



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse
Naturali e Ambiente

Corso di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie
Alimentari

La digeribilità delle farine di frumento in
relazione alla loro forza: sviluppo di un
metodo di indagine.

Relatore: ch.mo prof. Andrea Curioni

Laureando: Andrea Roselli
Matricola n. 1081285

ANNO ACCADEMICO 2014-2015

RIASSUNTO

Il frumento e i suoi derivati rappresentano una delle principali risorse alimentari per la popolazione mondiale. Questo cereale è una fonte principale di carboidrati, ma anche di proteine, lipidi, fibra e altri micronutrienti. Nel corso degli anni, sia in Italia che in Europa, il grano tenero (*Triticum aestivum*) è stato selezionato in funzione dell'aumento della resa per ettaro ma, successivamente, l'obiettivo del miglioramento è diventato l'aumento della forza degli impasti (parametro alveografico W) (Belderok, Mesdag e Donner, 2000).

Al momento sono conosciute alcune patologie legate all'ingestione di prodotti derivati dal frumento, prima di tutte la celiachia, ma anche l'allergia alimentare e la sensibilità al glutine, che sembra essere in forte aumento. Queste forme patologiche si manifestano tutte dopo l'ingestione di pane o altri prodotti a base di frumento, trovando la loro sede a livello intestinale. Questo fa pensare che il grado di digeribilità dei prodotti possa giocare un ruolo importante, condizionando lo stato e la forma in cui gli elementi che scatenano le risposte patologiche raggiungono l'intestino. Questo fatto ha determinato un aumento dell'attenzione nei confronti della digeribilità degli alimenti a base di grano. È quindi concepibile che l'aumento di forza delle farine, determinato dal miglioramento genetico, modificando la struttura del glutine, abbia un effetto sulla sua digeribilità. Tuttavia, in bibliografia non sono presenti studi che abbiano cercato di correlare la digeribilità delle farine di frumento (e dei prodotti derivati) con la forza degli impasti (W). Per tali ragioni, in questo studio è stato messo a punto un metodo d'indagine che consenta di valutare, la digeribilità *in vitro* delle farine, in modo da poterla eventualmente correlare con la loro forza. A questo scopo sono state utilizzate farine provenienti da due varietà antiche di grano tenero (Inallettabile e Palesio) che, a parità di contenuto proteico, differiscono tra loro per il parametro W. Dai risultati emersi sembrerebbe che la farina più debole sia maggiormente digeribile di quella più forte, ma è necessario esaminare altri campioni (di cultivar differenti) ed estendere lo studio agli impasti e ai prodotti trasformati.

ABSTRACT

Wheat and its derivatives represent one of the main sources of food for the population. This cereal is a principal source of carbohydrates, but also protein, fat, fiber and other nutrients. Over the years, both in Italy and in Europe, the common wheat (*Triticum aestivum*) was selected to increase the yield per hectare but, subsequently, the objective of improvement became the increase of the strength of the dough (alveographic parameter W) (Belderok, Mesdag and Donner, 2000). At the moment are known some pathologies related to the ingestion of products derived from wheat, before all the celiac, but also food allergy and gluten sensitivity, which seems to be rising sharply. These pathologies all occur after ingestion of bread and other wheat-based products, finding their seat in the intestine. This suggests that the degree of digestibility of the products can play an important role, making the condition and form in which the elements that trigger abnormal responses reach the intestine. This has led to an increased focus on the digestibility of wheat-based foods. This has led to an increased focus on the digestibility of wheat-based foods. It is therefore conceivable that the increased strength of the flours, determined by genetic improvement, modifying the gluten structure, has an effect on its digestibility. However, in the literature there are no studies that have tried to correlate the digestibility of wheat flour (and derivatives) with the strength of the dough (W). For these reasons, in this study was developed a method allowing evaluating, *in vitro* digestibility of flours, in order to possibly correlate with their strength. For this purpose flours were used from two varieties of wheat (Inallettibile and Palesio) that, with the same protein content, differ in the parameter W. From findings it would seem that the weaker flour is more digestible than the stronger one, but is necessary analyse other samples (of different cultivar) and extend the study to the doughs and to processed products.

INDICE

1. INTRODUZIONE	7
1.1 Generalità sul frumento	7
1.1.1 Dall'antichità ad oggi: i motivi del successo del frumento	7
1.1.2 Il miglioramento del grano	9
1.2 Chimica del frumento	10
1.2.1 Anatomia e composizione chimica della granella	10
1.2.2 Il glutine di frumento	11
1.3 Digeribilità del grano e dei suoi derivati	15
1.3.1 Il processo digestivo e le implicazioni per la salute del consumatore	15
1.3.2 Studi di digeribilità: modelli <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	17
2. SCOPO DELLA TESI	19
3. MATERIALI E METODI	21
3.1 Campioni	21
3.2 Estrazione delle proteine dalla farina	21
3.2.1 Estrazione delle albumine e delle globuline	21
3.2.2 Estrazione delle prolamine	22
3.2.3 Estrazione delle proteine totali	22
3.3 Separazione elettroforetica delle proteine della farina	22
3.4 Determinazione del contenuto proteico	22
3.5 Digestione <i>in vitro</i>	23
3.6 Cromatografia liquida ad esclusione molecolare	24
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	27
4.1 Campioni	27
4.2 Caratterizzazione elettroforetica del pattern proteico delle farine	27
4.3 Messa a punto del metodo cromatografico	29
4.4 Messa a punto del metodo per la digestione <i>in vitro</i>	30
4.5 Cromatografia liquida ad esclusione molecolare dei digeriti di farina	36
5. CONCLUSIONI	45
6. BIBLIOGRAFIA	47

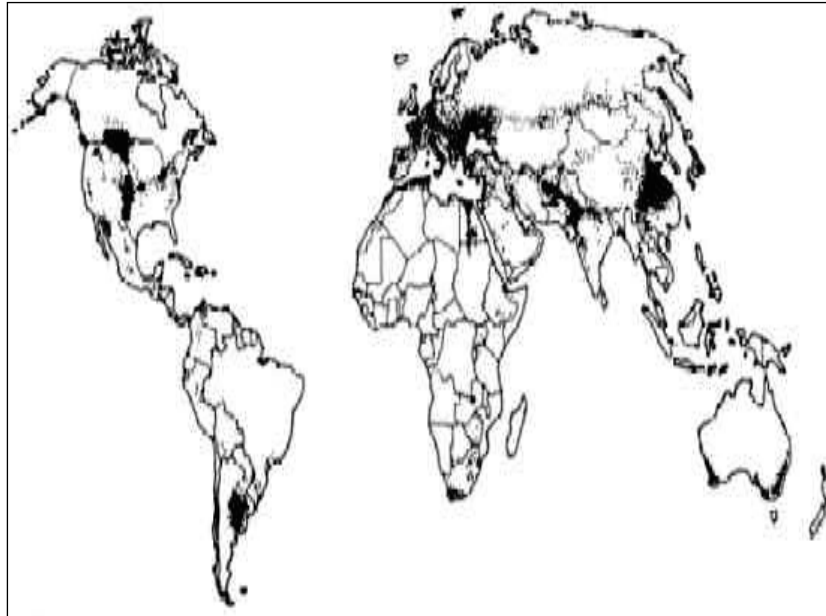
1. INTRODUZIONE

1.1 Generalità sul frumento

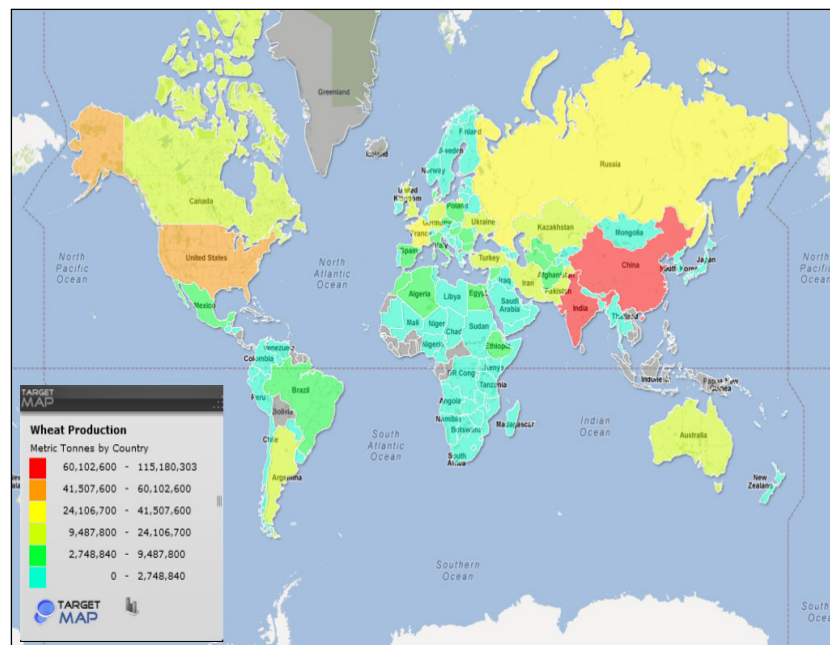
1.1.1 Dall'antichità ad oggi: i motivi del successo del frumento

La coltivazione del frumento (*Triticum spp.*) incominciò con le civiltà europee, nordafricane e dell'est asiatico oltre 8000 anni fa, dove il grano veniva utilizzato come ingrediente di base nella dieta. Oggi, il frumento rientra tra le prime tre colture cerealicole al mondo con una raccolta annuale che supera i 600 milioni di tonnellate (Shewry, 2009). Questo cereale è diffuso in tutto il mondo, anche se la maggior parte della produzione si concentra in Unione Europea, India e Russia (FAO, 2015). Esso è molto importante per l'apporto di calorie nella dieta dell'uomo anche al giorno d'oggi tant'è che rappresenta la principale fonte di carboidrati per molte popolazioni del mondo (Balkovic et al., 2014). Alcuni autori quali Curtis e colleghi (2002) sostengono che i lipidi e le proteine del frumento siano facilmente digeribili mentre altri hanno dimostrato che gli enzimi gastro-intestinali dell'uomo non sono capaci di degradare completamente il glutine (Bethune e Kholsa, 2008). Ciò nonostante, questo vegetale rappresenta una fonte di aminoacidi essenziali, sali minerali, vitamine e lipidi (Arendt and Zannini, 2013). Contiene, inoltre, fibra ed è stato dimostrato che una dieta basata prevalentemente sul consumo di grano apporta un maggior quantitativo di questa sostanza rispetto a una dieta ricca di alimenti di origine animale (Johnson et al., 1978). L'ingestione di fibra è importante per la salute dell'uomo in quanto, ostacolando l'assorbimento degli zuccheri semplici, è utile per contrastare lo sviluppo di malattie croniche e ridurre l'insorgenza di diabete di tipo 2 (Watson et al., 2014). Tuttavia, l'ampia diffusione del frumento non sarebbe mai stata possibile se esso non avesse avuto anche determinati vantaggi agronomici. Tra questi vi è la capacità della pianta a crescere in un ampio intervallo di latitudini, che varia tra 30° e 60° N e fra 27° e 40° S (Nuttonson, 1955). Un altro fattore che ha aiutato la diffusione di questa coltura è senz'altro la capacità di crescere in un vasto range di temperature che spazia dai 3° fino ai 32° C, anche se la temperatura ottimale è di 25° C (Briggle, 1980). Inoltre, il frumento è in grado di vivere nelle aree in cui la piovosità annuale è compresa tra 250 mm e 750 mm e ciò spiegherebbe perché esso viene coltivato in oltre tre quarti del suolo terrestre (Leonard and Martin, 1963). Di seguito viene

confrontata la produzione mondiale di frumento nella prima metà degli anni settanta (Figura 1.1.1.a) con quella del 2010 (Figura 1.1.1.b).



a)



b)

Figura 1.1.1.a: mappa mondiale con le maggiori aree coltivate a frumento nella prima metà degli anni 70 (Espenshade, 1975).

Figura 1.1.1.b: mappa del mondo raffigurante le aree destinate alla produzione di frumento nel 2010 (l'immagine è stata elaborata con i dati forniti dal sito www.faostat.fao.org).

1.1.2 Il miglioramento del grano

Tra il 1951 e il 1990, nonostante la superficie destinata alla coltivazione a frumento sia rimasta pressoché costante, la produzione mondiale incrementò notevolmente rispetto al passato. Infatti, nel 1951 la resa media mondiale ammontava a circa 1 tonnellata/ettaro mentre nei primi anni 80 salì a circa 2 tonnellate/ettaro, per poi raggiungere le 2,5 tonnellate/ettaro nel 1995 (CIMMYT, 1996). In particolare, in Italia, nel 1925 Benito Mussolini proclamò la battaglia del Grano con lo scopo di rendere autosufficiente il Paese per quanto riguardava la produzione cerealicola. Grazie alla ricerca sul miglioramento genetico, in pochi anni la resa in frumento passò da 1 tonnellata/ettaro, che era la resa media nei primi anni del novecento, a oltre 1,5 tonnellate/ettaro nel 1935, continuando ad aumentare anche dopo la seconda guerra mondiale (Belderok, Mesdag e Donner, 2000). Successivamente, l'attenzione dei ricercatori si concentrò sull'attitudine alla panificazione e nel 1979 venne pubblicato il primo sistema di classificazione della farina. Questo comprendeva l'indice farinografico (stabilità dell'impasto), la percentuale di glutine secco, il contenuto proteico e come parametri alveografici la forza (W) e il rapporto tra tenacità ed estensività (P/L) dell'impasto (Tabella 1.1.2.1). Tuttavia, con il passare degli anni le esigenze del mercato cambiarono e tale classificazione venne modificata. Nel 1996 la Millers' Association (associazione dei mugnai) sostituì la percentuale di glutine secco con il numero di caduta (falling number), che rappresenta l'indice dell'attività delle α -amylasi (Tabella 1.1.2.2). Furono poi proposti altri sistemi di classificazione come ad esempio quello basato sulla forza degli impasti in funzione al contenuto proteico della farina (Tabella 1.1.2.3).

CATEGORIA DI GRANO	PARAMETRI ALVEOGRAFICI		INDICE FARINOGRAFICO	GLUTINE SECCO (%)	PROTEINE (%)
	W	P/L			
Ottima	>180	<0,6	>3	>11,5	>12,5
Buona	140-180	<0,6	2-3	10,5-11,5	11,5-12,5
Mediocre	100-140	0,6-0,8	1-2	<10,5	11,5-12,5
Per biscotti	<100				

Tabella 1.1.2.1: criteri per la classificazione delle farine da panificazione pubblicati nel 1979 (Belderok, Mesdag e Donner, 2000).

CATEGORIA DI GRANO	PARAMETRI ALVEOGRAFICI		INDICE FARINOGRAFICO	PROTEINE (%)	NUMERO DI CADUTA
	W	P/L			
Forte	≥300	≤1,0	≥15	≥14	≥250
Superiore per pane	≥220	≤0,6	≥10	≥13	≥220
Per pane	≥160	≤0,6	≥5	≥11,5	≥220
Per biscotti	≤115	≤0,5		≤10,5	≥240

Tabella 1.1.2.2: criteri per la classificazione delle farine da panificazione proposti dalla Miller's Association nel 1996 (Belderok, Mesdag e Donner, 2000).

CLASSE	DESCRIZIONE	W (x10 ⁻⁴ J)
Prima	grano miglioratore	> 260
Seconda	grano per la produzione diretta di pane	155-180
Terza	grano ordinario	120
Quarta	grano per biscotti	< 120

Tabella 1.1.2.3: classificazione delle farine da panificazione basata sulla forza degli impasti (Belderok, Mesdag e Donner, 2000)

In Italia e in altri Paesi europei ed extra-europei sono state selezionate, negli anni, farine sempre più forti e con tenore proteico elevato. Queste due caratteristiche, tra loro correlate, sono importantissime al fine di migliorare la resistenza agli stress meccanici da parte degli impasti (Belitz et al., 2009, Mesdag e Donner, 2000). Infatti, questi ultimi devono resistere alle enormi sollecitazioni durante i processi industriali, come avviene nel momento della lievitazione del pane.

