

ATTI DEL CONVEGNO

PROGETTO SEMOLA GF

*Realizzazione di semola di grano
duro di filiera campana*

Gluten-free



28 settembre 2015
istituto di scienze
dell'alimentazione (ISA)-CNR

Aula Bottazzi
via Roma 64, Avellino





PROGETTO SEMOLA GF

Realizzazione di semola di grano duro di filiera campana gluten free.

PSR Campania 2007/2013-Misura 124 (Ambito PIF): “Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e settore forestale”.

CONVEGNO CONCLUSIVO

28 Settembre 2015

ISA-CNR Aula Bottazzi

Interventi introduttivi

9.00-9.15 Sabato d'Auria, direttore ISA CNR

9.15-9.30 Antonio Tallarico, Regione Campania

9.30-9.45 Teresa D'Amato, Presidente AIC Campania Presentazione del Progetto

9.45-10.00 Antonio Lo Conte, Ipafood srl

10.00-10.15 Mauro Rossi, ISA CNR

10.15-10.30 Antonello Megliola, Azienda Megliola

10.30 11.00 Coffee break e visita della poster session Risultati del progetto

11.00-11.20 Salvatore Moscaritolo, CRA Roma. Sviluppo industriale della tecnologia di detossificazione.

11.20-11.40 Antonio Picarelli, Università “La Sapienza” Roma. I risultati del trial clinico.

11.40-12.00 Francesco Maurano, ISA CNR. Analisi biologica della tecnologia: il modello animale.

12.00-12.20 Lucia Treppiccione, ISA CNR. Sviluppo della tecnologia microbiologica di base.

12.20-12.40 Marco Di Tola, Università “La Sapienza” Roma. Oltre la celiachia: nuove forme di intolleranze al glutine e di diagnosi.

12.40-13.00 Vittorio Valletta, Ipafood srl. Le attività di informazione e divulgazione del progetto.

13.00-13.30 Discussione e Conclusioni

13.30-14.30 Lunch

14.30-15.30 Discussione della poster session con i responsabili della ricerca VISITA GUIDATA alle aziende del Gruppo Lo Conte srl.

16.00 Partenza dall'ISA-CNR del pullman per Frigento ed Ariano Irpino, sedi dell'Azienda Ipafood srl. I responsabili dell'azienda condurranno una visita tecnica ai laboratori ed al nuovo impianto di produzione industriale realizzato nell'ambito del PIF Integrano ed allo stand di prodotti con semola detossificata. La visita si conclude con una cena sociale in loco e rientro in Avellino con pullman.

Moderatrice: Diomira Luongo, ISA CNR Comitato Organizzativo CNR: Luigi Cipriano, Clemente Meccariello, Antonio Ottombrino.

Realizzato con il cofinanziamento del FEASR

Si è tenuto nell'Aula Bottazzi di Via Roma ad Avellino lunedì 28 settembre il Convegno conclusivo “Progetto Semola GF” per la presentazione del progetto di Ricerca che ha portato alla realizzazione di semola di grano duro di filiera campana privo di glutine.

Un progetto di ricerca innovativo, che consiste in un trattamento enzimatico “food grade” effettuabile direttamente sulle farine o semole di grano in grado di mascherare le sequenze tossiche del glutine attraverso la formazione di nuovi legami con amminoacidi. Trattando le farine con un enzima (transglutaminasi microbica), già largamente impiegato nell'industria alimentare, e in presenza di esteri alchilici dell'amminoacido lisina, il glutine non viene più riconosciuto dai linfociti “T” presenti nell'intestino responsabili dell'infiammazione e del danno intestinale nei celiaci. Realizzato in collaborazione con l'Istituto di Scienze dell'Alimentazione del Centro Nazionale delle Ricerche di Avellino e finanziato dalla Regione Campania, il progetto ha visto la collaborazione e il lavoro attivo di numerosi professionisti ed esperti del settore tra cui Mauro Rossi, responsabile del CNR di Avellino e la collaborazione attiva dell'Ospedale Umberto I di Roma per la fase di sperimentazione.

Importanti risultati sono stati ottenuti nel corso della ricerca, avendo messo in evidenza la possibilità di creare prodotti finiti con farina di frumento trattata enzimaticamente in modo tale da detossificarla pur lasciando invariate le caratteristiche organolettiche della farina. Si traccia una nuova strada quindi, per il settore dell'alimentazione per celiaci e intolleranti al glutine, aprendola a farine naturalmente contenenti glutine detossificate, prima considerate off limits.

Il progetto nasce dall'incontro tra un imprenditore irpino che da trent'anni investe in innovazione, Antonio Lo Conte, a capo dell'omonimo gruppo industriale, presente sul mercato con i marchi Le Farine Magiche, Decorì e Molino Vigevano, e un gruppo di ricercatori, chimici e immunologi, dell'Istituto di Scienze dell'Alimentazione del CNR di Avellino (Isa-Cnr) guidati dal dottor Mauro Rossi, e rappresenta un esempio virtuoso di collaborazione pubblico-privato.

Durante il Convegno Antonio Lo Conte e Mauro Rossi hanno presentato il progetto, mentre l'analisi dei risultati è stata lasciata ad un team di esperti del CRA di Roma, dell'Università La Sapienza e dell'ISA CNR di Avellino.

Risultati



Transamidated gliadin stimulates intestinal IL-10 *in vitro* in untreated CD patients.

Luongo D, Rotondi Aufiero V, Iaquinto G*, Mazzarella G, Rossi M.

Institute of Food Sciences, National Research Council, Avellino, Italy; and *Gastroenterology Department, San G. Moscati Hospital, Avellino, Italy

Background and Aims

A major hallmark of celiac disease (CD) is inappropriate intestinal T cell activation in DQ2 and DQ8 patients triggered by peptides from wheat gluten and related prolamins from barley and rye. Moreover, tTGase plays a crucial role in CD immune-mediated pathogenesis (1-2). A strategy for preventing tTGase activity on gliadins could be instrumental in blocking the pathogenic mechanisms that occur in CD. Interestingly, mTGase exhibit the same site specificity as tTGase but lacks deamidase activity. We have shown that transamidation of gliadin following the treatment of wheat flour with mTGase caused a dramatic down-regulation in IFN- γ production *in vitro* in the intestinal T cells of CD patients (3). Herein, the effects of transamidated gliadin (spf) on the ongoing inflammatory response were tested in cultured intestinal specimens derived from untreated CD patients.

