciscensis* 7A e *Lactobacillus hilgardii* 51B, fu dapprima selezionato sulla base della capacità di degradare polipeptidi appartenenti alla classe delle gliadine. Una preparazione enzimatica, derivante dai lattobacilli selezionati, si mostrò in grado di idrolizzare il frammento 31-43 della α -gliadina, un epitopo responsabile della MC. Saggi di agglutinazione *in vitro* mediante l'impiego di un digesto peptico/triptico di gliadina confermarono la parziale capacità di degradare il glutine (Di Cagno et al., 2002). Un successivo studio (Di Cagno et al., 2004), condotto con lo stesso pool di batteri lattici selezionati, dimostrò la capacità di degradare completamente anche l'epitopo 33-mer. Pane, contenente ca. 2 g di glutine, e fermentato con i microrganismi selezionati, fu completamente tollerato da individui celiaci in remissione, come mostrato mediante sperimentazione *in vivo* di tipo acuto, basata su saggi di permeabilità intestinale. Tali risultati preliminari indussero a ipotizzare che un'antica biotecnologia, quale quella del *lievito naturale*, basata sull'impiego di batteri lattici selezionati in funzione dell'attività peptidasica, fosse in grado di operare una sostanziale degradazione del glutine durante la trasformazione dei prodotti lievitati da forno. Sulla base di questi incoraggianti risultati, seguirono altre ricerche indirizzate alla degradazione del glutine in matrici a base di segale (De Angelis et al., 2006a), all'applicazione del protocollo messo a punto su grano duro per la produzione di pasta alimentare (Di

Cagno et al., 2005) e all'impiego di preparazioni probiotiche, anch'esse contenenti batteri lattici dotati di intensa attività peptidasica (De Angelis et al., 2006b).

Nonostante la sostanziale capacità del pool di lattobacilli selezionati di degradare il glutine, la quantità residua di tale proteina rimase ben al di sopra (ca. 2500 ppm) di quella ammissibile per la dieta senza glutine (20 ppm).

5.2 *La completa degradazione del glutine e il meccanismo d'idrolisi*

Come largamente dimostrato per altre proteine alimentari (es. caseine), il meccanismo di degradazione del glutine avviene in due fasi successive. L'evento iniziale di proteolisi primaria, prevalentemente operato da proteinasi, genera polipeptidi di varie dimensioni che rappresentano il substrato per un sistema di peptidasi, molto complesso in considerazione della composizione amminoacidica del glutine, in grado di condurre alla liberazione di singoli aminoacidi (proteolisi secondaria) (Gaenzle et al., 2008). In condizioni convenzionali di trasformazione, sono le proteinasi endogene dei cereali, attivate dal decremento di pH causato dal processo di acidificazione lattica, a determinare l'evento di proteolisi primaria. Mentre i batteri lattici, in generale, non sono caratterizzati da una rilevante attività proteinasica, essi, funzionalmente al loro meccanismo di approvvigionamento di sostanze azotate, presentano una complessa e intensa attività peptidasica. Sulla base di queste considerazioni e dei risultati acquisiti nelle precedenti sperimentazioni, una nuova strategia biotecnologica fu standardizzata alcuni anni orsono (Rizzello et al., 2007). Il pool di batteri lattici selezionati fu implementato, aggiungendo alle 4 specie precedentemente selezionate (Di Cagno et al., 2002), 6 biotipi diversi appartenenti alla specie *L. sanfranciscensis*, così da rendere più completo il sistema di peptidasi funzionale alla proteolisi secondaria. L'uso (ca. 200 ppm) di proteasi fungine (*Aspergillus niger*), convenzionalmente impiegate nell'industria dei lieviti da forno per la produzione di cracker, completò la miscela con l'intento di favorire un'intensa proteolisi primaria. Saggi immunologici (R5 ELISA sandwich e competitivo), analisi elettroforetiche bidimensionali e determinazioni spettrofotometriche dimostrarono la completa degradazione del glutine fino a una concentrazione residua inferiore a 10 ppm, in assenza di qualsiasi epitopo responsabile della MC (fig. 2). Durante un periodo di fermentazione di 48 a 37°C, la degradazione delle gliadine risultò totale, persistendo ca.