1.2 Chimica del frumento

1.2.1 Anatomia e composizione chimica della granella

Il frutto dei cereali, come il frumento, l'orzo e la segale, è costituito dai tegumenti che racchiudono l'endosperma e il germe. Dal punto di vista botanico l'endosperma è costituito dall'endosperma amidaceo (70-80% del nocciolo) e dallo strato aleuronico. Quest'ultimo è ricco in proteine, di cui circa la metà sono idrosolubili ed hanno una

conformazione granulare, ma contiene anche grassi, enzimi e vitamine. L'endosperma amidaceo, dal quale si ricava la farina, è costituito da cellule, aventi sottili pareti cellulari, che inglobano granuli di amido e proteine in grado, quando idratate, di formare una matrice viscosa ed elastica. Gran parte di queste proteine sono quelle del glutine.

La farina è costituita essenzialmente dall'endosperma amidaceo e può contenere delle impurità in grado variabile a seconda della categoria merceologica alla quale appartiene (D.P.R. n. 41 del 5 marzo 2013). Infatti, gli sfarinati possono essere suddivisi in cinque tipologie, di seguito riportate in ordine decrescente di raffinatezza: 00, 0, 1, 2 e integrali. Le farine integrali contengono l'endosperma amidaceo, il germe e i tegumenti della granella e per questo hanno un maggior valore nutrizionale rispetto a quelle raffinate. Le proteine del frumento possono essere suddivise in quattro classi in base alla loro solubilità in solventi diversi: albumine (solubili in acqua), globuline (solubili in soluzioni di cloruro di sodio), gliadine (solubili in soluzioni di etanolo 70% (v/v)) e glutenine (solubili in soluzioni di acido acetico) (Osborne, 1924). Albumine e globuline sono essenzialmente proteine enzimatiche, ricche in amminoacidi essenziali, localizzate nell'embrione e nell'aleurone. Gliadine e globuline, invece, fungono da proteine di riserva e sono collocate nell'endosperma (Belitz et al., 2009).

1.2.2 Il glutine di frumento

Il glutine, inteso come massa visco-elastica, può essere ricavato solo dal frumento.

Aggiungendo acqua alla farina di frumento si ottiene un impasto dal quale è possibile isolare il glutine tramite dei lavaggi con acqua, che servono per rimuovere l'amido e gli altri ingredienti. Il glutine è costituito per il 90% da proteine, 8% da grassi e per il restante 2% da carboidrati. Questi ultimi contengono principalmente pentosani liposolubili che sono in grado di legarsi con l'acqua, mentre i lipidi si associano alle proteine del glutine. Inoltre, nel glutine appena isolato vi sono alcuni enzimi, tra cui proteinasi e lipossigenasi (Belitz et al., 2009).

Un impasto è adatto alla produzione di pane, o altri prodotti da forno, se il glutine è in grado di formare un film che riesce a trattenere i gas che si sviluppano durante la lievitazione. Tale fenomeno dipende dalla produzione di agglomerati che si orientano a formare filamenti e pellicole. Questi agglomerati si ricavano dall'idratazione delle

proteine e dalla formazione di una rete attraverso dei legami intra- ed inter-molecolari (Bushuk and Rasper, 1994). In seguito all'idratazione della farina, le proteine native del glutine hanno una struttura globulare irregolare e formano una rete tridimensionale. Ciascun filamento di glutine subisce stress di allungamento e stiramento durante la formazione dell'impasto (Figura 1.2.2.1) e, in particolare, gli sforzi di tensione provocano la formazione di pellicole a livello delle giunzioni dei filamenti proteici, dove esse si accumulano a formare una sorta di membrana (Figura 1.2.2.2). I forti stiramenti strappano i film ma gli strati rimangono intatti a impasto ultimato (Figura 1.2.2.3).

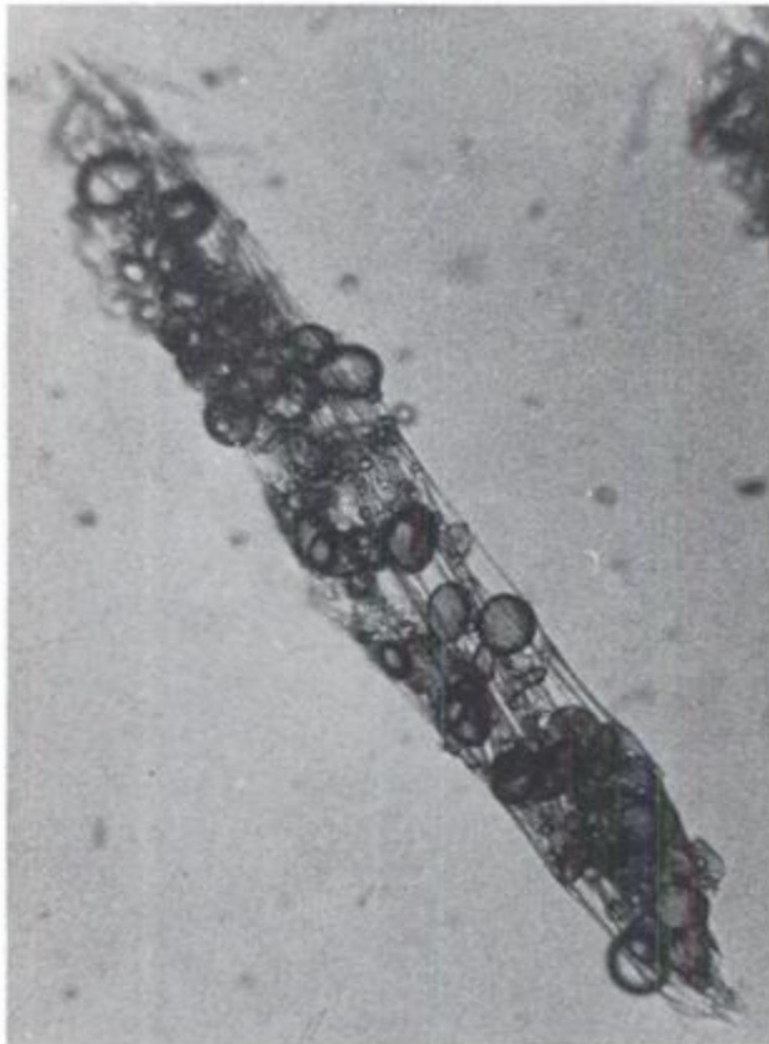


Figura 1.2.2.1: fotografia di una particella di glutine vista al microscopio; il glutine forma dei filamenti che si estendono tra i granuli di amido lungo la direzione dello sforzo (Bushuk and Rasper, 1994).

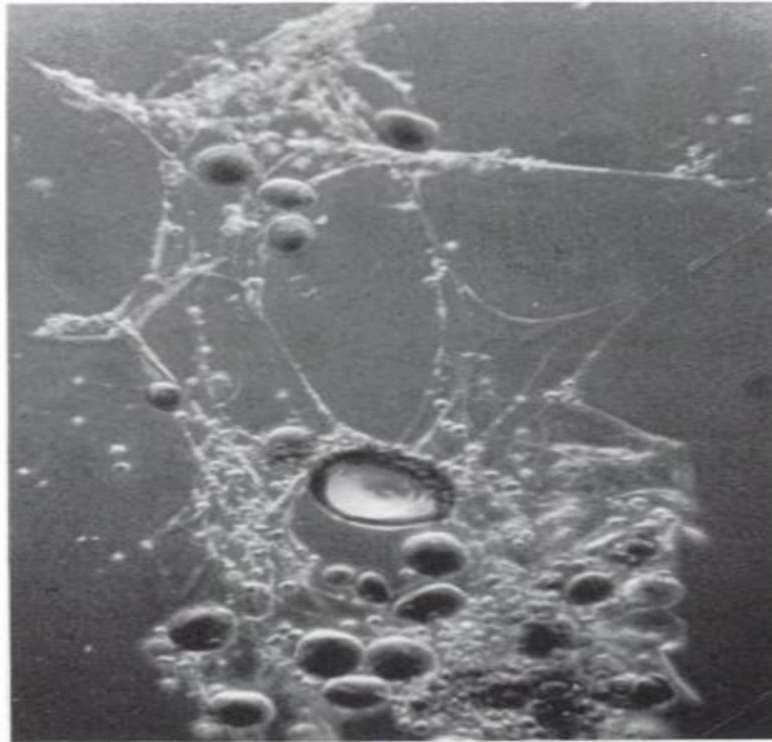


Figura 1.2.2.2: vista bidimensionale al microscopio di una particella di farina frumento; i filamenti di glutine sono ampiamente estesi e in parte lacerati nei punti di giunzione (Bushuk and Rasper, 1994).

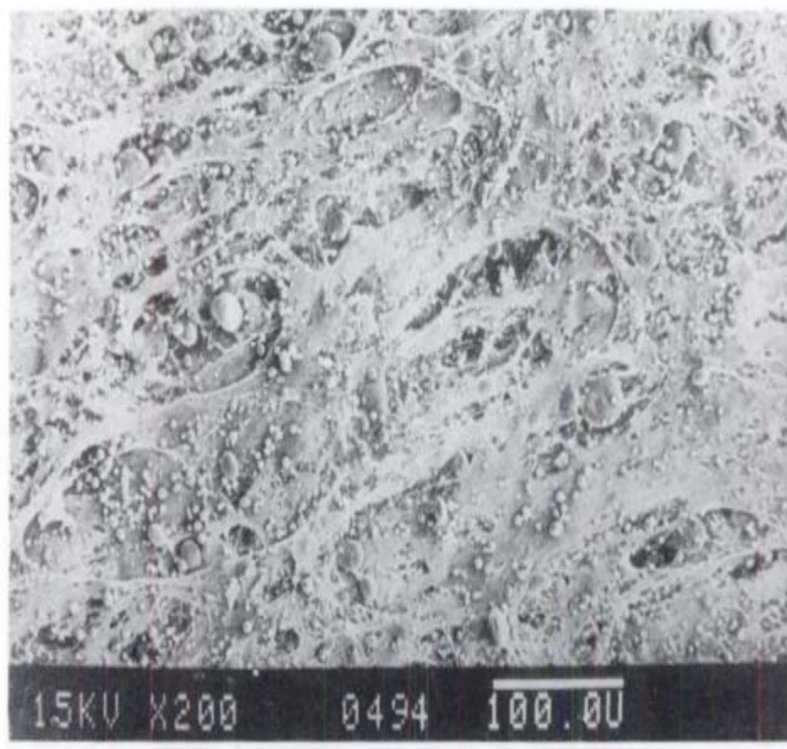


Figura 1.2.2.3: fotografia di un impasto completamente formato; i film di glutine sono orientati lungo la direzione dello sforzo meccanico subito (Bushuk and Rasper, 1994).

Le gliadine e le glutenine sono note anche come prolamine. Esse sono le proteine principali del glutine e influenzano notevolmente la qualità tecnologica degli impasti (Shewry et al., 2002; Wieser and Kieffer, 2001).

Le gliadine possono essere suddivise in base alla loro mobilità elettroforetica a pH acido e il loro pattern elettroforetico è una caratteristica individuale delle varietà di frumento (Krause et al., 1988). Ci sono quattro tipi di gliadine, in ordine decrescente di mobilità elettroforetica: α -, β -, γ -gliadine (proteine con ponti disolfuro intramolecolari) e ω -gliadine (proteine che non presentano cisteina). Le glutenine, invece, sono una miscela di polimeri costituiti da numerose subunità eterogenee, legate tra loro da legami disolfuro intermolecolari. Esse sono costituite da due tipi di subunità: quelle ad alto peso molecolare (HMW-GS, fino a qualche milione di Da) e quelle a basso peso molecolare (LMW-GS, circa 30-45 kDa). Le subunità ad alto peso molecolare possono essere a loro volta suddivise in due sottogruppi: HMW-GS di tipo x e HMW-GS di tipo y, che si differenziano in base alla massa molecolare relativa, (numero di residui aminoacidici), e per il numero di residui cisteinici (Tabella 1.2.2.1).

	HMW-GS di tipo x	HMW-GS di tipo y
Massa Molecolare relativa	83-88 kDa	67-74 kDa
Numero di residui aminoacidici	770-827	627-684
Numero di residui cisteinici	4	7

Tabella 1.2.2.1: Caratteristiche molecolari delle subunità ad alto peso molecolare delle glutenine (Belitz et al., 2009).

Secondo Köhler e colleghi (1993) la struttura delle subunità HMW di tipo x contiene due residui cisteinici, uno nel gruppo carbossilico terminale e l'altro nel gruppo ammino-terminale della catena, il che consente di originare polimeri lineari a cui possono legarsi mediante ponti SS le LMW-GS. Anche le subunità a basso peso molecolare (LMW-GS) tendono a polimerizzare grazie alla presenza di due particolari residui di cisteina (Köhler et al., 1993). Tuttavia, i due residui di cisteina delle LMW-GS, possono legarsi, oltre che con le HMW-GS, anche con le gliadine, interrompendo la formazione della catena durante la polimerizzazione delle proteine del glutine. Infine, le gliadine monomeriche (ω -gliadine, α - e γ -gliadine con un basso numero di

residui cisteinici), che non possono polimerizzare sarebbero responsabili della viscosità degli impasti (Belitz et al., 2009).

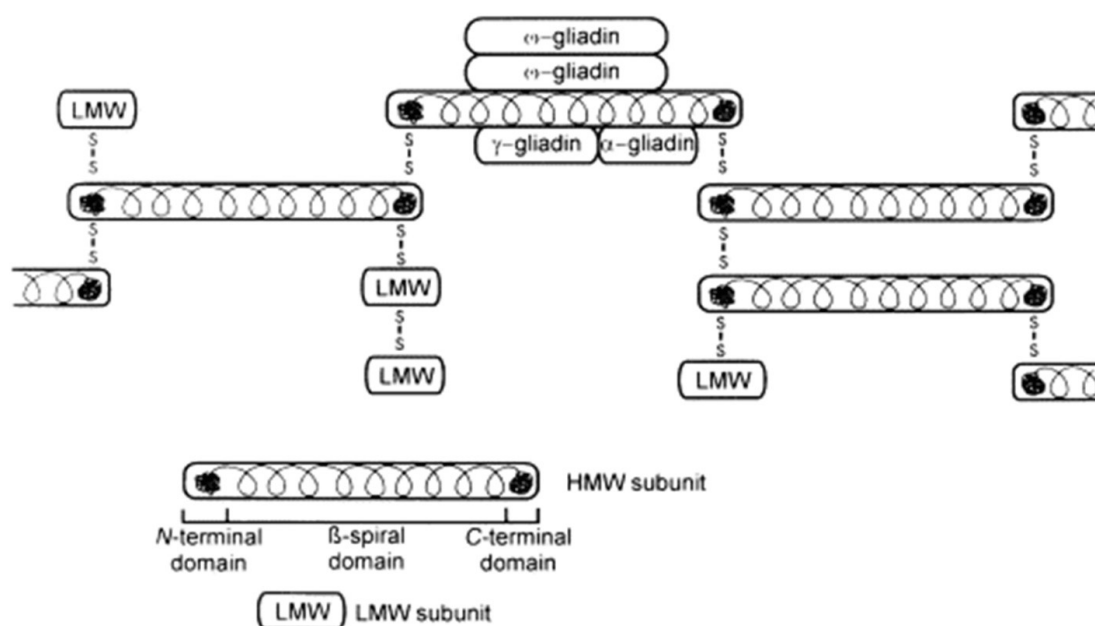


Figura 1.2.2.4: arrangiamento spaziale delle proteine del glutine.

1.3 Digeribilità del grano e dei suoi derivati

1.3.1 Il processo digestivo e le implicazioni per la salute del consumatore

In bibliografia ci sono pareri discordanti sulla digeribilità del frumento e dei suoi derivati. Infatti, alcuni autori tra i quali Curtis e colleghi (2002) pensano che essi siano facilmente digeribili ma altri, tra cui Bethune e Kholsa (2008) oltre che a Gilissen et al. (2014), segnalano che l'organismo digerisce con difficoltà alcuni nutrienti in esso contenuti.