Materials and Methods

Purification of protein fractions

The gliadin fraction was extracted from the protein pellet using a modified Osborne procedure. Proteins were assessed quantitatively by Bradford analysis and qualitatively analyzed by 8–16% denaturing SDS-PAGE and Coomassie R-250 blue staining. The transamidation reaction was quantitatively monitored using a modified ninhydrin assay. K-C₂H₅ was used as a standard to estimate a linear relationship between the absorbance and the α -amino N content, and the results were expressed as nmoles α -amino N/mg protein.

Preparation of pt digest of gliadins

pt digest of gliadins purified from untreated or transamidated wheat flour were prepared by suspending gliadin samples (100 mg) in 0.1 N HCl (2 ml), pH 1.8, and incubating with 2 mg pepsin (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA; specific activity: 3260 U/mg) for 4 h at 37°C with shaking. The pH was then adjusted to 7.8, followed by a 4-h incubation with 2 mg trypsin (Sigma Chemical; specific activity: 10,600 U/mg). The enzyme reaction was stopped by incubating in boiling water for 10 min. Samples were freeze-dried and stored at -20°C.

Patients and organ culture analysis

Ten untreated DQ2+ CD patients (age range 12–51 years; median age, 24 years) were enrolled in this study (Table 1) by the Gastroenterology Department of S.G. Moscati Hospital. Ethics review board approval was obtained in advance. Informed consent was obtained for each participating subject. Biopsies from the distal duodenum were obtained during an upper-gastrointestinal endoscopy. Two specimens were used for histology, and the other specimens were cultured for 8 h with 1 mg/ml of pt-gliadin or pt-transamidated gliadin and finally stored in liquid nitrogen for RNA analysis. Histology was performed using a modified Oberhuber-Marsh classification of the intestinal mucosal lesion. CD was diagnosed using a combination of clinical signs, serology and characteristic CD histology.

Cytokine analysis

For cytokine transcript analysis, total RNA was extracted from intestinal biopsies using TRIzol reagent, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen-Life Technologies). RNA was quantified by fluorometry using the RiboGreen reagent (Invitrogen-Life Technologies). cDNA was prepared from 1 μ g total RNA by reverse transcription with MMLV RT (Invitrogen-Life Technologies) and the oligo-(dT)_{12–18} primer at 42°C for 60 min. Real-time PCR was performed on the iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The amplification mixture contained IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories), 0.2 μ M each primer and cDNA. The following PCR reaction conditions were used for 39 cycles: 95°C for 30 s, 56.4°C for 30 s, and 72°C for 40 s. The relative gene expression levels were calculated using the $\Delta\Delta$ comparative threshold method and presented as the fold-change in gene expression after normalization to the L-32 housekeeping gene. For analysis of the samples, the following primer sequences were used: L-32, forward 5'-CCTAGCCCCCTTGAAGC-3', reverse 5'-GCCCTGAATCTTACGAACC-3'; IFN- γ , forward 5'-TCAGCTCTGCATCGTTTGG-3', reverse 5'-GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA-3'; IL-10, forward 5'-GTGATGCCCAAGCTGAGA-3', reverse 5'-CAC GGC CTT GCT TTG TT-3'.

Statistical analysis

Data of transcription levels in intestinal biopsies were evaluated by one-way ANOVA and Tukey test post hoc analysis. For all tests, $P < 0.05$ was selected as the level denoting a statistically significant difference.

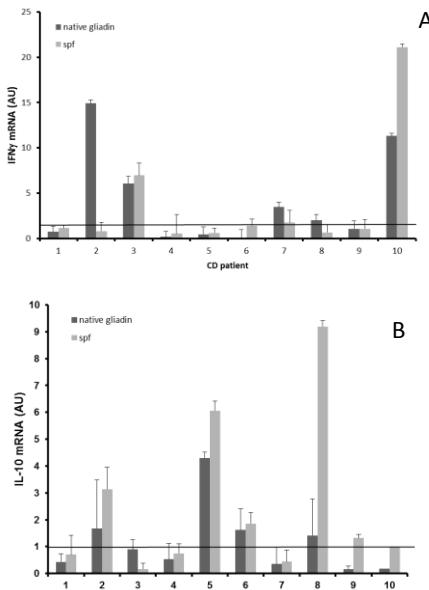


Figure 1 IFN- γ (A) and IL-10 mRNA levels (B) in intestinal biopsies from CD patients.

Intestinal specimens from 10 CD patients with overt disease (Table 1) were subjected to an 8-h incubation with 1 mg/ml of pt-gliadins or spf and cytokine transcript levels were evaluated by real-time PCR. Cytokine values were normalized to L-32 mRNA and are presented as the fold-change in gene expression (arbitrary units). Values ≥ 1 are considered to indicate induction of an immune response. Columns represent the mean values \pm SD from triplicate analyses.

Table 1 Demographic and Morphological Data of CD Patients

Patients	Age	Gender	Marsh degree
CD1	24	M	II
CD2	37	F	II
CD3	12	F	II
CD4	13	F	III/c
CD5	51	F	II
CD6	28	M	III/a
CD7	23	M	II
CD8	14	M	III/a
CD9	25	M	III/a
CD10	16	F	III/a

Marsh degree, Oberhuber-Marsh classification; M, male; F, female.

Results

We tested the ability of spf, a soluble form of fully transamidated gliadin, to influence the IL-10 and IFN- γ mRNA levels *in vitro* in intestinal biopsies from CD patients with overt disease (Table 1, Marsh degree range: II–IIIc). Following gliadin challenge, samples from five patients (CD2, -3, -7, -8 and -10, Fig. 1A,) were found responsive to gliadin, as assessed by IFN- γ transcript levels (arbitrary units, AU > 1). In these samples, spf challenge induced reduced levels of IFN- γ with the exception of samples CD3 and -10 (Fig. 1A). We found that four patients (CD2, -5, -6, and -8, Fig. 1B) also secreted IL-10 mRNA following gliadin challenge (AU > 1), in agreement with literature data. Interestingly, in 5 samples (CD2, -5, -6, 8 and -9) spf induced an enhanced transcription of IL-10 in comparison with gliadin (Fig. 1 B).