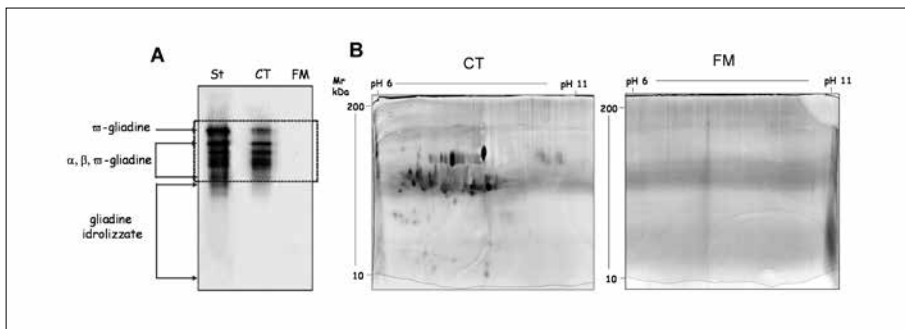


Fig. 2 Analisi immunologiche ed elettroforetiche della frazione gliadinica estratta da farina di grano tenero. Controllo (CT) e farina fermentata per 48 h a 37°C mediante il pool di batteri lattici selezionati e proteasi fungine (FM). A: R5- Western blot, B: elettroforesi bidimensionale. Adattata da Rizzello et al., 2007

il 20% della frazione delle glutenine. Al termine del processo, la frazione azotata della farina di grano fermentata era rappresentata da una miscela di peptidi di dimensioni molto piccole e, soprattutto, di aminoacidi liberi (fig. 3). Come mostrato da analisi complementari di natura immunologica, elettroforetica e spettrometrica l'efficacia del protocollo biotecnologico fu confermata su varie specie e cultivar di grano duro, orzo e segale (De Angelis et al., 2010), così come fu possibile ridurre sensibilmente i tempi di fermentazione (ca. 18 h) mantenendo la stessa attività idrolitica. Saggi *ex-vivo*, basati sulla proliferazione di linee cellulari umane (*peripheral blood mononuclear cells* – PBMCs; *intestinal T-cell lines* – iTCLs) provenienti da individui affetti da celiachia, e il rilascio di interferone gamma dimostrarono l'assenza di immunoreattività da parte del digesto triptico/peptico ottenuto dalla farina di grano fermentata secondo il protocollo biotecnologico proposto.

Verificata l'efficienza del protocollo biotecnologico, un successivo studio dimostrò il meccanismo di idrolisi degli epitopi responsabili della MC (De Angelis et al., 2010). Una volta generati in seguito ai processi digestivi o durante la proteolisi primaria del processo di trasformazione, gli epitopi, così come altri polipeptidi, sono veicolati all'interno della cellula batterica da una serie di trasportatori specifici, di cui sono provvisti i batteri lattici per soddisfare le esigenze nutritive in sostanze azotate organiche. Il trasporto è molto rapido, tale da causare una diminuzione della concentrazione extracellulare di polipeptidi di ca. 100 volte rispetto al contenuto citoplasmatico, ed efficace per derivati proteici con dimensioni di 4 – 40 aminoacidi. Nove peptidasi, caratterizzate da una diversa specificità di substrato, furono parzialmente purificate dall'estratto citoplasmatico del pool dei 10 batteri lattici del *lievito*

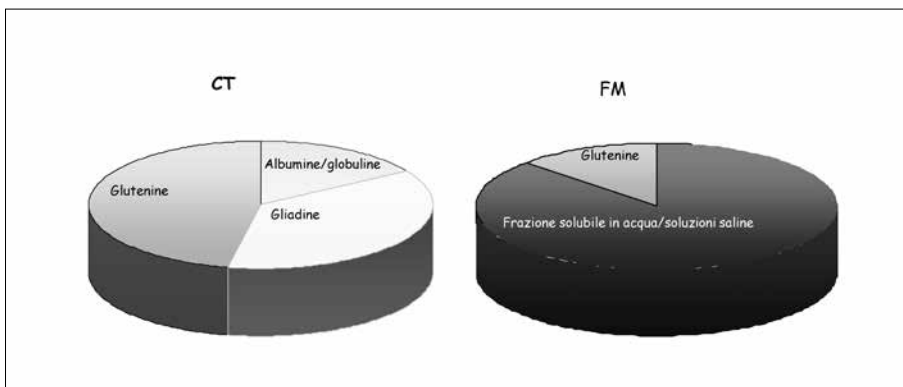


Fig. 3 Distribuzione percentuale delle frazioni proteiche estratte selettivamente da farina di grano tenero. Controllo (CT) e farina fermentata per 48 h a 37°C mediante il pool di batteri lattici selezionati e proteasi fungine (FM). Adattata da Rizzello et al., 2007