In generale, il processo di digestione degli alimenti prevede una prima fase che avviene nel cavo orale, dove agiscono gli enzimi salivari, soprattutto le α-amilasi che iniziano la scissione dell'amido in zuccheri semplici (Hur et al., 2011). Successivamente, l'alimento entra nello stomaco dove sono presenti l'acido cloridrico, che garantisce un ambiente fortemente acido (circa pH 2), e la pepsina, un enzima proteolitico altamente aspecifico che idrolizza le proteine producendo peptidi (Dia et al., 2014; Mandalari et al., 2009). Una volta uscito dallo stomaco il bolo raggiunge l'intestino. In quest'ultimo vi è un ambiente prossimo alla neutralità nel

quale ci sono i sali biliari e diversi enzimi proteolitici prodotti dal pancreas (pancreatina) (Hernández-Ledesma et al., 2007). L'azione della pepsina e della pancreatina porta alla formazione di peptidi che vengono assimilati a livello intestinale attraverso la membrana apicale dei microvilli, nella quale sono localizzati gli enzimi e i sistemi di trasporto critici per l'assorbimento dei nutrienti (Bjorkman and Brigham, 1990).

Studiare quanto avviene durante il processo di digestione è utile per conoscere il destino o l'origine di alcune sostanze che potrebbero influenzare la salute del consumatore. Infatti, una patologia che colpisce circa l'1% della popolazione mondiale, nota come celiachia, è provocata dall'ingestione di alimenti contenenti glutine, oltre che dalla predisposizione genetica del singolo individuo (genotipi HLA-CD) (Catassi et al., 2015b; Lionetti et al., 2015). Essa si manifesta con sintomatologia extra- o intra-enterica, provocando spesso il danneggiamento delle cellule dell'epitelio intestinale. La malattia è innescata dalla presenza di specifici frammenti provenienti principalmente dalle α -gliadine e secondariamente dalle HMW-GS (Gilissen et al., 2014). Questi frammenti, sono peptidi costituiti da una sequenza di nove amminoacidi che provengono dalle proteine ricche in prolina e glutammina (prolamine), che sono resistenti alla digestione (Bethune and Khosla, 2008). Pertanto, è stato ipotizzato che le gliadine pur difficilmente idrolizzabili dagli enzimi gastroenterici, rimangano immunologicamente inattive nella maggior parte delle persone. Nei pazienti celiaci, però, ci potrebbero essere specifiche microflora a livello dell'intestino tenue che sarebbero capaci di sintetizzare enzimi (gliadinasi), che idrolizzando le gliadine predisporrebbero il paziente a manifestare la patologia (Bernardo et al., 2009). Esistono, inoltre, varie forme di allergia al frumento che affliggono tra l'1 e il 6% della popolazione mondiale (Young et al., 1994). Esse sono causate da diverse specie proteiche (ω_5 -gliadine, inibitori delle α -amilasi e della tripsina, proteine di trasporto aspecifiche dei lipidi) che provocano una risposta immunitaria di tipo IgE-mediato che può causare reazioni indesiderate a carico dell'apparato respiratorio, gastro-intestinale e della pelle (Gilissen et al., 2014; Pastorello et al., 2007).

Solo recentemente è stata poi descritta un'altra patologia correlata all'ingestione delle gliadine del frumento denominata sensibilità al glutine (Gluten Sensitivity) (Sapone et al., 2010). Essa si manifesta con sintomatologia intra- ed extra-intestinale. Tuttavia, al momento non sono disponibili molte informazioni su questa sindrome tant'è che la

diagnosi viene eseguita per esclusione della celiachia e dell'allergia al frumento (Catassi et al., 2015a).

1.3.2 Studi di digeribilità: modelli *in vivo* e *in vitro*

Gli studi sulla digeribilità degli alimenti possono essere condotti utilizzando dei modelli *in vivo* o *in vitro*. I modelli *in vivo* prevedono l'impiego di animali o di esseri umani e, tendenzialmente, sono considerati più accurati di quelli *in vitro*, ma sono anche più dispendiosi in termini di tempo e denaro. Inoltre, l'apporto di proteine, amido e lipidi nella dieta influenza la secrezione dei corrispondenti enzimi idrolitici (proteasi pancreatiche, amilasi e lipasi) nel singolo individuo, rendendo difficile la standardizzazione dei modelli *in vivo* (Boisen and Eggum, 1991). Per questa ragione gli approcci *in vitro* sono ritenuti gli standard di riferimento per lo studio dei processi digestivi nell'uomo ed è stato dimostrato che essi sono correlabili con gli esperimenti *in vivo*, nonostante sia difficile riprodurre completamente quanto avviene nell'uomo o nell'animale (Kopf-Bolanz et al., 2012; Wickham et al., 2009; Boisen and Eggum, 1991). Un esperimento *in vitro* può essere condotto staticamente o dinamicamente. I modelli dinamici sono più aderenti alla realtà rispetto a quelli statici perché consentono di rimuovere i prodotti della digestione fintanto che il processo è attivo e permettono di mimare alcuni fenomeni fisici che avvengono *in vivo* (miscelazione, agitazione, mutamento di alcune condizioni operative, etc.) (Wickham et al., 2009). Tuttavia, nella messa a punto di un sistema di digestione artificiale bisognerebbe tener conto dei fattori che influenzano l'attività dell'enzima. Tra questi vi rientrano: la concentrazione del biocatalizzatore, la temperatura, il pH, la stabilità, la presenza di attivatori o di inibitori e il tempo d'incubazione (Boisen and Eggum, 1991). Gli enzimi utilizzati, la loro concentrazione ed il tempo di digestione dipendono anche dalle caratteristiche del campione e dai parametri da misurare. Inoltre, qualora si dovessero utilizzare più enzimi, è preferibile impiegarli in sequenza anziché miscelarli contemporaneamente perché così facendo si riproduce più fedelmente ciò che succede *in vivo*. Per queste ragioni, la maggior parte degli studi di digeribilità che utilizzano la pepsina e la pancreaticina riproduce in un primo momento il tratto gastrico e secondariamente quello intestinale, mantenendo in vigore l'intero processo digestivo per due ore a 37 °C (Hur et al., 2011). Va ricordato, in oltre, che uno studio *in vitro* ideale dovrebbe fornire risultati affidabili in tempi rapidi (Coles et al., 2005).

2. SCOPO DELLA TESI

Nonostante la forza degli impasti sia stata un obiettivo fondamentale per il miglioramento genetico del frumento, attualmente non sono stati pubblicati studi che abbiano cercato di correlare tale parametro con la digeribilità delle farine (Belderok, Mesdag e Donner, 2000; Huang et al., 2013). Per giunta, sembra che anche in futuro la forza delle farine rimarrà una caratteristica importante per la selezione del grano (Swanston et al., 2012). Quindi, poiché l'aumento della forza delle farine passa necessariamente per una modificazione delle caratteristiche strutturali del glutine (essenzialmente un aumento del contenuto in polimeri gluteninici e del loro grado di polimerizzazione) è di fondamentale importanza conoscere come questo possa aver influenzato la digeribilità delle farine in relazione alla loro forza, anche per spiegare l'aumento delle patologie legate all'ingestione di prodotti derivati dal frumento (celiachia, allergia al frumento, sensibilità al glutine). In assenza di studi approfonditi su questi aspetti, dovuti anche all'assenza di un metodo al contempo semplice e in grado di dare informazioni sull'andamento della digestione in termini di prodotti generati da questo processo, lo scopo di questa tesi è stato quello di mettere a punto un metodo d'indagine per valutare la digeribilità delle farine, la cromatografia liquida ad esclusione molecolare, dei digeriti ottenuti dopo diversi tempi di digestione. Inoltre, una volta definita la metodica analitica, si sono volute confrontare le digeribilità di due farine ottenute da due varietà di grano tenero a diversa forza (W).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campioni

Le due farine utilizzate sono state ottenute macinando nello stesso modo la granella delle cultivar antiche di grano tenero (*Triticum aestivum*) Inallettabile e Palesio. Entrambi i campioni sono stati trattati come descritto di seguito.

3.2 Estrazione delle proteine dalla farina

L'estrazione delle proteine dai campioni di farina è stata eseguita impiegando, in sequenza, solventi differenti, in modo di ottenere frazioni diverse, che sulla base della solubilità possono essere distinte in proteine solubili (albumine e globuline, solubili in soluzioni saline); e prolamine (glidine e glutenine).

Per l'estrazione delle proteine sono state utilizzate le soluzioni riportate di seguito:

- SOLUZIONE A: NaCl 0,5 M;
- SOLUZIONE B: 80 mM Tris-HCl pH 8,0, isopropanolo 50% (v/v), 20 mM DTT;
- SOLUZIONE C: 0,33 M Tris-HCl pH 7,4, SDS 2% (p/v), glicerolo 10% (p/v);
- SOLUZIONE D: 25 mM Tris-HCl pH 8,3, urea 6M, SDS 2% (p/v).

Gli estratti ottenuti sono stati analizzati mediante SDS-PAGE, come descritto nel paragrafo 3.3.

3.2.1 Estrazione delle albumine e delle globuline

Ciascun campione di farina è stato estratto con soluzione A, in rapporto 1:10 (p/v), e successivamente posto in agitazione per un'ora a temperatura ambiente. L'estratto così ottenuto è stato centrifugato a 10000 g per 15 minuti e il supernatante limpido è stato stoccato a -20 °C. La frazione costituisce dunque l'insieme delle albumine e delle globuline (proteine solubili).

3.2.2 Estrazione delle prolamine

Al pellet ottenuto dopo l'estrazione della frazione solubile è stato estratto con la soluzione B in rapporto 1:10 (p/v), in agitazione per 12 ore a temperatura ambiente. La sospensione è stata quindi centrifugata a 10000 g per 15 minuti. Il surnatante è stato poi precipitato con acetone al 90% in rapporto 1:9 (v/v). Il pellet così ottenuto (prolamine) è stato ripreso con 2,5 mL di soluzione C, aliquotato e conservato a -20°C.

3.2.3 Estrazione delle proteine totali

A 100 mg di farina sono stati aggiunti 4 mL di soluzione D. Il campione è stato poi trattato a 100°C per 5 minuti e successivamente centrifugato a 10000 g per 20 minuti. Il surnatante, contenente le proteine totali (solubili e insolubili in acqua), è stato aliquotato e conservato a -20°C.

3.3 Separazione elettroforetica delle proteine della farina

Gli estratti proteici ottenuti come descritto sono stati diluiti in rapporto 1:3 con una soluzione tampone 0,6 M Tris-HCl pH 7,4 contenente SDS 8 % (p/v), glicerolo 20 % (p/v) ed è stato aggiunto il 5% di β -mercaptoetanolo e, successivamente, bolliti per 5 minuti. I campioni sono stati analizzati mediante SDS-PAGE al 15% di acrilamide (Pasini et al., 2001) a 52 mA costanti in un apparato elettroforetico Mini Protean 3 (Biorad). Come standard sono state utilizzate proteine a peso molecolare noto (Low molecular weight standards, Biorad) costituite da: fosforilasi B (97,4 kDa), albumina bovina (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrasi carbonica (31 kDa), tripsina della soia (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

Al termine della corsa elettroforetica, i gel ottenuti sono stati colorati con blu di Comassie (Koenin et al., 1970).

3.4 Determinazione del contenuto proteico

Il contenuto proteico totale dei campioni è stato determinato mediante quantificazione dell'azoto inorganico dopo mineralizzazione dei campioni. A 120 mg di farina (peso

umido) sono stati aggiunti 4 mL di acido solforico concentrato e, successivamente, goccia a goccia, 16 mL di acqua ossigenata (35 volumi) così da convertire l'azoto proteico in ione ammonio (azoto totale). Il sistema per la mineralizzazione (Hach Digesdahl) è stato mantenuto alla temperatura di 440 °C. Al termine di tale processo è stata ottenuta una soluzione, portata poi a 100 mL. Essa è stata fatta reagire, per dieci minuti, in rapporto 1:1 (v/v) con il reattivo di Nessler (4803 - Labochimica S.R.L.). Esso, legandosi stechiometricamente con lo ione ammonio (prodotto durante la mineralizzazione) determina una colorazione giallastra la cui intensità è stata misurata con spettrofotometro UV-Vis (Perkin-Elmer) impostato alla lunghezza d'onda di 425 nm. La concentrazione di azoto totale è stata calcolata con retta di taratura e convertita in contenuto proteico totale impiegando il fattore di conversione 5,7 (tipico dei cereali).

3.5 Digestione *in vitro*

Ogni campione di farina è stato digerito *in vitro* al fine di mimare quanto avviene durante la digestione umana. Ciascuna prova è stata compiuta in triplo partendo da 120 mg di farina. Ad una prima fase di digestione gastrica, di trenta minuti (T_{30}), è seguita una seconda di digestione duodenale, protratta per novanta minuti (T_{90}).

Per questi esperimenti sono state utilizzate le seguenti soluzioni:

- soluzione 1: 0,2 M acido cloridrico pH 2,2;
- soluzione 2: 1 M acido borico pH 6,8;
- soluzione 3: acido tricloroacetico (Sigma) al 20% (p/v);
- soluzione 4: soluzione 1 contenente 0,05 mg/mL di Pepsina di suino (P6887-1G Sigma);
- soluzione 5: soluzione 2 contenente 0,25 mg/mL di Pancreatina da pancreas suino (P1750 - Sigma). Quest'ultima soluzione contiene tripsina, amilasi, lipasi, ribonucleasi e proteasi.

Per ottenere il campione al tempo zero (T_0), alla farina sono stati aggiunti 8 mL di soluzione 4 e 2,3 mL di soluzione 2 con ghiaccio con lo scopo di impedire l'azione della pepsina.

Per preparare il campione dopo trenta minuti di digestione gastrica (T_{30}), dopo aver aggiunto 8 mL di soluzione 4 alla farina, si è proceduto agitando a 127 rpm a 37°C e,

al termine dei trenta minuti previsti, l'attività della pepsina è stata bloccata alzando il pH con 2,3 mL di soluzione 2 in ghiaccio.

Per ottenere il digerito dopo i novanta minuti di digestione duodenale (T_{90}), la farina ha subito una prima fase di digestione gastrica, (vedi sopra), per essere poi addizionata di 2,3 mL di soluzione 5, agitando a 127 rpm a 37 °C per novanta minuti, dopo i quali la pancreatina è stata inattivata mediante l'aggiunta di 100 μ L di acido solforico concentrato.

Ciascun digerito (T_0 , T_{30} e T_{90}) è stato centrifugato a 10000 g per trenta minuti a 4 °C. Inoltre, per ottenere le frazioni solubili e insolubili in acido tricloroacetico (TCA), il surnatante del digerito al tempo T_{90} è stato addizionato, in rapporto 1:1 (v/v), con soluzione 3. I campioni sono stati stoccati a 6°C per un'ora per poi essere centrifugati a 10000 g, per trenta minuti e a 4°C. Successivamente, il pellet, contenente le proteine e i peptidi insolubili in TCA, è stato ripreso con 5 mL di soluzione 0,15 M di bicarbonato d'ammonio a pH 7,5. A questo punto, sono state ottenute due soluzioni: una tal quale (non ridotta) e un'altra ridotta tramite l'aggiunta di 10 mM di 1,4 – Dithio-D,L-treitolo (DTT) (Sigma).

Le due soluzioni così ottenute e i surnatanti dei digeriti ai tempi T_0 , T_{30} e T_{90} sono state quindi analizzate in cromatografia liquida ad esclusione molecolare.

3.6 Cromatografia liquida ad esclusione molecolare

Le determinazioni analitiche condotte in cromatografia liquida ad esclusione molecolare sono state eseguite impiegando il sistema Akta Purifier (GE Healthcare) dotato di colonna Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare). Tale colonna consente di separare specie proteiche aventi pesi molecolari compresi tra 100 e 7000 Da. Come fase eluente è stata impiegata una soluzione 0,15 M di bicarbonato d'ammonio pH 7,5 preventivamente filtrata con filtri a membrana in estere di cellulosa da 0,45 μ m (Whatman) e successivamente degassata, per 5 minuti, tramite sonicazione (Bandelin Sonopuls, GM 200).

Il metodo prevedeva l'utilizzo di un loop di iniezione da 2 mL e un flusso costante di 0,5 mL/min.