Conclusion

Immunological data suggested the potential of transamidated gliadin to induce phenotypic changes of the antigen-specific T cell response, also in the presence of an ongoing inflammatory status induced by gluten-containing diet in CD patients.

References

1. Bruce S.E., Bjarnason, I., and Peters, T.J. (1985). *Clin. Sci. (Lond.)* **68**(5), 573–579. (2002) *Nat Rev Immunol* **9**, 647–655.
2. Fleckenstein, B., Qiao, S. W., Larsen, M. R., Jung, G., Roepstorff, P., and Sollid, L. M. (2004) *J Biol Chem* **279**(17), 17607–17616.
3. Gianfrani, C., Siciliano, R. A., Facchiano, A. M., Camarca, A., Mazzeo, M. F., Costantini, S., Salvati, V. M., Maurano, F., Mazzarella, G., Iaquinto, G., Bergamo, P., and Rossi, M. (2007) *Gastroenterology* **133**(3), 780–789.



Fondo europeo agricolo
per lo sviluppo rurale:
l'Europa investe nelle zone rurali

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE
ALIMENTARIE E FORESTALI



Assessorato Agricoltura
REGIONE CAMPANIA

Programma di Sviluppo Rurale
PSR CAMPANIA
2007/2013

This project was supported by grants from 'misura 124'

Transamidation of gliadin mediates reversal of the antigen-specific immune phenotype in DQ8 tg mice.

Luongo D, Bonavita R, Rotondi Aufiero V, Maurano F, Bergamo P, Mazzarella G, Rossi M.

Institute of Food Sciences, National Research Council, Avellino, Italy.

Aims

Celiac Disease (CD) is characterized by activation of intestinal gliadin-specific CD4⁺ T cells with a Th1 phenotype that plays a major role in the induction of enteropathy (1). HLA-DQ8-transgenic mice (DQ8) have widely been used to dissect the mechanisms underlying CD pathogenesis. In this model, we analysed the residual toxicity and immune response of an enzymatically modified (transamidated) gliadin (spf).

Materials and Methods

Transamidation reaction of wheat flour

A commercial preparation of bread wheat flour was used. A total of 100 g flour was suspended in 8 vol 0.4 M NaCl and stirred for 10 min to extract albumin/globulins. The flour suspension was then centrifuged at 1000 g for 10 min, and the supernatant was discarded. The recovered pellet was washed exhaustively with water to eliminate any residual soluble protein, suspended in 1 vol water containing 20 mM pharmaceutical-grade K-C2H5 (NutraBio.com, Middlesex, NJ, USA) and 8 U/g flour mTGase, and incubated for 2 h at 30°C. The suspension was centrifuged at 3000 g for 10 min, and the supernatant was recovered. In the two-step process, the pellet was suspended again in 1 vol water containing a final concentration of 20 mM K-C2H5 and fresh mTGase (8 U/g flour) and incubated for 3 h at 30°C. For the control, the sample was prepared using the same protocol in the absence of mTGase.

Statistical Analysis

Differences among the various treatment groups in the morphology data, caspase 3 activity and TNF α levels were evaluated by one-way ANOVA and Tukey test post hoc analysis. (Graphpad 6). For all tests, $P < 0.05$ was considered as statistically different.

EXPERIMENT 1

Mice treatment with untreated or spf gliadin .

Two groups ($n = 6$ each) of DQ8 mice (6-12-week-old) were orally treated with indomethacin plus spf or gliadin (500 μ g) on days 0, 3, 5, and 7. Indomethacin was given in the drinking water (1.5mg/100ml) for 10 days. A final group ($n=5$) treated with albumin/globulin (alb/glob) was used as control (Figure 1).

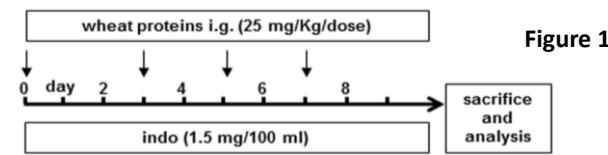


Figure 1

At the end of the treatment, mice were sacrificed and small intestine fragments were collected for morphometric evaluation (Figure 2), caspase 3 activity and TNF- α mRNA analysis. (Figure 3)

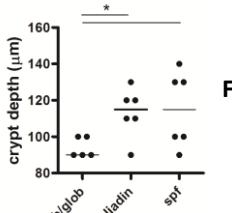
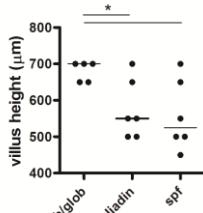


Figure 2

RESULTS:

Both gliadin and spf induced morphological damage in treated mice.

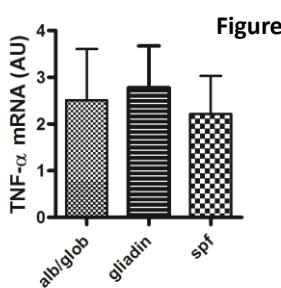
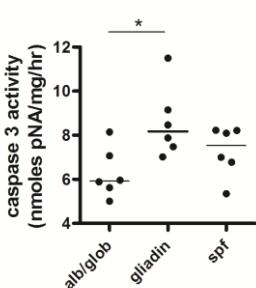


Figure 3

Results

Apoptosis and TNF- α transcript levels are increased by gliadin but not by spf.

Conclusions

Immunological data suggested that phenotypic changes in both innate immunity and gliadin-specific T cell response occurred as a consequence of the transamidation, although intrinsic cytotoxicity of gliadin appeared unaltered.

Reference

- 1) Nilsen, E. M., F. L. Jahnson, K. E. Lundin, F. E. Johansen, O. Fausa, L. M. Sollid, J. Jahnson, H. Scott, and P. Brandtzaeg. 1998. *Gastroenterology* 115: 551-563.