naturale. Tale sistema di peptidasi fu, quindi, impiegato per la degradazione *in vitro* dell'epitopo 33-mer. L'idrolisi complementare a opera di almeno tre peptidasi (aminopeptidasi generale di tipo N [PepN], X-prolil dipeptidil amino peptidasi [PepX] e l'endopeptidasi di tipo PepO) sono necessarie per causare la completa detossificazione dell'epitopo 33-mer, senza generazione di altri peptidi immunogenici a esso correlati. Dopo 14 h di incubazione, la combinazione di almeno sei diverse peptidasi è necessaria per la totale idrolisi dell'epitopo 33-mer (200 mM) in aminoacidi (fig. 4). Come dimostrato mediante analisi spettrometriche, gli stessi risultati furono ottenuti nei confronti di altri epitopi immunogenici, quali i frammenti 57-68 della α 9-gliadina, 62-75 dell'A-gliadina e 134-153 della α -gliadina. Quando il sistema di peptidasi fu usato per la fermentazione di semola di grano duro, la concentrazione residua di glutine fu inferiore a 2 ppm.

5.3 La sperimentazione clinica

Standardizzato il protocollo biotecnologico per la completa degradazione del glutine, dimostrato il meccanismo d'idrolisi, e avendo avuto molteplici evidenze dell'assenza di tossicità su sistemi *in vitro* ed *ex vivo*, iniziò la sperimentazione clinica.

Farina di grano tenero fu sottoposta a fermentazione mediante il pool di batteri lattici selezionati, integrato con gli enzimi proteolitici di origine fungina, verificando mediante test ELISA, al termine del trattamento, un con-

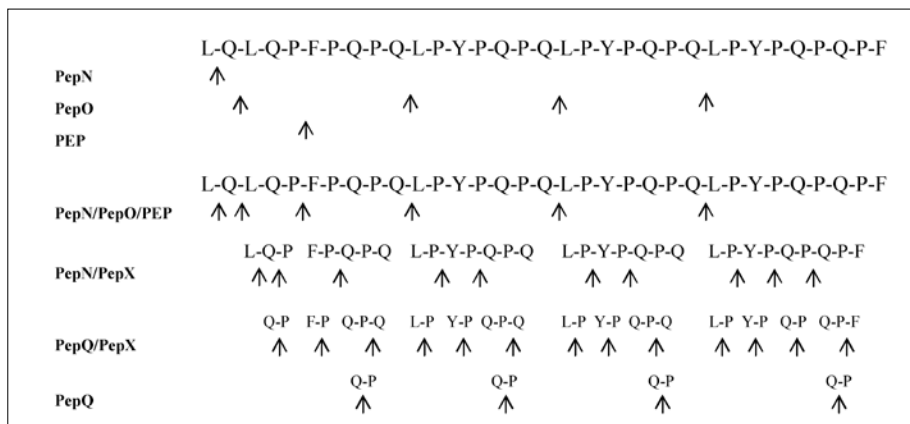


Fig. 4 Rappresentazione schematica della sequenza d'idrolisi dell'epitopo 33-mer mediante peptidasi purificate dal pool di batteri lattici selezionati. *PepN*, aminopeptidasi generica di tipo N; *PepO*, endopeptidasi; *PEP*, prolil endopeptidil peptidasi; *PepX*, X-prolil dipeptidil aminopeptidasi; *PepQ*, prolidasi. I siti d'idrolisi sono indicati dalle frecce. Adattata da De Angelis et al., 2010