Al fine di correlare la massa molecolare relativa degli analiti con il volume di eluizione è stata condotta, in triplo, una corsa cromatografica con una miscela dei seguenti standard diluiti in fase mobile:

- Aprotinina 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Aprotinin from bovine lung MM 6511,44 g/mol, A3886-1VL, Sigma);
- L-tirosil-L-fenilalanina 1 mg/mL (MM 328,4 g/mol, T-5379, Sigma);
- L-fenilalanina 0,2 mg/mL (phenilalanine MM 165,19 g/mol, P-2126, Sigma);
- Di-glicina 0,5 mg/mL (Diglycine MM 132,12 g/mol, G-12002, Sigma).

Tutti i campioni e gli standard, diluiti in rapporto 1:2 (v/v) con la fase eluente, prima dell'iniezione in colonna, sono stati filtrati con filtro a membrana in PTFE da 0,45 μm (Sartorius).

Per la determinazione degli analiti è stato utilizzato un rilevatore spettrofotometrico UV a 214 nm e l'analisi dei risultati è stata condotta con il software Unicorn 5.20.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Campioni

I campioni di farina di grano tenero (*Triticum aestivum*) provenivano da due cultivar differenti: Inallettabile (di seguito identificato come campione A) e Palesio (di seguito identificato come campione B). Essi differivano per il parametro alveografico W che era pari a 52 nella cv. Inallettabile ed a 166 nella Palesio. Le due farine divergevano poco per il contenuto proteico totale (N X 5,7) (metodo Hach) che nella cv. Inallettabile era del 12,93 % mentre per la Palesio del 13,45 %. Il contenuto in acqua dei due campioni era pure simile: per la cv. Inallettabile si attestava all'11,72 % mentre per la Palesio era dell'11,76 %.

Da questi dati si può dunque dedurre che le due farine davano impasti che, pur presentando i bassi valori di W tipici dei grani antichi, comunque differivano molto per forza (W 52 di A contro 166 di B), pur in presenza di contenuti proteici e di umidità praticamente uguali.

4.2 Caratterizzazione elettroforetica del pattern proteico delle farine

Il pattern proteico dei campioni è stato preliminarmente caratterizzato mediante SDS-PAGE, analizzando sia le tre classi proteiche (proteine solubili e prolamine) ottenute per estrazione sequenziale dalle farine sia le proteine totali dei campioni A (Figura 4.2.1) e B (Figura 4.2.2). Dal confronto dei profili elettroforetici delle proteine non emergono differenze qualitativamente significative tra le due farine. Infatti, le proteine totali, la frazione solubile (albumine e globuline) e anche quella insolubile (prolamine) dei due campioni sono paragonabili. Tuttavia nel campione B si nota una maggior quantità di proteine del glutine (subunità gluteniniche ad alto peso molecolare, con P.M. intorno ai 100 kDa, e a basso peso molecolare, nel range 45-30 kDa) rispetto al campione A. Poiché la quantità di polimeri gluteninici, formati da suddette subunità, è collegata alla forza delle farine (Belitz et al., 2009) la maggior quantità di subunità gluteniniche ad alto e a basso peso molecolare riscontrabile nel campione B dà una spiegazione della sua maggiore forza.

In entrambi i casi si possono riscontrare modeste quantità relative delle specie proteiche con P.M. inferiori a 30 kDa. Queste bande proteiche sono soprattutto

riconducibili agli inibitori delle alfa amilasi, che in realtà, sono da considerare proteine solubili (Zoccatelli et al., 2012). La loro presenza nella frazione prolaminica si giustifica con il fatto che queste proteine si trovano intrappolate nei polimeri gluteninici insolubili (Belitz et al., 2009).

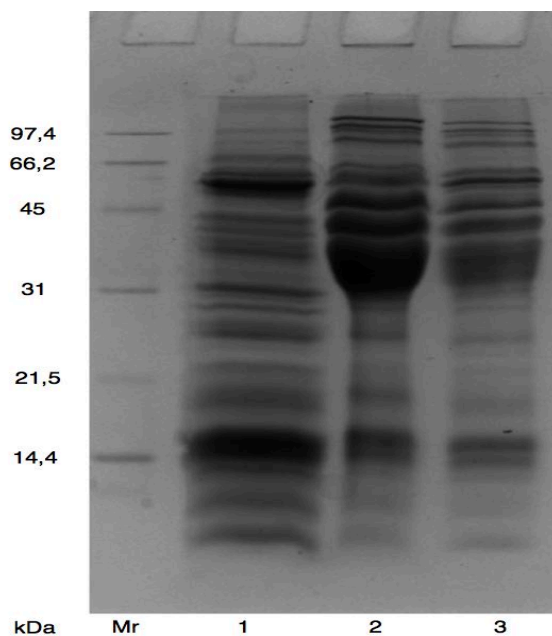


Figura 4.2.1: SDS-PAGE del pattern proteico del campione A: **Mr**) standard a peso molecolare noto; **1**) proteine solubili (albumine e globuline); **2**) proteine insolubili (prolamine); **3**) proteine totali.

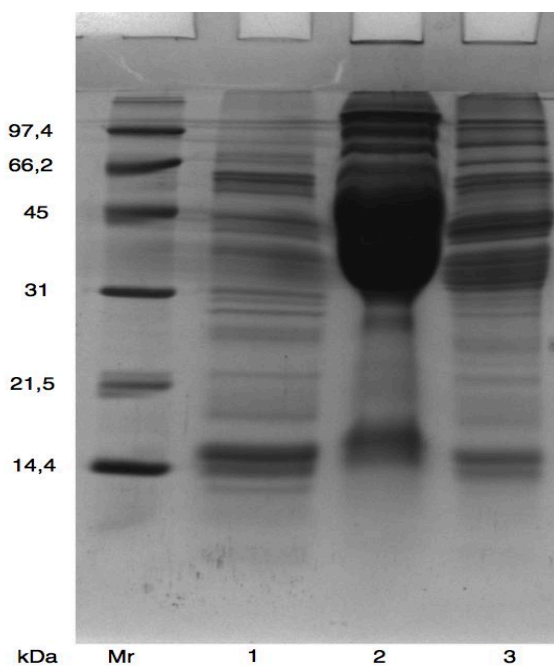


Figura 4.2.2: SDS-PAGE del pattern proteico del campione B: **Mr**) standard a peso molecolare noto; **1**) proteine solubili (albumine e globuline); **2**) proteine insolubili (prolamine); **3**) proteine totali.

4.3 Messa a punto del metodo cromatografico

Al fine di poter definire le variazioni di peso molecolare derivanti dal processo di digestione *in vitro* delle proteine delle farine, si è sviluppato un metodo basato sulla cromatografia ad esclusione molecolare (SE-FPLC).

Per correlare la massa molecolare relativa (MM_r) degli analiti con il volume di eluizione (V_e) è stata preliminarmente effettuata una calibrazione utilizzando standard a peso molecolare noto. Questi standard comprendevano la pepsina (dalla mucosa gastrica di suino) che ha un peso molecolare (36 kDa) tale da non essere trattenuto dalla colonna utilizzata e che quindi è stata utilizzata per determinare il volume vuoto (V_0); la aprotinina bovina (6511,44 Da); il dipeptide L-tirosil-L-fenilalanina (328,4 Da), utile per definire peptidi a peso molecolare inferiore a 400 Da; l'aminoacido L-fenilalanina (165,19 Da); il dipeptide glicil-glicina (diglicina, 132,12 Da), prossimo al limite inferiore di separazione della colonna. Osservando la Figura 4.3.1 si può notare che la pepsina e gli standard eluiscono correttamente in ordine decrescente di peso molecolare. Su questa base il profilo di eluizione è stato suddiviso in tre aree in funzione al peso molecolare delle molecole eluite: alto (> 6511 Da), medio (6511 - 328 Da) e basso (< 328 Da).

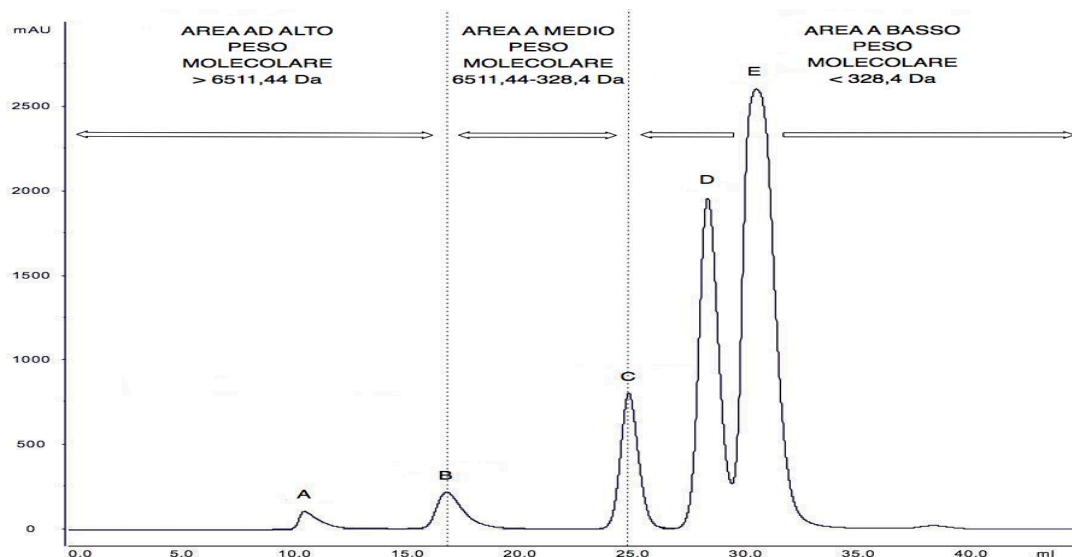


Figura 4.3.1: Cromatogramma ottenuto dalla separazione per gel filtrazione su colonna ad esclusione molecolare di standard a diverso peso molecolare: **A**) pepsina (da mucosa gastrica porcina MM 36 kDa, 0,05 mg/mL; **B**) aprotinina (bovina MM 6511,44 Da, 20 μ L/mL; **C**) L - tirosil - L - fenilalanina (MM 328,4 Da, 1 mg/mL); **D**) L - fenilalanina (MM 165,19 Da, 0,2 mg/mL); **E**) diglicina (MM 132,12 Da, 0,5 mg/mL).

Il grafico proposto in Figura 4.3.2 evidenzia che il logaritmo del peso molecolare degli standard (e quindi degli analiti) è correlato, con proporzionalità inversa, al volume di eluizione relativo (V_e/V_0). Esso è caratterizzato dalla presenza di una curva semilogaritmica, con pendenza negativa, il cui tratto iniziale, corrispondente alle proteine con peso molecolare compreso tra quello dell'aprotinina bovina (6511,44 Da) e dell'L-tirosil-L-fenilalanina (328,4 Da), è lineare mentre quello finale, in cui eluiscono la L-fenilalanina (165,19 Da) e la glicil-glicina (132,12 Da), non è lineare. Ciò indica che la colonna è in grado di separare meglio le specie proteiche con peso molecolare compreso tra circa 6500 e 330 Da.

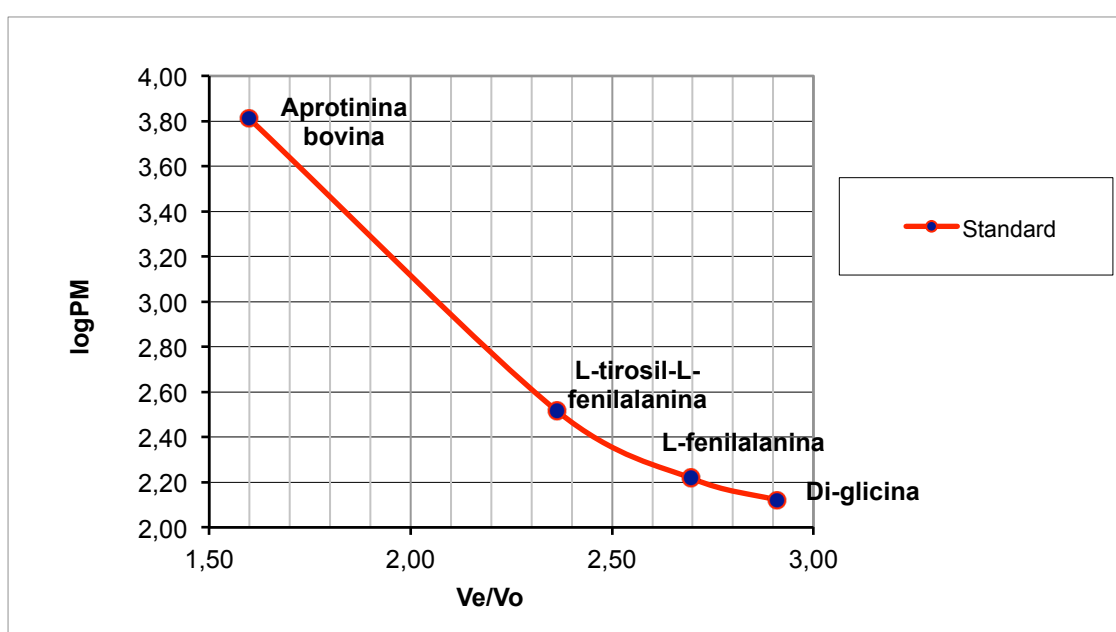


Figura 4.3.2: correlazione, inversamente proporzionale, tra il logaritmo del peso molecolare degli standard con il volume di eluizione relativo (V_e/V_0).

4.4 Messa a punto del metodo per la digestione *in vitro*

Una volta calibrata la colonna, si è proceduto con la messa a punto della digestione *in vitro*. Quest'ultima è stata ideata in due fasi consecutive: gastrica e duodenale (De Zorzi et al., 2007).

Per la sola messa a punto del metodo sono riportati esclusivamente i dati relativi al campione B.

Tutti i campioni digeriti sono stati analizzati in condizioni non riducenti in maniera da preservare sia i ponti disolfuro nei polimeri gluteninici di partenza sia i legami

intramolecolari delle gliadine.

La digestione gastrica è stata sviluppata col metodo descritto da Pasini et al. (2001). Tale metodo prevede un primo trattamento (di 30 minuti) in condizioni simili a quello dello stomaco (digestione gastrica, trattamento con pepsina a pH acido) cui segue un secondo trattamento (di 90 minuti) in condizioni che mimano quelle dell'intestino (digestione duodenale, trattamento con pancreatina a pH neutro).

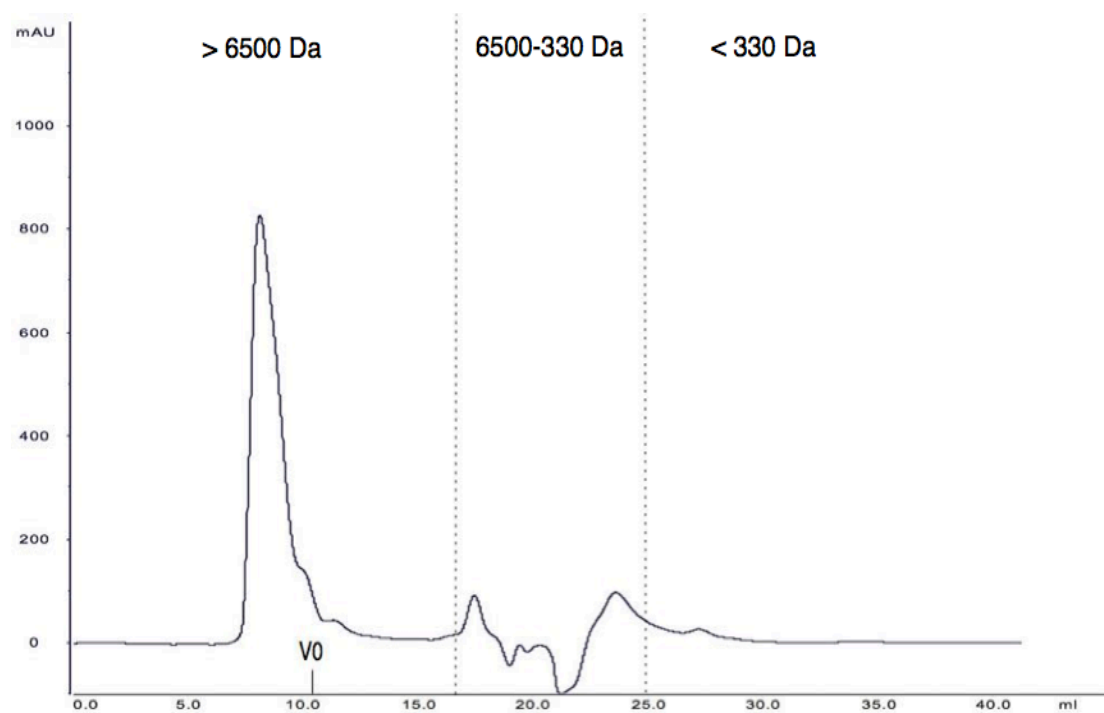
La digestione è stata condotta su campioni di farina che venivano dispersi nel tampone appropriato per le due diverse fasi. L'analisi dei prodotti della digestione veniva effettuata sul surnatante, poiché, per definizione, questi devono passare nella fase solubile, date le loro ridotte dimensioni.