Fondo europeo agricolo
per lo sviluppo rurale:
l'Europa investe nelle zone rurali



This project was supported by grants from 'misura 124'

Programma
di Sviluppo Rurale
PSR CAMPANIA
2007/2013

Nrf2 activation prevents pro-oxidant signs in a mouse model of gliadin-induced enteropathy

Paolo Bergamo, Ennio Coccia*, Francesco Maurano, Diomira Luongo, Mauro Rossi

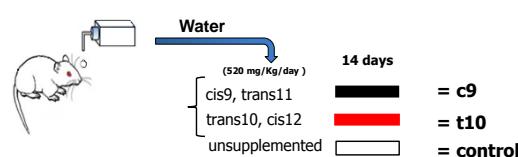
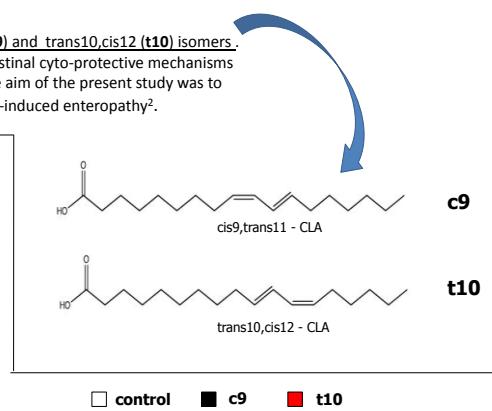
Institute of Food Sciences, National Research Council, Avellino, Italy. * Institute of Biosciences and Bioresources, National Research Council, Naples, Italy.

Background & Aims.

Conjugated Linoleic Acid (CLA) is the collective name indicating the equimolar mixture of *cis*9,*trans*11 (**c9**) and *trans*10,*cis*12 (**t10**) isomers. The protective effect elicited by dietary CLA supplementation against the gliadin-induced toxicity on intestinal cyto-protective mechanisms (nuclear factor erythroid 2-related factor2, Nrf2) was evidenced in HLA-DQ8-transgenic mice (DQ8¹). The aim of the present study was to investigate the ability of individual CLA isomer to improve Nrf2-mediated defences in a model of gluten-induced enteropathy².

Experiment 1.

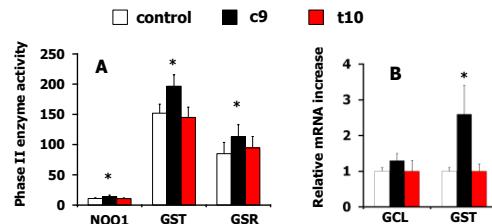
The effects of individual CLA isomers (**c9** or **t10** group) on intestinal cytoprotections (Nrf2) were investigated. Two animal groups (n=6 each) were supplemented with **c9** or **t10** (520 mg/kg/bw/day) for two weeks (**c9/t10**). A final group (n=6) of untreated animals was used as control (**EXP 1**). At the end of the experimental period the activity of several phase II enzymes (Glutathione reductase, **GSR**; Glutathione transferase, **GST**, NAD(P)H:quinone oxidoreductase **NQO1**; gamma glutamylcysteine synthase, **GCL**) and **GCL** and **GST** mRNA levels were measured in the duodenum of DQ8 mice.



Results

Nrf2-mediated cyo-protections are significantly increased by c9, but not by t10, supplementation.

A small, but significant, increase of **GST**, **GSR** and **NQO1** activity (as compared to controls) was found in the **c9**-treated mice (**PANEL A**). Moreover, **c9** administration increased the mRNA levels of **GST** but not of **GCL**, as compared to control or **t10**-treated animals (**PANEL B**).

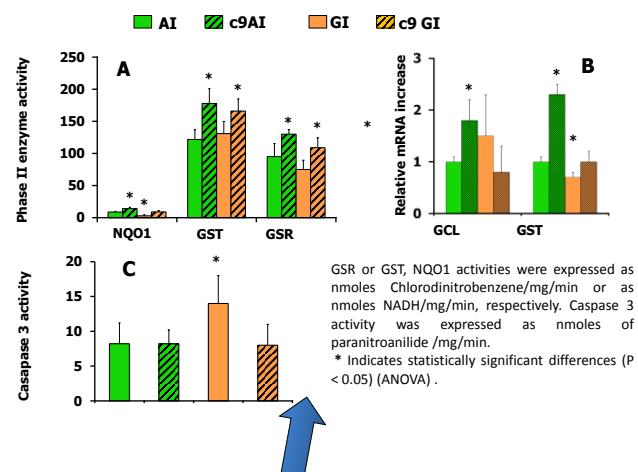
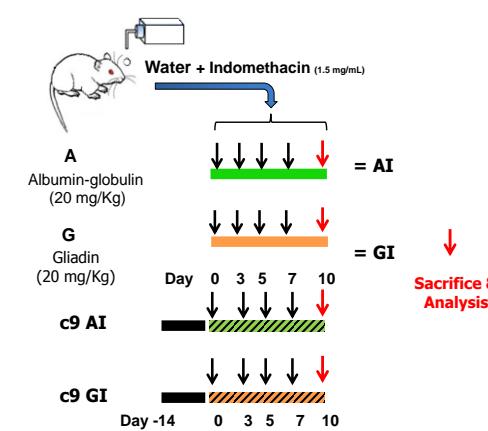


GSR activity was expressed as nmoles Chlorodinitrobenzene/mg/min, GST and NQO1 activity were expressed as nmoles NADH/mg/min, * Indicates statistically significant differences (P < 0.05). (ANOVA)

Experiment 2.

Anti-oxidant and anti-apoptotic effects of **c9** CLA were investigated in a mouse model of gliadin-induced enteropathy.

Two mice groups (n=6 each) were intra-gastrically administered 500 µg wheat albumin/globulin (**AI**) or gliadin (**GI**) and received indomethacin in drinking water (1.5 mg/100 mL). Two additional groups (n=6 each) were pre-treated with **c9** before **GI** or **AI** administration (**c9 AI** or **c9 GI**, respectively). At the end of the treatment, animals were sacrificed and cytoprotective effects were evaluated in small intestine by measuring the alteration of Nrf2-mediated defences by using enzymatic and mRNA levels. Caspase 3 activity was measured to determine the anti-apoptotic ability of **c9** pre-treatment.