tenuto in glutine residuo inferiore a 10 ppm. La farina di grano idrolizzata, dopo disidratazione, fu usata come materia prima per l'ottenimento di prodotti dolciari contenenti, tra i vari ingredienti, una concentrazione di glutine equivalente di ca. 10 g per 200 g di alimento. Il Dipartimento di Pediatria dell'Università degli Studi La Sapienza di Roma arruolò 8 individui celiaci in remissione, ai quali furono somministrati giornalmente 200 g di prodotto dolciario per un periodo continuativo di 60 gg (Di Cagno et al., 2010). Analisi ematologiche, sierologiche (IgA totale, IgG e IgA antiglutine, anticorpi endomisio e transglutaminasi tissutale IgA) e di permeabilità intestinale furono condotte durante la sperimentazione. Tutti gli individui per l'intera durata della somministrazione mostrarono valori ematologici, sierologici e, in particolare, di permeabilità intestinale (fig. 5) all'interno degli intervalli normali.

In seguito, una seconda sperimentazione clinica fu condotta presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università degli Studi Federico II di Napoli. Secondo il protocollo descritto in precedenza, anche in questo caso furono trasformati prodotti dolciari contenenti ca. 10 g di glutine equivalente per 200 g di alimento (Greco et al., 2011). Furono arruolati 15 pazienti celiaci in remissione, i quali consumarono giornalmente 200 g di prodotto dolciario in maniera continuativa per 60 gg. Indagini di tipo sierologico, ma anche di tipo immuno-istochimico e biotico furono eseguite durante questo studio. Nessuno degli individui arruolati mostrò sintomi clinici d'intolleranza, i rilievi sierologici risultarono nella norma e, soprattutto, le analisi immuno-