La Figura 4.4.1 mostra il confronto tra il tracciato cromatografico del tempo T_0 (**a**) con quello del tempo T_{30} (**b**). Il campione T_0 rappresenta la frazione solubile prima della digestione, mentre il T_{30} rappresenta i peptidi che si generano dall'azione della pepsina. Nel T_0 (**a**) il picco più elevato (circa 800 mAU) eluisce con V_e inferiore al V_0 perché contiene sia la componente proteica solubile in acido cloridrico della farina (peso molecolare superiore a circa 6500 Da), che non è stata digerita, sia la pepsina aggiunta (36 kDa). Si notano, inoltre, altri picchi minori in un range di peso molecolare compreso tra circa 6500 e 330 Da, che potrebbero rappresentare specie molecolari a basso peso molecolare già presenti nella farina.

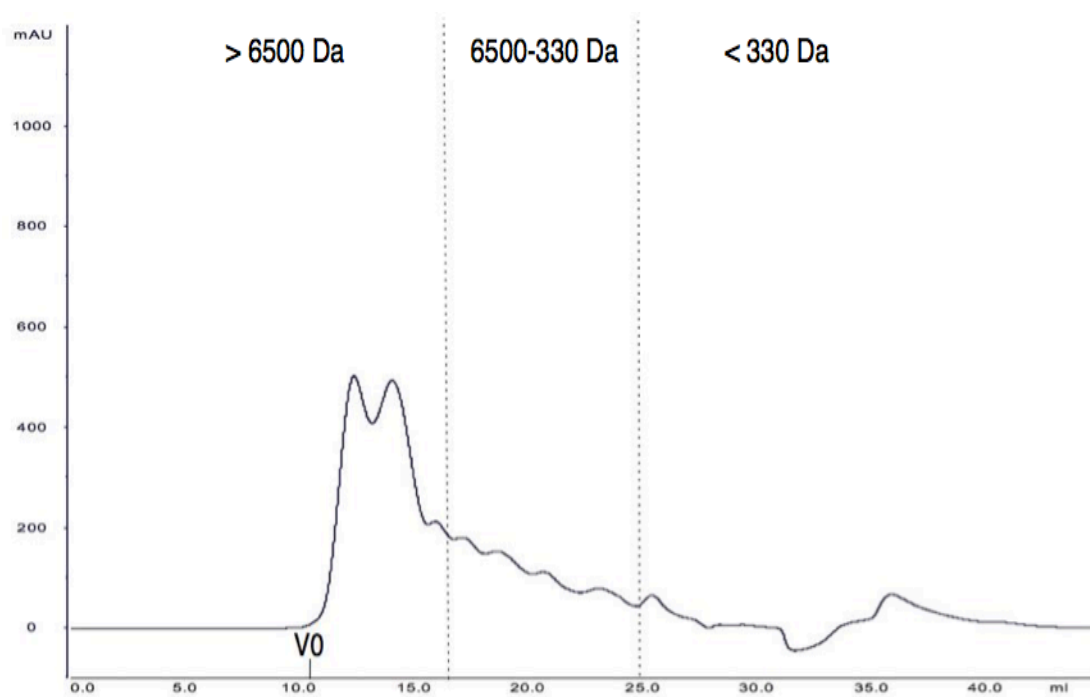
Dopo i trenta minuti di digestione gastrica (**b**) si evidenzia chiaramente l'effetto del processo digestivo *in vitro*. Infatti, il picco unico presente a livello di volume vuoto della farina non digerita (**a**) non è più presente, il che indica che l'attività proteolitica della pepsina sulle proteine solubili della farina. Si notano invece specie molecolari con volumi di ritenzione corrispondenti a pesi molecolari compresi tra circa 6500 e 330 Da. Queste specie costituiscono evidentemente i frammenti derivanti dalla idrolisi delle proteine. Tuttavia, come era prevedibile, in entrambi i cromatogrammi non è possibile distinguere picchi nettamente separati, ma piuttosto si nota il *continuum* di pesi molecolari tipico di una degradazione aspecifica di una miscela proteica complessa.

Bisogna considerare che anche il picco della pepsina è scomparso. Questo significa che l'enzima si autodigerisce nelle condizioni adottate (Perlmann, 1954), generando a

sua volta peptidi che vengono trattenuti dalla colonna.



a)



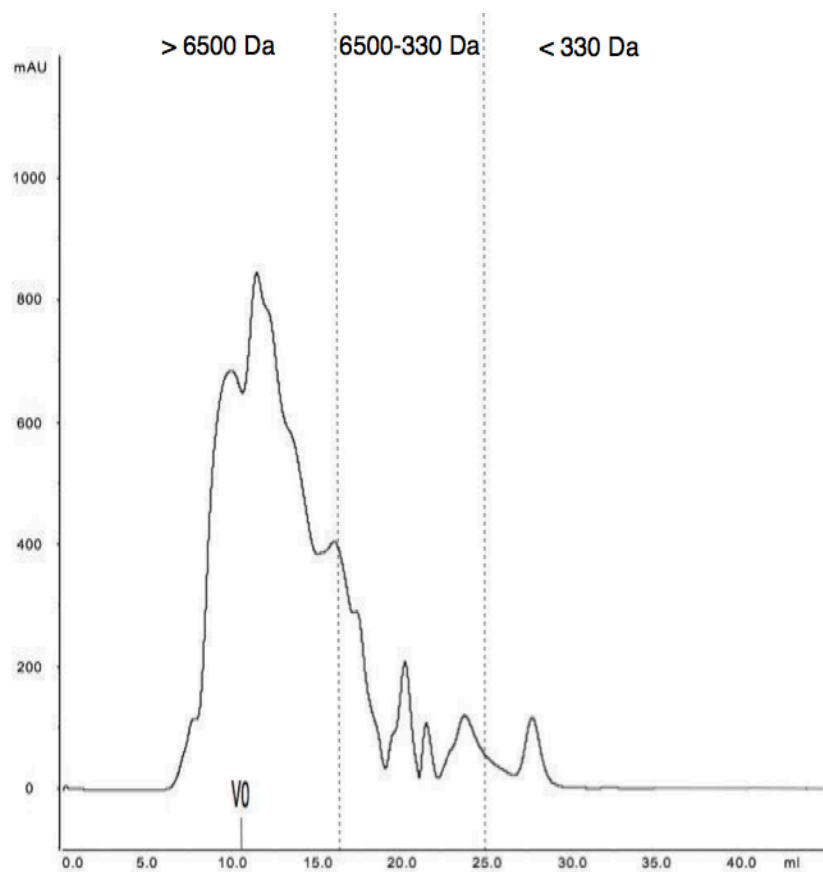
b)

Figura 4.4.1: cromatogramma ottenuto dalla separazione per gelfiltrazione della farina B ai tempi di digestione T_0 (a) e T_{30} (b).

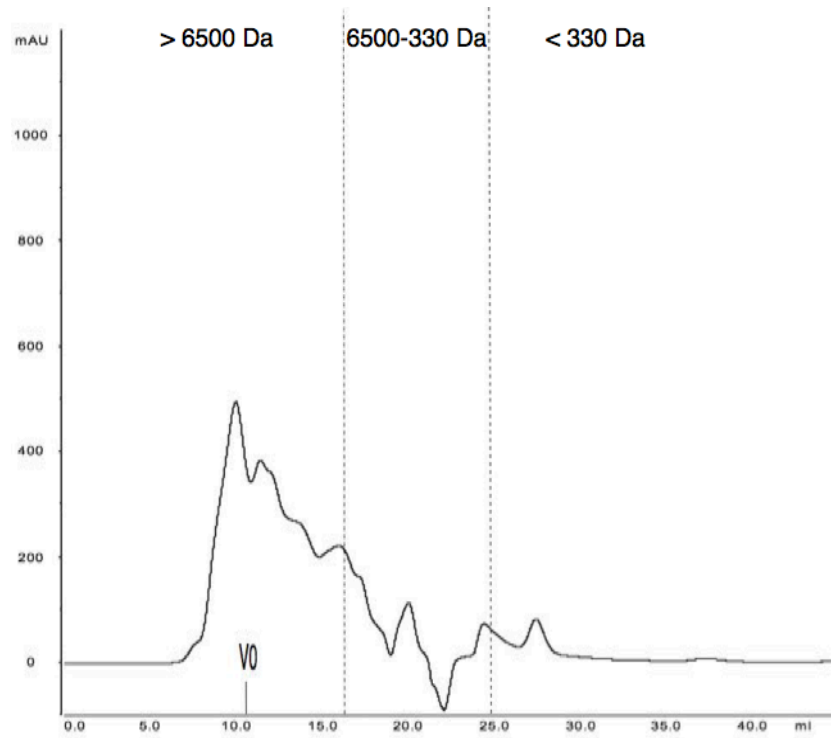
Per analizzare i prodotti della seconda fase della digestione *in vitro*, cioè quella intestinale, è stato necessario ottimizzare l'inattivazione della pancreaticina, al termine dei novanta minuti, in modo da poter bloccare la reazione esattamente dopo il tempo prestabilito ed avere risultati ripetibili. Per bloccare l'azione della pancreaticina dalla bibliografia risulta pratica diffusa trattare termicamente il campione con temperature prossime ai 100 °C per tempi variabili dai 5 ai 30 minuti in modo tale da denaturare gli enzimi (De Zorzi et al., 2007). Tuttavia, in qualche studio sono state adottate combinazioni di tempo e temperatura differenti come, ad esempio, 20 minuti a 75 °C (Dia et al., 2014). Alcune fonti riportano possibilità alternative all'inattivazione dell'enzima tramite il calore. Infatti, Kristó et al. (2010) utilizzano l'acido solforico mentre Lang e colleghi (2015) optano per il fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF), che è un inibitore delle serina proteasi. La scelta della modalità di denaturazione dell'enzima andrebbe compiuta tenendo conto di alcuni aspetti fondamentali: l'efficacia del trattamento, la preservazione della composizione del campione e la compatibilità con la tecnica analitica a valle.

Per queste ragioni si è preferito scartare gli inibitori delle proteasi in quanto il loro impiego avrebbe complicato eccessivamente il metodo, aumentandone, tra l'altro, inutilmente i costi e le tempistiche. Di conseguenza, sono state confrontate le seguenti vie alternative, i cui risultati sono mostrati in Figura 4.4.2: la bollitura a 100 °C per 5 minuti (**a**), il trattamento termico a 50 °C per 15 minuti (**b**) e l'aggiunta di acido solforico concentrato, acidificando sino a pH inferiore ad 1 (**c**). In quest'ultimo caso, differentemente dagli altri, si è reso necessario diluire il campione con fase mobile, in rapporto 1:2 (v/v), così da portare il pH all'interno dell'intervallo di tolleranza della colonna (pH 1-14). I tre profili sono caratterizzati da un picco esteso che eluisce all'altezza dei volumi di ritenzione delle proteine a peso molecolare superiore a circa 6500 Da, con segnale massimo di 800 mAU (**a**), 500 mAU (**b**) e 400 mAU (**c**). Il segnale è doppiamente più elevato in **a**) rispetto che in **c**) perché in quest'ultimo caso il digerito è stato diluito in due volumi mentre la differenza tra **a**) e **b**) denota che in quest'ultimo caso (**b**) l'enzima pancreatico non è stato denaturato. Il picco descritto è dato dalle proteine non degradate e da quelle parzialmente frammentate durante la digestione gastro-duodenale, dalla pepsina e dalla pancreaticina (che hanno peso molecolare superiore a circa 6500 Da). Tra l'altro, è proprio la presenza di quest'ultimo enzima ad aumentare l'ampiezza di detto picco rispetto al corrispettivo

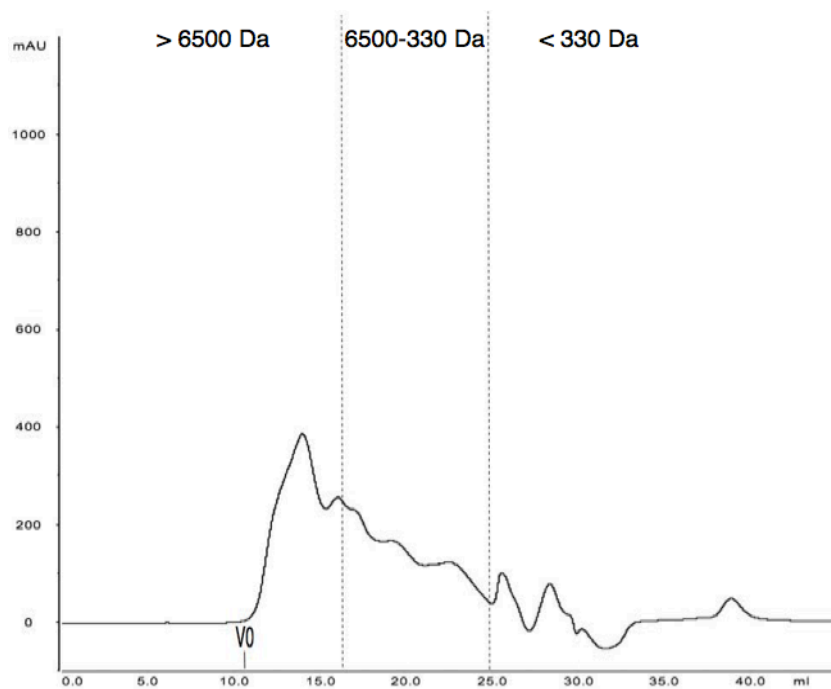
dei tempi di digestione T_0 (Figura 4.4.1a) e T_{30} (Figura 4.4.1b). Inoltre, in tutte le tre vie testate (**a**, **b** e **c**) sono state prodotte delle specie proteiche con peso molecolare compreso nell'intervallo di circa 6500 - 330 Da e, in quantità relativamente più bassa, dei peptidi con peso molecolare inferiore a circa 330 Da. Per queste ragioni si è preferito abbandonare l'opzione che prevedeva il trattamento termico a 50 °C per 15 minuti (**b**) mentre sono state considerate valide sia la bollitura a 100 °C per 5 minuti (**a**) che l'aggiunta di acido solforico concentrato (**c**).



a)



b)



c)

Figura 4.4.2: profilo cromatografico del campione B ricavato, dopo novanta minuti di digestione intestinale (T_{90}), inattivando l'enzima a 100 °C per 5 minuti (a), a 50 °C per 15 minuti (b) e con l'aggiunta di acido solforico concentrato sino a pH 1,5 e successivamente diluito in fase mobile in rapporto 1:2 (v/v) (c).

Quando si effettua un trattamento termico prossimo o superiore a 50 °C è possibile che avvenga la gelatinizzazione dell'amido (Carlstedt et al., 2015). Per la farina A, infatti, in entrambe le prove che prevedevano l'inattivazione della pancreaticina mediante calore (50 °C x 15 minuti e 100 °C x 5 minuti) è avvenuto tale fenomeno (Figura 4.4.3). Questo ha impedito la filtrazione del campione e la conseguente iniezione in colonna. Per questo motivo si è deciso di bloccare la fase di digestione duodenale impiegando l'acido solforico concentrato.