GSR or GST, NQO1 activities were expressed as nmoles Chlorodinitrobenzene/mg/min or as nmoles NADH/mg/min, respectively. Caspase 3 activity was expressed as nmoles of parnitroanilide /mg/min.

* Indicates statistically significant differences (P < 0.05) (ANOVA).

Results

Animal pre-treatment with c9 prevents pro-oxidant and pro-apoptotic effects triggered by GI.

The marked decline of intestinal antioxidant/detoxifying enzymes (NQO1, GSR) activity (**PANEL A**) and GCL mRNA levels (**PANEL B**) was associated to **GI** (P < 0.05) but not to **AI** intake. **GI**-induced alterations were blunted by **c9** pre-treatment (P < 0.01) (**PANELS A, B**). The rise of caspase 3 activity in **GI**, as compared to **AI**-treated animals, was inhibited by **c9** pre-treatment. (**PANEL C**).

Conclusions

Nrf2-mediated antioxidant/detoxifying defences are activated by supplementation only with **c9** isomer and that **c9** dosing has preventive effects against the pro-oxidant and cytotoxic signs of gliadin-induced enteropathy.

References.

- 1 - Mazzarella G, et al., 2014. Gliadin intake alters the small intestinal mucosa in indomethacin-treated HLA-DQ8 transgenic mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 307:G302–G312
2 - Bergamo P, et al., 2011. Conjugated linoleic acid protects against gliadin-induced depletion of intestinal defences. Mol Nutr Food Res 55:S248–S256.



Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale:
l'Europa investe nelle zone rurali



Assessorato Agricoltura



This project was supported by grants from 'misura 124"

Formulazione di un mezzo low-cost per la over-produzione di transglutaminasi microbica da *Streptomyces mobaraensis*

Lucia Treppiccione¹, Angel Manteca², Felipe Lombo², Antonio Ottombrino¹, Mauro Rossi¹.

1. Istituto di Scienze dell'Alimentazione ISA-CNR 2. Universidad de Oviedo, Facultad de Medicina Dpto de Biología Funcional, Área de Microbiología

Introduzione

La celiachia è una patologia complessa, causata da fattori ereditari e ambientali. La sostanza che provoca danno è il glutine, una proteina che si trova in alcuni cereali. Il glutine è costituito da due classi proteiche, le glutenine e le prolammelle (chiamate gliadine nel grano). Le gliadine e le glutenine costituiscono circa l'80% dell'intera frazione proteica presente nella cariosside di frumento nella quale ritroviamo altre due classi di proteine solubili in acqua (al contrario delle precedenti): le albumine (9%) e le globuline (5-7%). La transglutaminasi tissutale (TGasi) è in grado di catalizzare nel celiaco la deamidazione di residui di glutammina inducendo l'abnorme risposta infiammatoria.

La metodologia messa a punto recentemente (1,2) consiste nel co-trattamento della farina con una TGasi microbica (mTGasi) commerciale in presenza di un aminoacido modificato K-CH₃ che viene legato alle glutammine dalla mTGasi, consentendo di annullare completamente il potenziale immunostimolatorio del glutine.

Scopo del lavoro

Messa a punto di un protocollo per la produzione di una mTGasi food-grade da *Streptomyces mobaraensis* (DSM40847) in vista di una suo utilizzo in scala industriale(3,4)



Fig. 1
Scopo dello studio è l'aumento della produzione di mTG nell'ottica di una produzione economica industriale.



Fig. 2
Colture di *Streptomyces mobaraensis*

Materiali e Metodi

Inizialmente, la produzione è stata studiata confrontando 2 mezzi di coltura: Mezzo ricco, Mezzo ricco con supplemento di MgCl₂ (fig.3).

Sulla base dei primi risultati sono state effettuate delle modifiche sul mezzo migliore sostituendo ai componenti nutritivi additivi di origine animale e/o vegetale (3).

Tutti i mezzi sono stati integrati con sostanze nutritive e induttori di produzione mTG (4). L'attività della transglutaminasi è stata valutata ogni 24 ore attraverso un saggio colorimetrico ed un saggio di efficacia tecnologica su farina.

Risultati

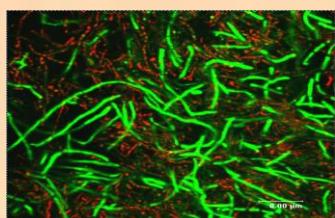


Fig.3
Immagine al Microscopio Confocale: *Streptomyces mobaraensis*. Passaggio di fase da micelio 1 a micelio 2, fase in cui viene prodotta la transglutaminasi.

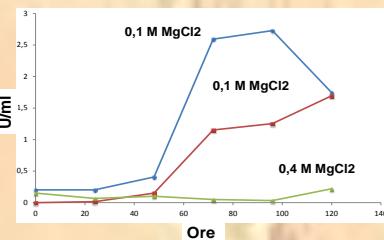


Fig. 4
Messa a punto dei livelli di MgCl₂ per incrementare la produzione di mTGasi.

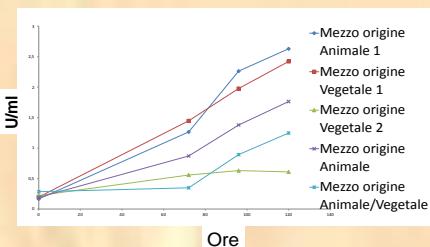


Fig. 5
Produzione di mTG: Saggio di produzione di mTG con diversi mezzi di coltura costituiti da diversi componenti animali e vegetali, sali e 0,1 M di MgCl₂.

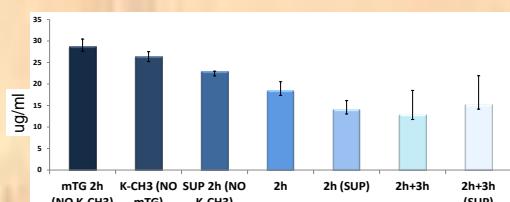


Fig. 6
Decremento dell'insolubilità del glutine prodotta alla reazione enzimatica mediante incubazione con supernatante culturale (SUP).