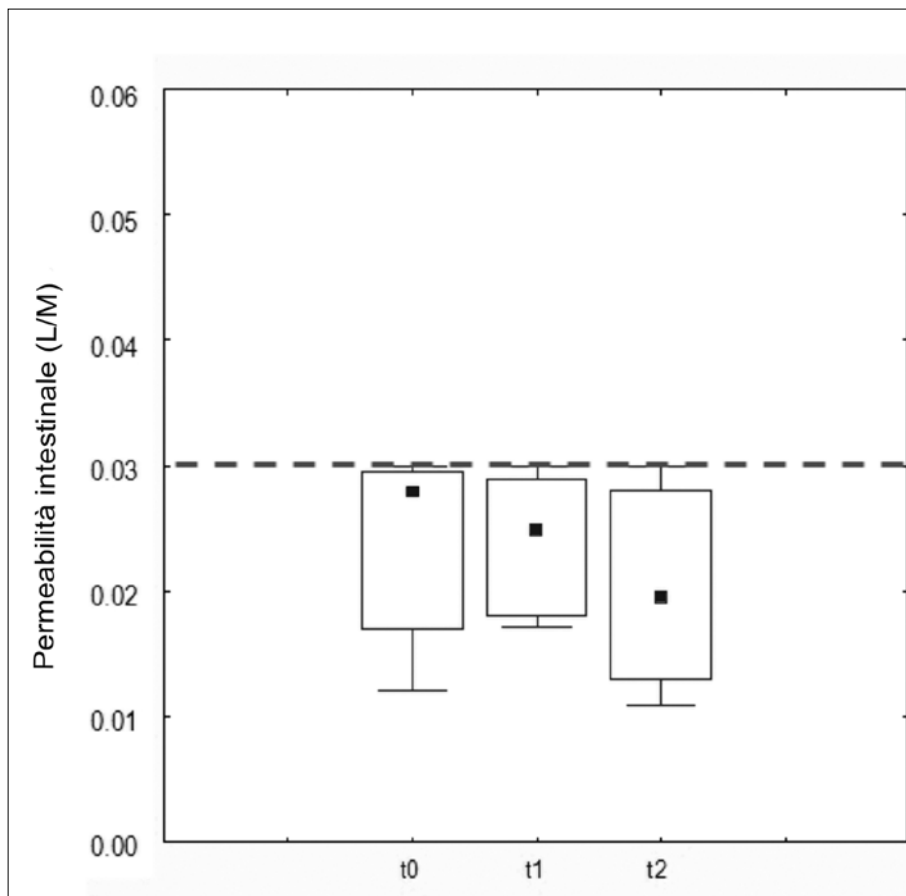


Fig. 5 Permeabilità intestinale in pazienti celiaci dopo 0 (t0), 30 (t1) e 60 (t2) giorni di sperimentazione clinica. I dati aggregati sono presentati mediante box plot. La linea centrale del box rappresenta il valore mediano (■), gli estremi superiore ed inferiore dello stesso rappresentano il 75° ed il 25° percentile della distribuzione dei dati. Gli estremi superiore e inferiore delle barre di errore rappresentano il 5° ed il 95° percentile dei dati, rispettivamente. La linea tratteggiata rappresenta il valore soglia dei soggetti sani. Adattata da Di Cagno et al., 2010

istochimiche mostrarono che il grado di Marsh, quale misura della funzionalità della mucosa intestinale, rimase immutato durante e al termine della sperimentazione (fig. 6).

In questo momento, è in corso una terza e ultima sperimentazione su un maggior numero di individui e per un tempo di somministrazione più lungo rispetto ai precedenti (6 mesi). Nel frattempo il protocollo biotecnologico è stato rilevato da un'azienda del settore e brevettato, ed è, quindi, plausibile che al termine della suddetta sperimentazione possa aver luogo la commercia-

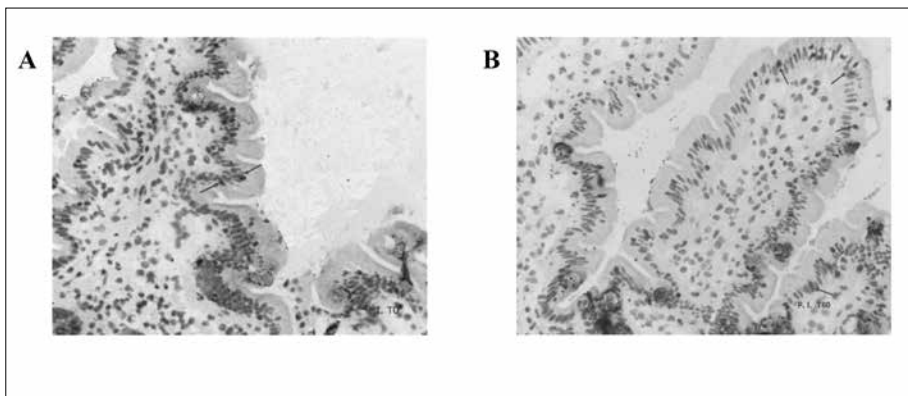


Fig. 6 *Densità dei linfociti intraepiteliali $\delta d+$ in biopsie di mucosa intestinale di un paziente celiaco all'inizio (A) e dopo 60 giorni di sperimentazione clinica (B). Adattata da Greco et al., 2011*

lizzazione di prodotti da forno per celiaci a base di farina di grano, con glutine completamente degradato.

6. CONCLUSIONI

Come inevitabile per ricerche di questo tipo, la sperimentazione descritta è stata abbastanza lunga e la fase clinica conclusiva sta per volgere al termine. Ora, l'impegno maggiore è volto alla fase d'industrializzazione del processo biotecnologico e alla standardizzazione dei processi di trasformazione, non dimenticando che anche in questo caso, come per le altre materie prime naturalmente senza glutine, si producono alimenti in assenza del reticolo proteico strutturante. Ricerche, che hanno mostrato risultati incoraggianti, sono state già divulgate (Curiel et al., 2013; Rizzello et al., 2013). Paradossalmente l'antica biotecnologia del *lievito naturale* potrebbe fronteggiare l'emergenza dell'intolleranza al glutine, e diminuire alcuni degli ostacoli di carattere sociale, nutrizionale ed economico che sono legati alla dieta priva di glutine.