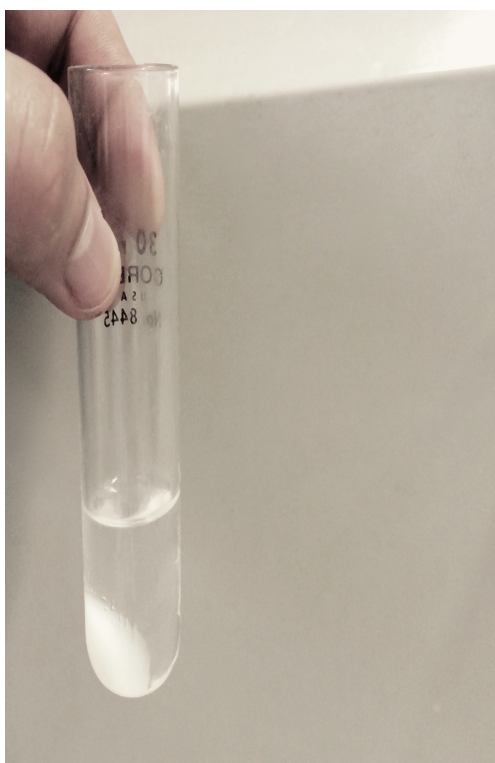


Figura 4.4.3: gelatinizzazione del campione A dopo l'inattivazione della pancreaticina con il trattamento termico a 50 °C x 15 minuti.

4.5 Cromatografia liquida ad esclusione molecolare dei digeriti di farina

Al fine di valutare se la diversa forza propria delle due farine abbia un effetto sulla digeribilità delle proteine in esse contenute, dopo aver stabilito il corretto protocollo d'indagine, è stata studiata la digeribilità dei campioni ai tre tempi di digestione T_0 (prima della digestione), T_{30} (dopo 30 minuti di digestione gastrica) e T_{90} (dopo digestione gastrica e pancreatica).

Nelle immagini presentate di seguito i profili cromatografici del campione A (in blu) sono stati confrontati con quelli del campione B (in rosso), calcolando la differenza

del segnale tra i due campioni (in verde).

Al tempo T_0 (Figura 4.5.1) entrambe le farine presentano un picco con V_e prossimo al V_0 , che denota la presenza di proteine con peso molecolare superiore a circa 6500 Da e della pepsina (36 kDa). Tale picco raggiunge le 800 mAU nel campione A mentre sfiora le 600 mAU in B. Questa differenza dipenderebbe dal fatto che i surnatanti dei digeriti al tempo zero sono delle soluzioni di acido cloridrico nelle quali sono presenti soltanto le proteine solubili in acqua (albumine) e in soluzioni saline (globuline) mentre dovrebbero essere assenti le prolamine perché, a causa del loro P.M. elevato, rimangono insolubili (MacRitchie, 1992). Tuttavia i più piccoli polimeri gluteninici e le gliadine possono essere solubili a pH acido (MacRitchie, 1992). Poiché la forza delle farine dipende dalla distribuzione del peso molecolare dei polimeri gluteninici e dalla loro quantità, si ammette che la percentuale dei polimeri piccoli e delle proteine solubili sia maggiore nelle farine deboli rispetto a quelle forti (Gupta et al., 1993). Quindi, se si ipotizza che i due campioni abbiano lo stesso valore di proteine totali (es. 100) ma che le stesse divergano per il rapporto tra proteine “piccole” (solubili e polimeri piccoli) e “grandi” (polimeri insolubili grandi) (es. 30/70 della debole contro 20/80 della forte) è evidente che se le farine vengono poste in soluzione, in quest’ultima vi saranno solamente le proteine “piccole”, che saranno quantitativamente maggiori nel caso della farina debole (30 contro 20). Dato che, invece, le specie proteiche ad alto peso molecolare (polimeri) sono quelle insolubili, responsabili della forza degli impasti, questo potrebbe spiegare perché, nel T_0 c’è un maggior contenuto proteico nella farina più debole (A) rispetto a quella più forte (B) (Figura 4.5.1). Nel medesimo profilo si notano altri due picchi, che eluiscono consecutivamente tra loro: uno con V_e che rientra nell’area delle sostanze a peso molecolare compreso tra circa 6500 e 330 Da e l’altro situato nell’area dei peptidi inferiori a circa 330 Da. Questi due picchi sono simili tra i due campioni poiché hanno gli stessi V_e e l’intensità del segnale è pressoché uguale (< 100 mAU).

Le aree sottese al grafico di ciascun campione differiscono per 334,86 mAU x mL.

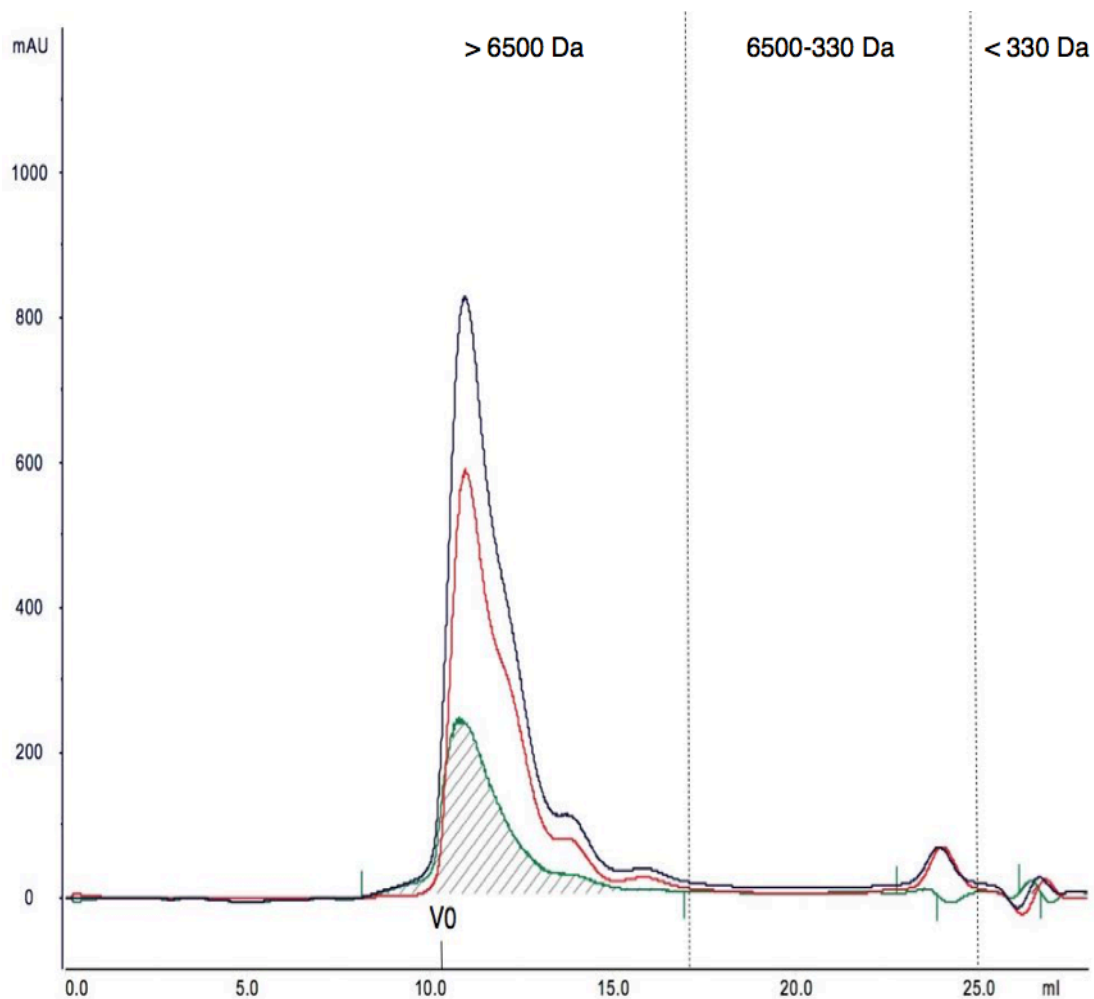


Figura 4.5.1: profili cromatografici dei campioni A (blu) e B (rosso) al tempo zero (T_0). La differenza del segnale tra i due campioni è mostrata in verde mentre l'area sottesa a essa ($334,86 \text{ mAU} \times \text{mL}$) è segnata con delle strisce oblique di color grigio.

La Figura 4.5.2 presenta il tracciato cromatografico delle due farine (A e B) dopo trenta minuti di digestione gastrica (T_{30}). Le proteine con V_e corrispondente alle specie proteiche con peso molecolare superiore a circa 6500 Da sono leggermente superiori nel campione più forte B (circa 500 mAU) rispetto al campione più debole A (circa 400 mAU). La digestione ha, inoltre, prodotto delle specie proteiche che eluiscono al volume di ritenzione dei composti a peso molecolare compreso tra circa 6500 e 330 Da. Tuttavia, in questo caso la produzione di dette sostanze risulta comparabile tra i due campioni. Queste piccole differenze non consentono di dedurre differenze certe di digeribilità tra i due campioni, anche se, pare che il rapporto tra specie $> 6,5 \text{ kDa}$ e specie $< 6,5 \text{ kDa}$ sia in favore della farina più forte, indicando un minor grado di degradazione a frammenti piccoli di quest'ultima. La differenza tra le

aree sottese ai grafici dei due campioni è pari a 258,66 mAU x mL.

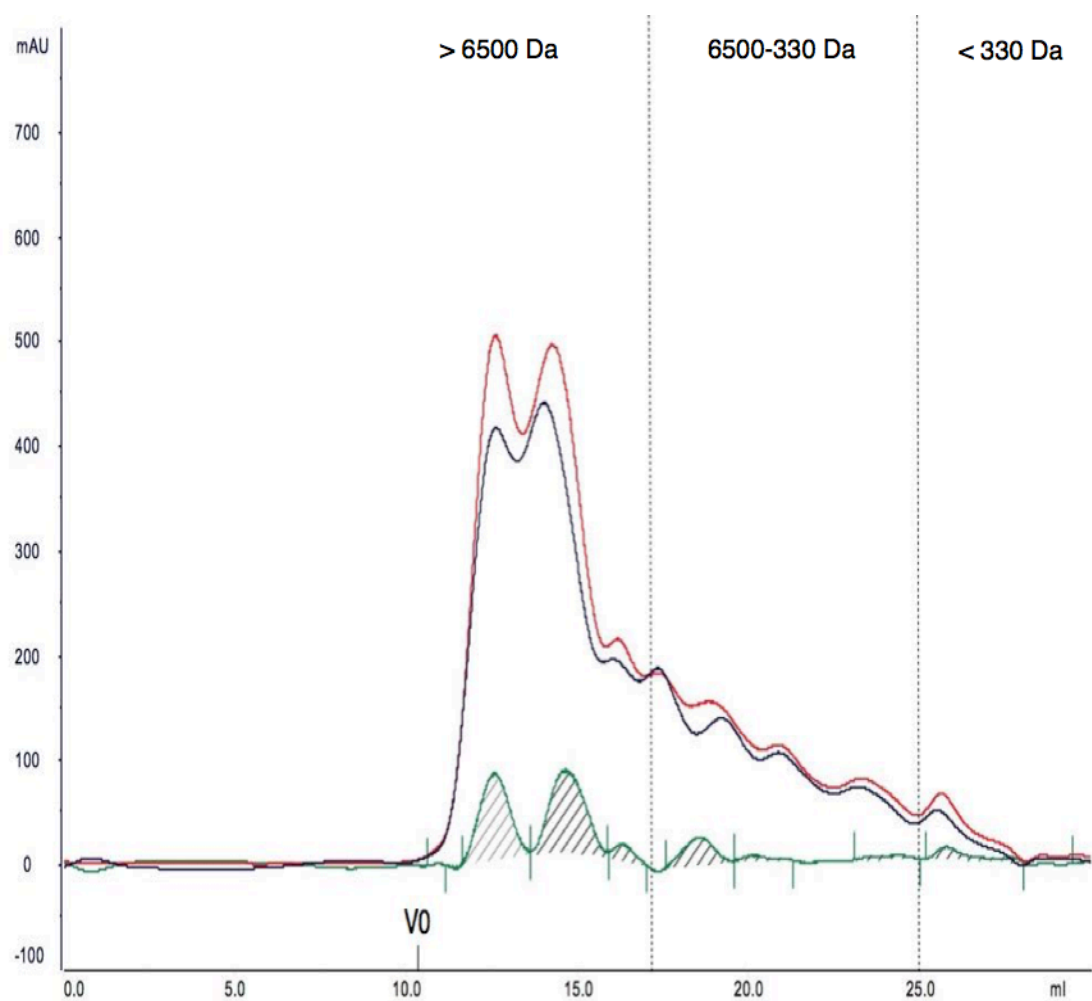


Figura 4.5.2: tracciati cromatografici dei campioni debole A (blu) e forte B (rosso) dopo trenta minuti di digestione gastrica (T_{30}). La differenza del segnale tra i due campioni è segnata in verde mentre l'area sottesa a essa (258,66 mAU x mL) è segnata con delle strisce oblique di color grigio.

I cromatogrammi dei digeriti dopo i novanta minuti di digestione duodenale (T_{90}) sono riportati in Figura 4.5.3. In entrambi i campioni, rispetto a quanto si nota alla fine della digestione pepsinica (Figura 4.5.2) avviene un certo spostamento del profilo cromatografico verso valori di peso molecolare inferiori, indicando che la digestione intestinale produce una ulteriore degradazione proteolitica dei frammenti generati dalla pepsina (Figura 4.5.3). Inoltre, nel caso della farina più forte B sembra che siano presenti una maggiore quantità di peptidi con pesi molecolari $> 6,5$ kDA, come dimostrato dal calcolo della differenza delle aree nella prima zona del cromatogramma (tratteggiato in verde nella figura). La differenza tra le due aree sottese alle curve cromatografiche è in questo caso di 1247,12 mAU x mL. Questo

risultato potrebbe indicare che i peptidi di dimensioni compatibili con quelle necessarie a dare risposte immunologiche è maggiore nella farina forte che in quella debole che sembrerebbe “resistere” di più alla degradazione.

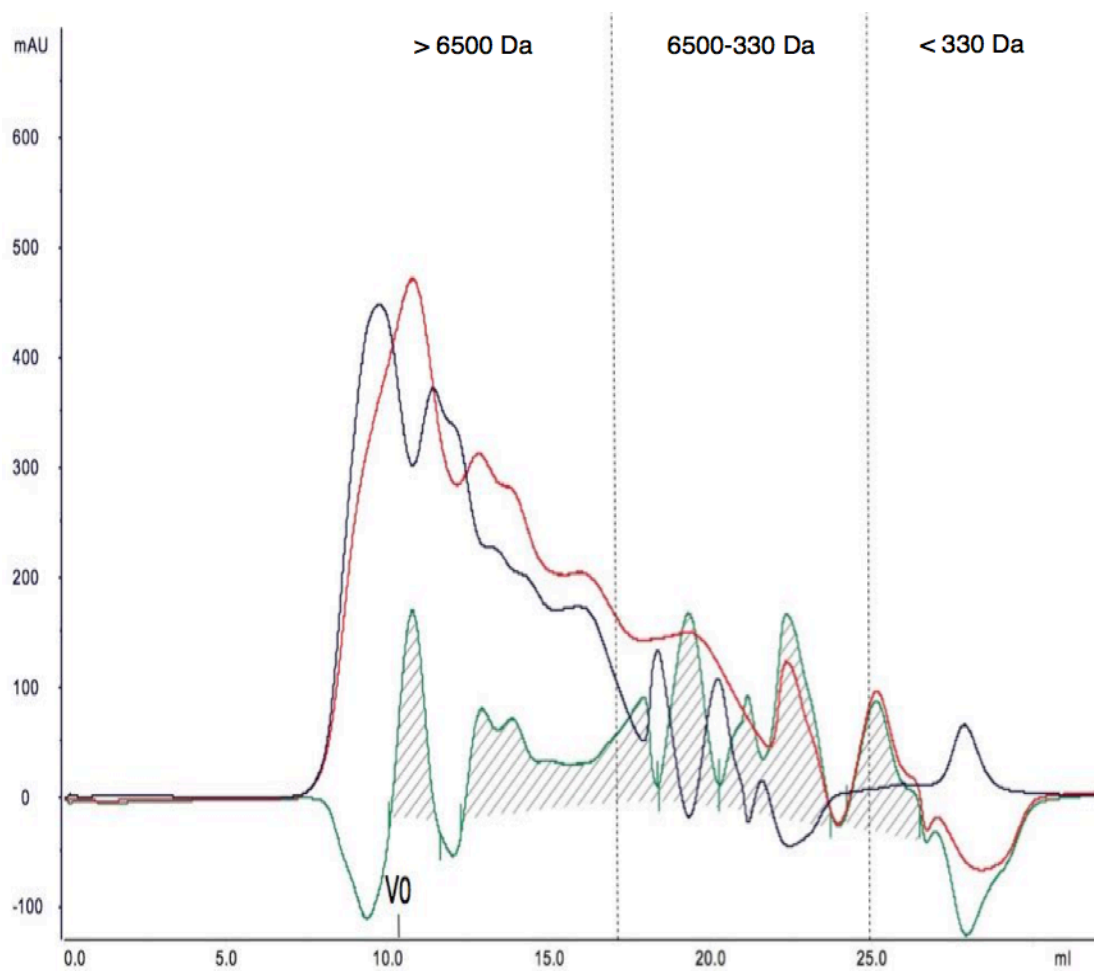


Figura 4.5.3: cromatogrammi dei campioni A (blu) e B (rosso) dopo novanta minuti di digestione duodenale (T_{90}). La differenza del segnale tra i due campioni è segnata in verde mentre l'area sottesa a essa (1247,12 mAU x mL) è segnata con delle strisce oblique di color grigio.