Fig. 7
Scale-up su un impianto di fermentazione pilota B.Braun di capacità nominale 18 litri, sterilizzabile *in situ*. Parametri di crescita: Temperatura 30°C, Velocità di agitazione 200 rpm, pH=7 (aggiustato dinamicamente a mezzo pH-Stat)

Conclusioni

Il mezzo migliore, con una concentrazione di 0.1 M di MgCl₂ ha permesso di ottenere fino a 2.62 U / ml a 120 h. È stato osservato un effetto significativo del MgCl₂ sulla produzione di mTG. I risultati hanno inoltre mostrato che è possibile utilizzare un mezzo di natura vegetale per la produzione di mTG, ottenendo in questo modo un'elevata attività mTG in un semplice mezzo naturale.

Bibliografia

1. Biochemical modifications of gliadins induced by microbial transglutaminase on wheat flour Mazzeo et al Biochimica et Biophysica Acta 1830 (2013) 5166–5174
2. Application of Microbial Transglutaminase in Meat Foods: A Review. Santhi D et al Crit Rev Food Sci Nutr, 2015 Apr 21:1.
3. Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* as achieved by treatment with excessive MgCl₂. Zhang L et al Appl Microbiol Biotechnol 2012 Mar;93(6):2335–43. doi: 10.1007/s00253-011-3790-5. Epub 2011 Dec 15
4. Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis* Esther Guerra-Rodríguez et al Chemical Engineering Research and Design Volume 92, Issue 4, April 2014, Pages 784–791 ECCE9 – 9th European Congress of Chemical Engineering



This project was supported by grants from 'misura 124"

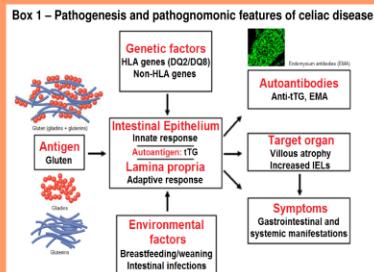
Effects of modified wheat gluten administration in patients with celiac disease: results of a double-blind, gluten-controlled clinical trial

Mariacatia Marino¹, Rossella Casale¹, Sara Di Nardi¹, Giuseppina Gerratana², Maria Santulli^{2,3}, Antonio Angeloni^{2,4}, Raffaele Borghini¹, Giuseppe Donato⁵, Barbara Porowska⁶, Antonio Tiberti¹, Mauro Rossi⁷, Marco Di Tola¹, Antonio Picarelli¹.

¹Department of Internal Medicine and Medical Specialties, Sapienza University, Rome, Italy; ²OUC DLC07 Laboratory Analysis DEA, Polyclinic Umberto I, Rome, Italy; ³Department of Experimental Medicine, Sapienza University, Rome, Italy; ⁴Department of Molecular Medicine, Sapienza University, Rome, Italy; ⁵Department of Clinical Medicine, Sapienza University, Rome, Italy; ⁶Department of General and Special Surgery "Paride Stefanini", Sapienza University, Rome, Italy; ⁷Institute of Food Sciences, National Research Council, Avellino, Italy.

Background and aim

The ingestion of wheat gluten in genetically predisposed individuals can lead to celiac disease (CD), a very common autoimmune disorder (prevalence of about 1%) diagnosed by clinical case identification, serological screening and duodenal histology (Box 1) [1]. The treatment of CD is currently based on a lifelong gluten-free diet (GFD), although several alternative approaches have been proposed over time [2]. Recent studies showed that biochemical modifications of gluten peptides, induced by microbial transglutaminase (mTG) on wheat flour in the presence of lysine ethyl ester ($K\text{-C}_2\text{-H}_5$), inhibit in vitro their ability to induce the CD-specific immune response in human and murine experimental models [3,4]. Our aim was to perform a double-blind, gluten-controlled clinical trial to evaluate the safety of a protracted ingestion of mTG-modified wheat flour in CD patients.



Materials and methods

Twenty-two but one (drop-out) CD patients in remission were randomized to receive, in double blind, rusk made with either mTG-modified (Code A, n = 11) or unmodified (Code B, n = 10) wheat flour. Every month for a total of three months, patients were asked to complete an anamnestic card to monitor symptoms using a 100-mm visual analogue scale (VAS), with 0 representing the absence of symptoms. Serum anti-tissue transglutaminase (anti-tTG) and endomysium antibodies (EMA), as well as creatinine concentration were also monitored. At the end of the study, patients underwent upper endoscopy with biopsy for duodenal histology and organ culture system (Local Ethics Committee code: Prot. 672/10 - Rif. 1907/22.07.2010; ClinicalTrials.gov identifier: NCT02472119).

Figure 1 – Flow chart of the patients evaluated from their entry until the end of the study.

The rusk made with mTG-modified (Code A) or unmodified (Code B) wheat flour were provided by Lallemand Group Co. Contro, Foggia (AV), Italy.

At baseline: T0; baseline; T1: one month of treatment; T2: two months of treatment; T3: three months of treatment.

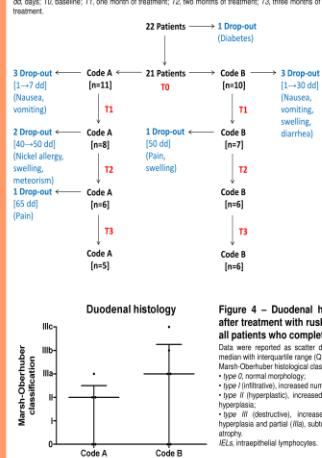


Figure 2 – Anti-tTG serum levels determined at baseline and after treatment with rusk of Code A or B in all patients who completed the study.

Anti-tTG levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay, with 4 U/ml, as threshold value (thin cutting line), and reported as scatter dot plot with mean and standard deviation.

Anti-TG, anti-tissue transglutaminase.

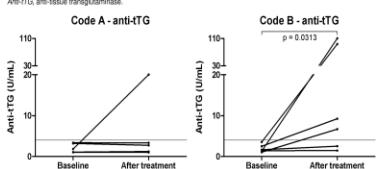


Figure 3 – Creatinine serum levels determined at baseline and after treatment with rusk of Code A or B in all patients who completed the study.

Creatinine levels were measured by a standard method and reported as scatter dot plot with a before-after system to verify, indirectly, the absence of nephrotoxicity after ingestion of the rusk used in the study.