RIASSUNTO

I più recenti dati epidemiologici testimoniano come la prevalenza dell'intolleranza al glutine o malattia celiaca sia in crescente aumento. Allo stato attuale delle conoscenze, l'unico efficace rimedio è rappresentato da una dieta assolutamente priva di glutine. Ciò nonostante, diverse terapie enzimatiche sono allo studio in campo medico per ovviare alla dieta priva di

glutine. La popolazione di batteri lattici che è naturalmente selezionata nel *lievito naturale* possiede la capacità, in condizioni normali d'impiego, di causare una moderata degradazione dei polimeri che compongono il glutine. Sulla base di questo presupposto, da più di dieci anni sono stati avviati alcuni studi che hanno consentito lo sviluppo di una biotecnologia a base di batteri lattici del *lievito naturale* e di proteasi fungine, usualmente impiegate nel settore dei prodotti lievitati da forno, in grado di causare la completa degradazione del glutine. Successivamente alle necessarie valutazioni analitiche e ai preliminari saggi *in vitro* ed *ex vivo*, sono state condotte sperimentazioni *in vivo*, a medio e lungo termine, su soggetti celiaci in remissione, le quali hanno dimostrato l'assoluta salubrità delle preparazioni alimentari a base di farina di grano con glutine completamente degradato.

ABSTRACT

The most recent epidemiology data show how the prevalence of the gluten intolerance or celiac disease is increasing. Currently, the only effective therapy is represented by the gluten-free diet. Nevertheless, enzyme therapies are under investigation as the alternatives to the gluten-free diet. Under conventional food processing, the lactic acid bacteria populating the traditional sourdough have the capacity to moderately degrade the polymers, which form the gluten network. Based on this property, a biotechnology, consisting of sourdough lactic acid bacteria and fungal proteases, which are routinely used for making baked goods, has been developed more than ten years ago, showing the capacity to fully degrade the gluten. Further to analytical determinations and *in vitro* and *ex vivo* assays, medium and long-term *in vivo* challenges have been carried out on celiac patients under remission. Baked goods, made with wheat flour and hydrolyzed gluten, were absolutely safe.

BIBLIOGRAFIA

- CORSETTI A., FARRIS G. A., GOBBETTI M. (2010): *Uso del lievito naturale*, in *Biotecnologia dei prodotti lievitati da forno*, a cura di GOBBETTI M., CORSETTI A., Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. 171-188.
- CURIEL J. A., CODA R., LIMITONE A., KATINA K., RAULIO M., RIZZELLO C. G., GOBBETTI M. (2013): *Manufacture and characterization of pasta made with wheat flour rendered gluten-free using fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria*, «J. Cereal Sci.», in stampa.
- DE ANGELIS M., CODA R., SILANO M., MINERVINI F., RIZZELLO C., DI CAGNO R., VICENTINI O., DE VINCENZI M., & GOBBETTI M. (2006a): *Fermentation by selected sourdough lactic acid bacteria to decrease coeliac intolerance to rye flour*, «J. Cereal Sci.», 43, pp. 301-314.
- DE ANGELIS M., RIZZELLO C. G., FASANO A., CLEMENTE M. G., DE SIMONE C., SILANO M., DE VINCENZI M., LOSITO I., GOBBETTI M. (2006b): *VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue*, «Biochim. Biophys. Acta», 1762, pp. 80-93.