Tuttavia, la separazione delle specie peptidiche alla fine della digestione appare non del tutto chiara e facilmente interpretabile, data la notevole complessità delle frazioni ottenute. Per semplificare il sistema, il surnatante del digerito (contenente anche specie molto piccole, corrispondenti a dipeptidi o singoli aminoacidi) è stato quindi trattato con TCA (al 20 %) che, secondo la letteratura dovrebbe essere in grado di precipitare i frammenti proteici con peso molecolare superiore a 400 Da, lasciando in soluzione quelli più piccoli (Stoeva et al., 2000). Questi frammenti precipitati (i più grandi, di dimensioni superiori a 400 Da) sono di particolare interesse perché in grado

di determinare una risposta immunologica di tipo allergico (Bethune and Khosla, 2008), mentre quelli più piccoli difficilmente potrebbero essere coinvolti nella reticolazione delle IgE proprio a causa delle loro ridotte dimensioni che non consentono la compresenza di due epitopi IgE reattivi sulla stessa specie molecolare.

In effetti, la frazione precipitabile in TCA del digerito mostra un profilo cromatografico estremamente semplificato rispetto alla frazione totale, come si vede dal confronto della Figura 4.5.4 (frazione precipitabile in TCA) con la Figura 4.5.3 (digerito totale). In questo caso, infatti, appaiono solo le specie molecolari con pesi molecolari compresi tra il volume vuoto e 16 min., quindi con pesi molecolari inferiori a quelli di una proteina intera ma superiori a 6500 kDa. Al contrario non appaiono specie molecolari con pesi inferiori a quest'ultimo valore, il che sembra indicare che l'idea che il TCA precipiti i peptidi con pesi molecolari superiori a 400 Da (Stoeva et al., 2000) non sia valida in quanto peptidi di questo genere, pur presenti nel surnatante delle digestioni (Figura 4.5.3) non sono presenti nel cromatogramma della frazione insolubile in TCA (Figura 4.5.4). In ogni caso, la frazione ottenuta in questo modo dovrebbe contenere quei frammenti proteolitici che, in base alle dimensioni molecolari, potrebbero essere quelli coinvolti nelle risposte immunologiche a livello intestinale, non essendo né troppo piccoli (per contenere almeno due epitopi di qualche aminoacido ciascuno) né troppo grandi (per essere solubili). Dunque questa frazione potrebbe rappresentare quella maggiormente interessante per lo studio delle reazioni avverse al frumento.

Ricordando che le proteine del glutine sono in gran parte polimerizzate tramite legami disolfuro e che le condizioni della digestione non possono in alcun modo aver modificato questi legami, è concepibile che i frammenti proteolitici presenti nella frazione digerita insolubile in TCA (Figura 4.5.4) possano contenere peptidi ancora legati tra loro tramite ponti SS, importanti per mantenerne le dimensioni. Per verificare questo aspetto, la frazione precipitabile in TCA è stata analizzata anche dopo trattamento con un agente in grado di rompere i legami disolfuro (riducente) (DTT 10 mM). La frazione ridotta è stata quindi analizzata tramite cromatografia, nelle stesse condizioni usate nell'esperimento precedente (Figura 4.5.5). Questa analisi ha permesso di verificare che entrambi i campioni in ambiente riducente, mostrano che il picco con volume di eluizione delle proteine a peso molecolare

superiore a circa 6500 Da della Figura 4.5.4 (condizioni non riducenti) viene abbattuto drasticamente dopo riduzione. Inoltre, sempre in queste, si generano peptidi a minor peso molecolare (compreso tra circa 6500 e 330 Da), assenti nel cromatogramma ottenuto in condizioni non riducenti (cf. Figure 4.5.4 e 4.5.5). Questa situazione confermerebbe, quindi, quanto ipotizzato precedentemente, ossia che l'azione degli enzimi gastro-intestinali produce frammenti proteolitici composti da più peptidi che rimangono legati tra loro tramite i ponti SS originariamente presenti nei polimeri gluteninici. A questo punto, se si confrontano i profili cromatografici dei due campioni presentati in Figura 4.5.5 si nota che la farina più debole (A) è caratterizzata da una maggiore quantità peptidi con P.M. compreso tra circa 6500 e 330 Da e che la differenza tra le aree sottese ai due cromatogrammi è pari a 394,46 mAU x mL.

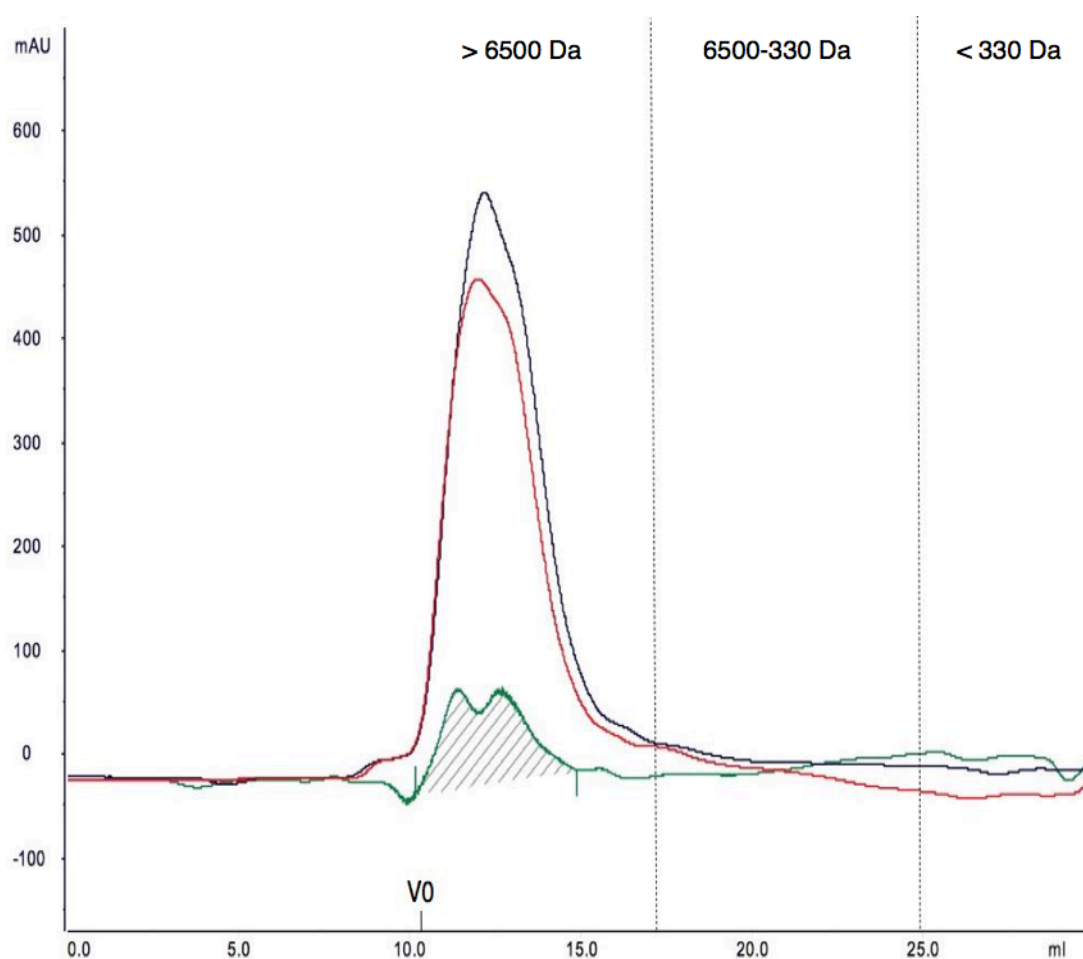


Figura 4.5.4: tracciati cromatografici dei campioni A (blu) e B (rosso) del pellet ripreso in fase mobile dopo i novanta minuti di digestione duodenale (T_{90}) e il trattamento con TCA al 20 % (v/v) del surnatante del digerito. La differenza del segnale tra i due campioni è segnata in verde mentre l'area sottesa a essa (245,49 mAU x mL) è segnata con delle strisce oblique di color grigio.

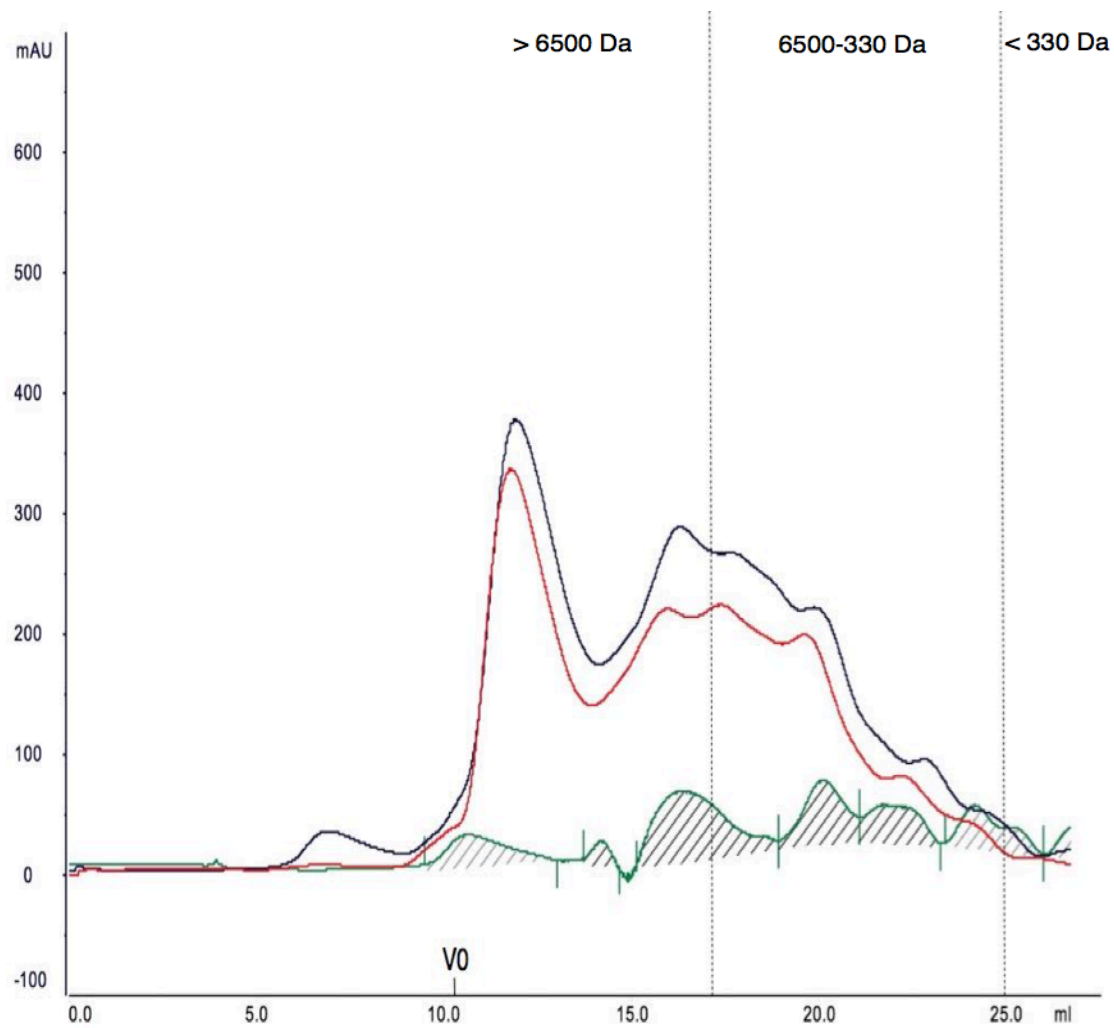


Figura 4.5.5: profili cromatografici dei campioni A (blu) e B (rosso) del pellet ripreso in fase mobile e ridotto con DTT 10 mM dopo i novanta minuti di digestione duodenale (T_{90}) e il trattamento con TCA al 20 % (v/v) del surnatante del digerito. La differenza del segnale tra i due campioni è segnata in verde mentre l'area sottesa a essa (394,46 mAU x mL) è segnata con delle strisce oblique di color grigio.

Da questi risultati si potrebbe ipotizzare che la risposta immunitaria alle proteine del glutine a livello intestinale sia spiegabile dal modello proposto in Figura 4.5.6, che si riferisce alla risposta allergica IgE mediata, il cui meccanismo fisiopatologico è quello meglio conosciuto. Il modello prevede che i polimeri gluteninici vengano proteolizzati durante la digestione per rottura dei legami peptidici, ma che i (alcuni) frammenti proteolitici restino uniti tra loro con legami SS. Questi legami consentirebbero la copresenza di più epitopi reattivi sulla stessa struttura. Le sequenze amminoacidiche di questi epitopi potrebbero essere anche uguali o molto simili e questo è perfettamente compatibile con le sequenze ripetute che caratterizzano le proteine del glutine, come per esempio la sequenza ripetitiva QQPGQ, che costituisce

un epitopo IgE reattivo (Matsuo et al., 2005). In questo caso, gli epitopi multipli potrebbero non solo legarsi alle IgE presenti sulle cellule immunocompetenti, ma anche provocarne la reticolazione, con il conseguente rilascio dei mediatori dell'inflammatione e l'insorgenza della sintomatologia (Figura 4.5.6).

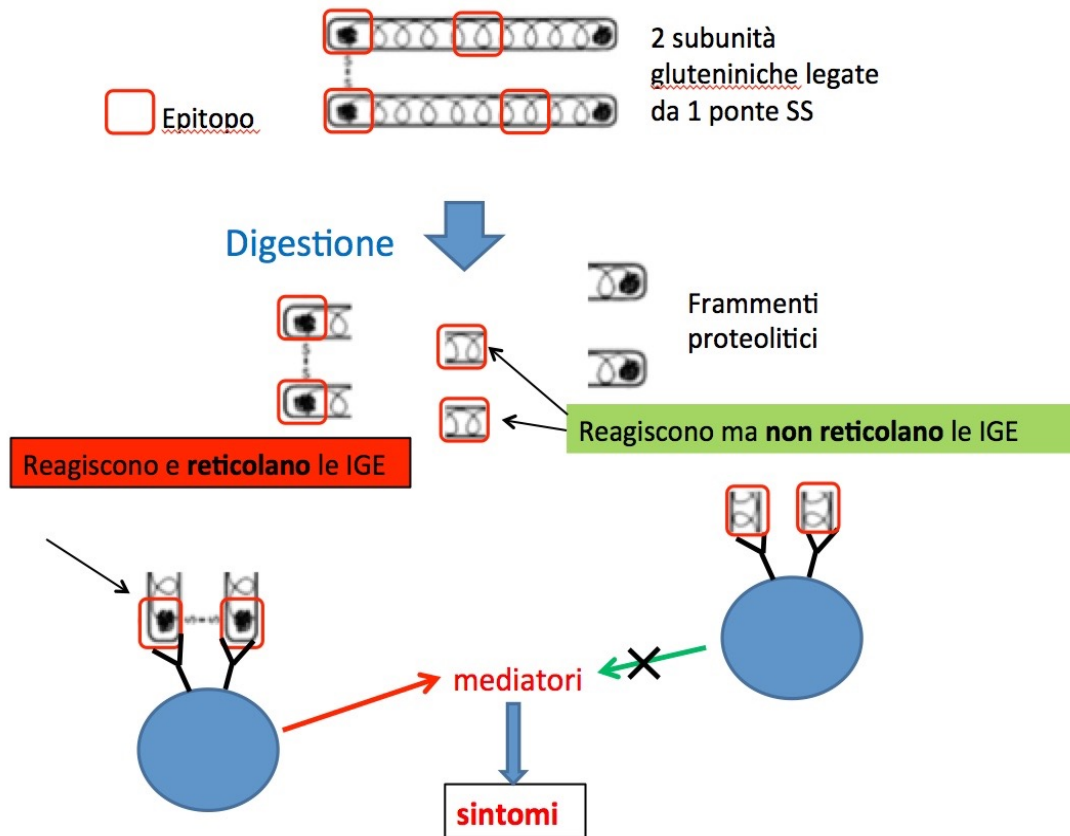


Figura 4.5.6: attivazione della risposta immunitaria delle IgE da parte dei frammenti delle proteine del glutine.