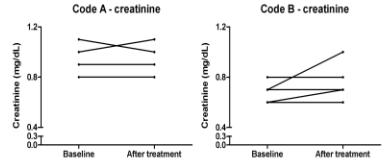


Figure 4 – Duodenal histology performed after treatment with rusk of Code A or B in all patients who completed the study.

Data were reported as scatter dot plot and synthesized as median and range with interquartile range (Q₁-Q₃).

Marsh-Oberhuber histological classification:

• type 0, normal morphology;

• type I, increased number of IELs;

• type II (hyperplastic), increased number of IELs and crypt hyperplasia;

• type III (destructive), increased number of IELs, crypt hyperplasia and parietal (IIa), subtotal (IIb) or total (IIIc) vilous atrophy.

IELs, intraepithelial lymphocytes.

Marsh-Oberhuber classification

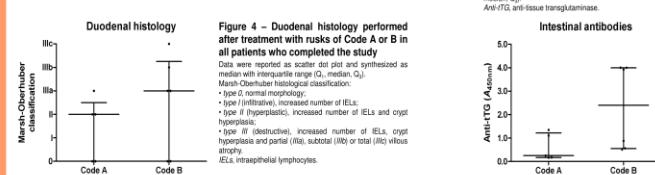


Figure 5 – Anti-tTG duodenal levels determined after treatment with rusk of Code A or B in all patients who completed the study.

Anti-tTG levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay, reported as scatter dot plot and synthesized as median with interquartile range (Q₁-Q₃).

Anti-TG, anti-tissue transglutaminase.

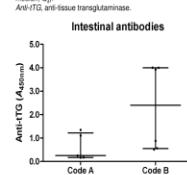
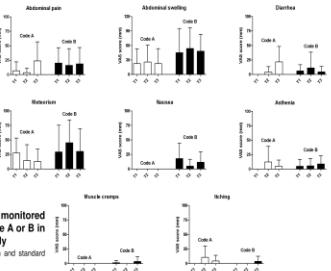


Figure 6 – Severity of symptoms monitored during treatment with rusk of Code A or B in all patients who completed the study.

Data were reported as bar and error bar (mean and standard deviation).

VAS, visual analogue scale.



Results

Five out of 11 patients who received rusk of Code A and 6 out of 10 patients who received rusk of Code B completed the study (Fig. 1). At baseline, all patients who completed the study showed serum anti-tTG and EMA negative results. At the end of the study, one out of 5 (20%) patients ingesting rusk of Code A and 4 out of 6 (66.7%) patients taking rusk of Code B presented serum anti-tTG and EMA positive results. In patients who received rusk of Code B, anti-tTG serum levels determined after treatment were significantly higher ($p = 0.0313$) than those measured at baseline (Fig. 2). No significant change was found in the creatinine serum levels after treatment of all patients who completed the study (Fig. 3). At the end of the study, one out of 5 (20%) patients ingesting rusk of Code A and 4 out of 6 (66.7%) patients taking rusk of Code B presented intestinal villous atrophy (Fig. 4). Consistently, anti-tTG duodenal levels determined in patients who received rusk of Code B tended to be higher than those measured in patients who ate rusk of Code A (Fig. 5). Among all symptoms monitored during treatment, the abdominal swelling, meteorism and nausea tended to be more severe in patients ingesting rusk of Code B than those taking rusk of Code A (Fig. 6).

Conclusions

If these data will be confirmed in larger studies, the enzymatic treatment of wheat flour induced by mTG in the presence of $K\text{-C}_2\text{-H}_5$ could become one of the most promising strategies for CD treatment alternative to the GFD.

References

- Green PH, et al. J Allergy Clin Immunol 2015;135:1099-106.
- Pligas NM, et al. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2015;29:503-21.
- Gianfrani C, et al. Gastroenterology 2007;133:780-9.
- Lombardi E, et al. J Leukoc Biol 2013;93:479-88.



LE ATTIVITÀ DI INFORMAZIONE E DIVULGAZIONE DEL PROGETTO

Vittorio Valletta - M. Lorenza Grasso - Gianluca Sabatino - Carmen Barletta

INTRODUZIONE

L'informazione scientifica in senso stretto, ha sviluppato nel tempo peculiari caratteristiche, poiché il suo primo obiettivo è quello dello scambio e della diffusione, nell'ambito della stessa comunità scientifica, dei risultati acquisiti e delle scoperte raggiunte, al fine di facilitare e di consentire ogni ulteriore progresso nei vari campi di ricerca. A questa funzione se ne aggiunge una seconda non meno importante, che è quella, più propriamente detta, della divulgazione scientifica, diretta a raggiungere con un linguaggio più semplice un pubblico molto ampio. Infatti, uno dei principali canali di diffusione della conoscenza scientifica è costituito dai media che offrono un ampio spettro di approcci alla divulgazione scientifica: dai programmi televisivi di taglio educativo fino alle notizie date nei telegiornali, dalla stampa specializzata agli articoli di attualità scientifica sui quotidiani, fino alle informazioni scientifiche disponibili in rete. Alcune considerazioni sulla stampa non specialistica, possono fornire un quadro non solo dell'offerta d'informazione, ma dei rapporti tra scienza, media e il grande pubblico.

Presupposto, pertanto, della divulgazione scientifica è in generale l'utilizzo di mezzi di comunicazione quali la stampa quotidiana, i periodici, il cinema, la radio, la televisione ed ora, l'informazione online. Si tratta di strumenti che non si rivolgono a pochi specialisti, ma ad un pubblico di migliaia e spesso di milioni di persone, ad un pubblico classificato genericamente in lettori, radioascoltatori, telespettatori. In questa prospettiva la divulgazione è stata definita "attività di mediazione" (tra mondo scientifico e pubblico).

Le attività di informazione e divulgazione a valle di una ricerca scientifica rappresentano una fase molto importante. La divulgazione è l'attività che permette di rendere accessibile al grande pubblico la cultura scientifica.



MATERIALI E METODI

Avviandosi a conclusione il programma di ricerca e sperimentazione, l'azienda Ipafood ha intrapreso una serie di iniziative di divulgazione del Progetto Semola GF nell'ambito della Misura 124 della Regione Campania.