- DE ANGELIS M., CASSONE A., RIZZELLO C. G., GAGLIARDI F., MINERVINI F., CALASSO M., DI CAGNO R., FRANCAVILLA R., GOBBETTI M. (2010): *Mechanism of degradation of immunogenic gluten epitopes from Triticum turgidum L. var. durum by sourdough lactobacilli and fungal proteases*, «Appl. Environ. Microbiol.», 76, pp. 508-518.
- DI CAGNO R., DE ANGELIS M., LAVERMICOCCA P., DE VINCENZI M., GIOVANNINI C., FACCIA M., GOBBETTI M. (2002): *Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance*, «Appl. Environ. Microbiol.», 68, pp. 623-633.
- DI CAGNO R., DE ANGELIS M., AURICCHIO S., GRECO L., CLARKE C., DE VINCENZI M., GIOVANNINI C., D'ARCHIVIO M., LANDOLFO F., PARRILLI G., MINERVINI F., ARENDT E., GOBBETTI M. (2004): *Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients*, «Appl. Environ. Microbiol.», 70, pp. 1088-1096.
- DI CAGNO R., DE ANGELIS M., ALFONSI G., DE VINCENZI M., SILANO M., VICENTINI O., GOBBETTI M. (2005): *Pasta made from durum wheat semolina fermented with selected lactobacilli as a tool for a potential decrease of the gluten intolerance*, «J. Agr. Food Chem. », 53, pp. 4393-4402.
- DI CAGNO R., BARBATO M., DI CAMILLO C., RIZZELLO C. G., DE ANGELIS M., GIULIANI G., DE VINCENZI M., GOBBETTI M., CUCCHIARA S. (2010): *Gluten-free sourdough wheat baked goods appear safe for young celiac patients: a pilot study*, «Hepatol. Nutr. », 51, pp. 777-783.
- DI GIANDOMENICO M. (2010): *Storia e sociologia dei prodotti lievitati da forno*, in *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*, a cura di GOBBETTI M., CORSETTI A., Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. 1-16.
- ERCOLINI D., PONTONIO E., DE FILIPPIS F., MINERVINI F., LA STORIA A., GOBBETTI M., DI CAGNO R. (2013): *Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation*, «Appl. Environ. Microbiol.» submitted.
- DI SABATINO A., CORAZZA G. R. (2009): *Coeliac disease*, «Lancet», 373, pp. 1480-1493.
- FRANCAVILLA R., CATASSI C. (2010): *Intolleranza al glutine*, in *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*, a cura di GOBBETTI M., CORSETTI A., Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. 297-316.
- GAENZLE M. G., LOPONEN J., GOBBETTI M. (2008): *Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality*, «Trends Food Sci. Technology.», 19, pp. 513-521.
- GOBBETTI M. (2010): *Fisiologia e biochimica dei batteri lattici*, in *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*, a cura di Gobbetti M., Corsetti A., Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. 153-170.
- GRECO L., GOBBETTI M., AURICCHIO R., DI MASE R., LANDOLFO F., PAPARO F., DI CAGNO R., DE ANGELIS M., RIZZELLO C. G., CASSONE A., TERRONE G., TIMPONE L., D'ANIELLO M., MAGLIO M., TRONCONE R., AURICCHIO S. (2011): *Safety for patients with celiac disease of baked goods made of wheat flour hydrolyzed during food processing*, «Clin. Gastroenterol. Hepatol.», 9, pp. 24-29.
- LARCHE M., WRAITH D.C. (2000): *Peptide-based therapeutic vaccine s for allergic and disease*, «Nat. Med.», 11, pp. 69-76.
- MINERVINI F., RIZZELLO C. G., SANNA M. (2010): *I pani tipici*, in *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*, a cura di GOBBETTI M., CORSETTI A., Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. 263-284.
- RIZZELLO C. G., DE ANGELIS M., DI CAGNO R., CAMARCA A., SILANO M., LOSITO I., DE

- VINCENZI M., DE BARI M. D., PALMISANO F., MAURANO F., GIANFRANI C., GOBBETTI M. (2007): *Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease*, «Appl. Environ. Microbiol.», 73, pp. 4499-4507.
- RIZZELLO C. G., CURIEL J. A., NIONELLI L., VINCENTINI O., DI CAGNO R., SILANO M., GOBBETTI M., CODA R. (2013): *Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten*, «Food Microbiol.», in stampa.
- SHAN L., MOLBERG O., PARROT I., HAUSCH F., FILIZ F., GRAY G. M., SOLLID L. M., KHOSLA C. (2002): *Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue*, «Science», 297, pp. 2275-2279.
- SHAN L., MARTI T., SOLLID L. M., GRAY G. M., KHOSLA C. (2004): *Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue*, «Biochem. J.», 383, pp. 311-318.
- SOLLID L. M., KHOSLA C. (2005): *Future therapeutic options for celiac disease*, «Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.», 2, pp. 140-147.
- STEPNIAK D., KONING F. (2006): *Enzymatic gluten detoxification: the proof of the pudding is in the eating*, «Trends Biotechnol.», 24, pp. 433-434.
- STEPNIAK D., SPAENIJ-DEKKING L., MITEA C., MOESTER M., DE RU A., BAAK-PABLO R., VAN VEELEN P., EDENS L., KONING F. (2006): *Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease*, «Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.», 291, pp. 621-629.
- WATTS T., BERTI I., SAPONE A., GERARDUZZI T., NOT T., ZIELKE R., FASANO A. (2005): *Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 102, pp. 2916-2921.