5. CONCLUSIONI

È stato messo a punto un metodo per lo studio della digeribilità *in vitro* delle farine che prevede una prima fase di digestione gastrica seguita da una seconda di digestione intestinale, perfezionando un sistema già precedentemente descritto per le farine di frumento (Pasini et al., 2001). In particolare, in questo lavoro l'approccio all'analisi dell'andamento della digestione si è basato sull'analisi cromatografica diretta dei prodotti della digestione piuttosto che sulla frazione totale non digerita, come fatto in precedenza. Questo ha consentito di seguire con una certa precisione le variazioni della distribuzione dei pesi molecolari dei frammenti proteolitici solubili e, inoltre, tramite la precipitazione con TCA, anche di distinguere la frazione che in teoria dovrebbe essere maggiormente coinvolta nelle patologie intestinali legate all'ingestione di prodotti derivati dal grano. Anche se applicato solo alle farine, che senz'altro non possono essere considerate, in sé, degli alimenti, il metodo adottato pare dunque promettente per verificare la digeribilità del frumento e dei suoi derivati e potrà essere adottato in studi futuri.

Una volta definita la procedura d'analisi è stata confrontata la digeribilità delle farine ottenute dalle due cultivar di grano tenero (*Triticum aestivum*) Inallettabile (campione A) e Palesio (campione B). Queste differivano essenzialmente per il parametro W (52 contro 166) mentre erano praticamente simili sia per il contenuto proteico (circa 13 %) che per l'umidità relativa (circa 12 %). Dai risultati ottenuti si non si possono effettivamente dedurre differenze sostanziali nella digeribilità delle due farine. Tuttavia qualche indicazione sembra suggerire che il campione di farina più forte presenta, al termine della digestione gastro-intestinale, un maggior contenuto di specie proteiche con pesi molecolari tali da corrispondere alle specie proteiche più adatte a provocare reazioni immunologiche a livello intestinale. Quindi, più che una differente digeribilità in senso stretto, pare che farine di diversa forza possano agire differentemente in termini potenziale immunologico dopo essere state processate nel tratto gastrointestinale.

Una seconda conclusione può essere tratta dall'ipotesi che nell'intestino arrivino frammenti proteolitici costituiti da peptidi legati tra loro con i ponti disolfuro già presenti nei polimeri gluteninici delle farine di partenza (Figura 4.5.6). Questa ipotesi è ben supportata dai risultati riportati in questa tesi e metterebbe in luce la possibilità

che una maggiore reticolazione dei polimeri (che determina una maggiore forza della farina) possa risultare in maggiore quantità di frammenti proteolitici in grado di elicitare risposte immunologiche a livello intestinale. Se così fosse, bisognerebbe stabilire anche quale possa essere l'effetto del potenziale di ossido-riduzione dell'intestino, in modo tale da capire se e quando questo è sufficientemente basso da riuscire a ridurre i legami disolfuro ancora presenti nei frammenti proteolitici derivanti dalla digestione delle proteine del glutine, anche in funzione delle attività metaboliche della microflora intestinale.

Tuttavia, al momento non è possibile conoscere quanto avviene realmente *in vivo*, anche perché ciascun individuo possiede delle microflorie intestinali specifiche che potrebbero agire diversamente sulla componente proteica “predigerita” dagli enzimi endogeni (Bernardo et al., 2009).

Inoltre, va ricordato che la digeribilità di un qualsiasi alimento o di un ingrediente alimentare andrebbe valutata nelle effettive condizioni di utilizzo. Infatti, la farina è usualmente impiegata per la formazione degli impasti che vengono, a loro volta, lavorati in maniera diversa così da ottenere svariate tipologie di prodotti come la pasta, il pane, la pizza, il pandoro, ecc. Per questo motivo i risultati preliminari del presente lavoro andrebbero verificati innanzitutto nel caso degli impasti e, successivamente, dei derivati ritrovabili in commercio, dove è possibile che le modificazioni della struttura delle proteine della farina derivanti dai processi di trasformazione (impastamento e cottura) possano determinare variazioni della digeribilità che non possono apparire così evidenti esaminando le farine tal quali, come in questa tesi.

Infine, per cercare relazioni tra digeribilità e forza delle farine, sarebbe auspicabile poter proseguire il lavoro analizzando un gran numero di altre varietà di grano tenero, possibilmente con W distribuiti in un ampio intervallo di valori, che comprendano anche quelli degli attuali standard commerciali, che posso essere anche superiori a 300.

6. BIBLIOGRAFIA

Arendt E.K., Zannini E. 2013. *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*. Elsevier. Ireland.

Balkovič J., van der Velde M., Skalský R., Xiong W., Folberth C., Khabarov N., Smirnov A., Mueller N.D., Obersteiner M. 2014. Global wheat production potentials and management flexibility under the representative concentration pathways. *Global and planetary change*. 122, 107-121.

Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. 2009. *Food Chemistry 4th revised and extended Edition*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, Germany.

Belderock B., Mesdag H., Donner D.A. 2000. *Bread-Making Quality of Wheat: A Century of Breeding in Europe*. D.A. Donner, Wageningen.

Bernardo D., Garrote J.A., Nadal I., Leon A.J., Calvo C., Fernandez-Salazar L., Blanco-Quiros A., Sanz Y., Arranz E. 2009. Is it true that coeliacs do not digest gliadin? Degradation pattern of gliadin in coeliac disease small intestinal mucosa. *Gut*. 58, 886-887.

Bethune M.T., Khosla C. 2008. Parallels between pathogens and gluten peptides in celiac sprue. *Plos Pathog*. 4, 34.

Bjorkman D.J., Brigham E.J. 1990. Differences in composition and fluidity of intestinal microvillus membrane vesicles prepared by different methods. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 170, 2, 433-440.

Boisen S., Eggum B.O. 1991. Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*. 4, 141-162.

Briggle L.W. 1980. *Origin and botany of wheat*. E. Häfliger. Basle, Switzerland.

Bushuk W., Rasper V.F. 1994. *Wheat: production, properties and quality*. Springer Science & Business Media Dordrecht. USA.

D.P.R. n. 41 del 5 marzo 2013. Regolamento per la revisione della normativa sulla produzione e commercializzazione di sfarinati e paste alimentari, a norma dell'articolo 50 della legge 22 febbraio. Gazzetta Ufficiale n. 45 del 23 aprile 2013.

Carlstedt J., Wojtasz J., Fyhr P., Kocherbitov V. 2015. Understanding starch gelatinization: The phase diagram approach. *Carbohydrate Polymers*. 129, 62-69.

Catassi C., Elli L., Bonaz B., Bouma G., Carroccio A., Castillejo G., Cellier C., Cristofori F., De Magistris L., Dolinsek J., Dieterich W., Francavilla R., Hadjivassiliou M., Holtmeier W., Körner U., Leffler D.A., Lundin K.E., Mazzarella G., Mulder C.J., Pellegrini N., Rostami K., Sanders D., Skodje G.I., Schuppan D., Ullrich R., Volta U., Williams M., Zevallos V.F., Zopf Y., Fasano A. 2015. Diagnosis of Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS): The Salerno Experts' Criteria. *Nutrients*. 6, 4966-4977.

Catassi C., Gatti S., Lionetti E. 2015. World perspective and celiac disease epidemiology. *Digestive Diseases*. 33, 2, 6-141. Basle, Switzerland.

CIMMYT. 1996. CIMMYT 1995-96 world wheat facts and trends: understanding global trends in the use of wheat diversity and international flows of wheat genetic resources. Mexico, DF.

Coles L.T., Moughan P.J., Darrah A.J. 2005. In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simplestomached animals. *Animal Food Science and Thechnology*. 123-124, 421-444.

Cova A. 2002, L'agricoltura italiana dal 1918 al 1926, in Id., *Economia, lavoro e istituzioni nell'Italia del Novecento*. Scritti di storia economica, Milano, Vita e Pensiero. 179-222.

Curtis B.C., Rajaram S., Gómez Macpherson H. 2002. *Bread Wheat Improvement and Production*. Fao Plant Production and Protection Series. Rome, Italy.

De Zorzi M., Curioni A., Simonato B., Giannattasio M., Pasini G. 2007. Effect of pasta drying temperature on gastrointestinal digestibility and allergenicity of durum wheat proteins. *Food Chemistry*. 104, 353-363.

- Dia V.P., Bringe N.A., de Mejia E.G. 2014. Peptides in pepsin–pancreatin hydrolysates from commercially available soy products that inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages. *Food Chemistry*. 152, 423-431.
- Espenshade E. B. Goode's World Atlas, 50th Anniversary. Jr ., Edward B. (editor). Rand McNally & Co. (1975) (publisher). Carson City, USA.
- FAO. 2015. Cereal Supply and Demand Brief of 04/06/2015.
- Gilissen L.J.W.J., van der Meer I.M., Smulders M.J.M. 2014. Reducing the incidence of allergy and intolerance to cereals. *Journal of Cereal Science*. 59, 337-353.
- Gupta R.B., Khan K., MacRitchie F. 1993. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in quantity and size distribution of polymeric protein. *Journal of Cereal Science*. 17, 23-41.
- Hernández-Ledesma B., Quirós A., Amigo L., Recio I. 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*. 17, 1, 42-49.
- Huang Q., Chen X., He X., Fu X. 2015. In vitro digestion and physicochemical properties of wheat starch/flour modified by heat-moisture treatment. *Journal of Cereal Science*. 63, 109-115.
- Hur S.J., Lim O.B., Decker E.A., McClements D.G. 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*. 125, 1-12.
- Johnson V.A., Briggle L.W., Axtel J.D., Bauman L.F., Leng E.R., Johnston, T.H. 1978. Grain crops. In M. Milner, N.S. Scrimshaw & D.I.C. Wang, eds. *Protein resources and technology*, 239-255. Westport, CT, USA, AVI Publishing.
- Koenin R., Stagmann H., Francksen H., Paul M.L. 1970. Proteins subunits in potato virus x-group: determination of the molecular weights by polyacrilamide electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta*. 207, 184-189.
- Köhler P., Belitz H.D., Wieser H. 1993. Disulphide bonds in wheat gluten: further

cysteine peptides from high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) subunits of glutenin and from γ -gliadin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 196, 239.

Kopf-Bolanz K.A., Schwander F., Gijs M., Vergeres G., Portmann R., Egger L. 2012. Validation of an in vitro digestive system for studying macronutrient decomposition in humans. *Journal of Nutrition.* 142, 245-250.

Krause J., Müller U., Belitz H.D. 1988. Charakterisierung von Weizensorten durch SDS-Polyacryl-amid-Elektrophorese (SDS-PAGE) und zwei-dimensionale Elektrophorese (2D-SDS-PAGE) der Glutenine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 186, 398.

Kristó K., Bajdik J., Pintye-Hódy K. 2010. Optimization of the formulation of solid multiparticulate dosage forms containing pancreatin. *Chemical Engineering Research and Design.* 88, 1033-1036.

Lang G., Kagiya Y., Kitta K. 2015. Multiplex comparison of the digestibility of allergenic and non-allergenic proteins in rice grains by in vitro digestion. *Food Chemistry.* 168, 606-614.

Leonard W.H., Martin J.H. 1963. *Cereal crops.* New York, NY, USA, MacMillan Publishing.

Lionetti E., Gatti S., Pulvirenti A., Catassi C. Celiac disease from a global prospective. 2015. *Best Practise & Research. Clinical Gastroenterology.* 29, 3, 365-379.

MacRitchie F. 1992. Evaluation of contribution from wheat protein fractions to dough mixing and breadmaking. *Journal of Cereal Science.* 6, 3, 259-268.

Mandalari G., Adel-Patient K., Barkholt V., Baro C., Bennett L., Bublin M., et al. 2009. In vitro digestibility of beta-casein and beta-lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: A multi-laboratory evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 55, 372-381.

Matsuo H., Kohno K., Niihara H., Morita E. 2005. Specific IgE Determination to

Epitope Peptides of ω -5 Gliadin and High Molecular Weight Glutenin Subunit Is a Useful Tool for Diagnosis of Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis.

Journal of Immunology. 175, 8116-8122.

Nuttonson M.Y. 1955. Wheat-climatic relationships and the use of phenology in ascertaining the thermal and photothermal requirements of wheat. Washington, DC, American Institute of Crop Ecology.

Osborne T. 1924. The Vegetable Proteins. Longmans Green and Co. London, UK.

Pasini G., Simonato B., Giannattasio M., Peruffo A., Curioni A. 2001. Modification of wheat flour proteins during in vitro digestion of bread dough, crumb and crust : an electrophoretic and immuno- logical study. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49, 2254-2261.

Pastorello E.A., Farioli L., Conti A., Pravettoni V., Bonomi S., Iametti S., et al. 2007. Wheat IgE mediated food allergy in European patients: α -Amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low molecular weight glutenins. International Archives of Allergy and Immunology. 144, 10-22.

Perlmann G.E. 1954. Formation of Enzymatically Active, Dialysable Fragments during Autodigestion of Pepsin. Nature. 173, 406.

Sapone A., Lammers K.M., Mazzarella G., Mikhailenko I., Carteni M., Casolaro V., Fasano A. 2010. Differential mucosal IL-17 expression in two gliadin-induced disorders: gluten sensitivity and the autoimmune enteropathy celiac disease. Int Arch Allergy Immunol. 152, 1, 75-80.

Shewry P.R. 2009. Wheat. Journal of Experimental Botany. 60, 6, 1537-1553.

Shewry P.R., Halford N.G., Belton P.S., Tatham A.S. 2002. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences. 357, 133-142.

Stoeva S., Byrne C.E., Mullen A.M., Troy D.J., Voelter W. 2000. Isolation and identification of proteolytic fragments from TCA soluble extracts of bovine M. longissimus dorsi. Food Chemistry. 69, 365-370.

Swanston J.S., Smith P.L., Agu R.C., Brosnan J.M., Bringhurst T.A., Jack F.R. 2012. Variation, across environments within the UK, in grain protein and grain hardness, in wheat varieties of differing distilling quality. *Field Crops Research*. 127, 146-152.

Wickham M., Faulks R., Mills C. 2009. In Vitro Digestion Methods for Assessing the Effect of Food Structure on Allergen Breakdown. *Molecular Nutrition & Food Research*. 53, 8.

Wieser H., Kieffer R. 2001. Correlations of the amount of gluten protein types to technological properties of wheat flours determined on a micro-scale. *Journal of Cereal Science*. 34, 19-27.

Young E., Stoneham M.D., Petruckevitch A., Barton J., Rona R. 1994. A population study of food intolerance. *Lancet*. 343, 1127-1130.

Zoccatelli G., Sega M., Bolla M., Cecconi D., Vaccino P., Rizzi C., Chignola R., Brandolini A. 2012. Expression of α -amylase inhibitors in diploid *Triticum* species. *Food Chemistry*. 135, 4, 2643-2649.