LOCONTELAB

Sul sito del gruppo è presente una sezione dedicata "LO CONTE LAB". Questa sezione a sua volta è suddivisa in tre canali:

- Progetti
- Laboratorio
- Collaborazione e brevetti

La sezione progetti raccoglie le informazioni sui principali progetti di ricerca intrapresi dall'azienda tra cui quello di detossificazione enzimatica.

Il sito riporta le principali fasi degli anni di ricerca che hanno portato ai risultati ottenuti, informazioni sulla ricerca clinica e pubblicazioni nonché l'intervista televisiva del dott. Rossi al programma di Rai tre "Elisir".

<http://www.locontenaturalimenti.it/public/lc/>

<http://www.locontenaturalimenti.it/public/lc/index.php/locontelab-progetti/>



RASSEGNA STAMPA

Un canale fondamentale al fine della divulgazione è la stampa.

Sempre dal sito si può accedere ad un'area riservata alla rassegna stampa e ai comunicati dove è possibile trovare gli articoli e le interviste pubblicate e i comunicati stampa dell'azienda sul processo di detossificazione.



DIVULGAZIONE SCOLASTICA

L'azienda ha deciso di intraprendere una campagna di divulgazione della scoperta scientifica che coinvolgesse diverse fasce di età.

Il gruppo ha provveduto a distribuire all'ingresso di tutte le scuole della provincia di Avellino delle brochure informative.

Inoltre le stesse brochure sono state distribuite durante le visite guidate scolastiche all'interno dello stabilimento.



FIERA MILANO

Per una informazione efficace e ad ampio spettro l'azienda Ipafood ha deciso di prendere parte, come espositore, ad una convention tenutasi a Milano.

Planeta Nutrizione e Integrazione è un forum multidisciplinare che ospita tutti gli operatori della salute, dai farmacisti ai medici, dai dietetisti ai nutrizionisti biologi, dagli infermieri ai fisioterapisti, che vogliono approfondire le tematiche della salute in relazione all'alimentazione e all'integrazione corretta. Planeta Nutrizione & Integrazione quest'anno si è svolto dal 25 al 27 giugno 2015 a Milano presso il Centro Congressi di Rho "Stella Polare" in concomitanza con Expo Milano 2015.

Il 25 giugno il dott. Mauro Rossi ha spiegato la ricerca "Celiachia: strategia di detossificazione enzimatica delle farine". Presso lo stand, invece, sono stati illustrati i risultati della ricerca sulla detossificazione del glutine sostenuta dal Gruppo Lo Conte ed esposti prodotti finiti ottenuti dal trattamento enzimatico.



CONCLUSIONI

L'utilizzo di questi canali e delle iniziative sopra esposte ha dato buoni risultati e riscontri positivi. Durante l'esposizione in fiera a Milano, gli specialisti interessati all'argomento, avevano già appreso la notizia dai media. Questo insieme alle delucidazioni del momento e alle indicazioni del sito per ulteriori informazioni hanno dato modo di soddisfare le esigenze sia di chi appartiene al settore, sia di chi ne è estraneo.

La combinazione dei tre canali ha permesso di dare al progetto risonanza nazionale.

BIBLIOGRAFIA

<http://www.phys.uniroma1.it/DipWeb/webDisp/d4/dispense/comunicazione/Graziani.pdf>



CARATTERISTICHE DI BAKING DEI PRODOTTI OTTENUTI DAL TRATTAMENTO ENZIMATICO

Vittorio Valletta - M. Lorenza Grasso - Gianluca Sabatino - Carmen Barletta

INTRODUZIONE

L'impasto ottenuto dal processo enzimatico è stato sottoposto a diverse prove tecnologiche per testarne il grado di lievitazione e le caratteristiche organolettiche, per confermare la conservazione del sapore del grano e l'attività del glutine "mascherato".

MATERIALI E METODI

Con l'impasto detossificato ottenuto (vedi foto impianto pilota), sono stati prodotti pane, pan di spagna e muffin. I risultati e le foto sono di seguito riportati.



Reattore enzimatico

Centrifuga

Impasto detossificato

PANE

Ingredienti:

- Impasto detossificato
- Lievito
- Acqua
- Olio
- Sale

Condizioni di cottura e lievitazione:

- lievitazione a 32°C per 1h e 30 minuti
- cottura a 160°C in forno ventilato per circa 1 h

Esame organolettico:

buona alveolatura della mollica; spessore e colore della crosta buoni; odore come pane classico; sapore accettabile; buona croccantezza e spessore della crosta.



ANALISI SENSORIALE DEL PANE													
VANI	REQUISITI	VALUTAZIONE	PUNTEGGIO										
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OLIFATIVI	odore globale	su crosta e mollica											
	odore frangia	su crosta e mollica											
	odore tostato	su crosta											
	odore di cereali	su crosta											
GUSTATORI	dolce	sulla mollica											
	acido	sulla mollica											
	sapore globale	su crosta e mollica											
	sapore cereali	sulla mollica											
STRUCTURALI	durezza	su crosta											
	croccantezza	su crosta											
	coesività	sulla mollica											

Scheda analisi sensoriale

PAN DI SPAGNA

Ingredienti:

- Impasto detossificato
- Uova
- Lievito
- Burro
- Latte
- Zucchero

Condizioni di cottura e lievitazione:

- Lievitazione e cottura in forno ventilato a 160°C per 40-45 minuti

Esame organolettico:

prodotto soffice e alveolato; sapore e odore molto gradevoli; buona colorazione esterna.



MUFFIN

Ingredienti:

- Impasto detossificato
- Uova
- Lievito
- Burro
- Latte
- Zucchero
- Bicarbonato
- Vaniglia

Condizioni di cottura e lievitazione:

- Lievitazione e cottura in forno ventilato a 180°C per 30 minuti

Esame organolettico:

prodotto soffice e alveolato; sapore e odore molto gradevoli; buona colorazione esterna.



CONCLUSIONI

I risultati ottenuti sono stati ottimali sia dal punto di vista organolettico sia dal punto di vista tecnologico dimostrando che la presenza del glutine, non visibile all'organismo, continua a svolgere la sua funzione e che non ci sono differenze sostanziali con la normale farina.

