

## ABSTRACT

Il crescente interesse della ricerca corrente verso le allergie alimentari è da ricercarsi nell'incremento del problema delle allergie alimentari in tutto il mondo, non solo tra i bambini ma anche in età adulta.

Come alternativa all'utilizzo della dieta allergen-free, molti lavori hanno posto la loro attenzione verso un approccio alternativo per il trattamento degli allergeni alimentari: invece di eliminare gli allergeni dalla dieta, la risposta immunologica può essere ridotta o addirittura eliminata inducendo la modifica della loro struttura molecolare. Infatti, variazioni nella conformazione dell'allergene potrebbero modulare la sua identificazione da parte dello specifico anticorpo prodotto dal sistema immunitario durante le reazioni allergiche.

Le modificazioni strutturali degli allergeni possono essere indotte da trattamenti termici così come da trattamenti non termici come le alte pressioni idrostatiche (HHP), i campi elettrici pulsati, la luce pulsata (PL) e le radiazioni  $\gamma$ .

Le tecnologie non termiche sono state utilizzate negli ultimi anni per la conservazione degli alimenti, presentando il vantaggio di prolungare la shelf-life dell'alimento e la freschezza dei prodotti. Queste tecnologie sono in grado di perturbare solo lievemente le proprietà nutrizionali e organolettiche grazie all'utilizzo di un agente nontermico per il trattamento degli alimenti. Tra queste tecnologie, le alte pressioni idrostatiche sono state ampiamente adottate per la pastorizzazione di alimenti ma anche per indurre transizioni sol-gel di marmellate, gelatine e prodotti lattiero caseari. È stato studiato l'effetto delle alte pressioni idrostatiche sulle modificazioni strutturali degli alimenti per valutare se fosse possibile indurre unfolding proteico, aggregazione e gelazione delle proteine mediante tale trattamento e se il trattamento provocasse una modifica nelle proprietà funzionali delle proteine e nella loro digestibilità. In particolare tale studio è stato eseguito su una classe specifica di proteine rappresentata dagli allergeni alimentari dei quali è stato studiato mostrato il fenomeno dell'unfolding e dell'aggregazione/gelazione indotti da alte HHP.

D'altro canto non è stato ancora valutato l'effetto della tecnologia delle alte pressioni idrostatiche sulla riduzione della risposta immunologica.

L'obiettivo della presente tesi di dottorato è stato quello di valutare le modificazioni indotte dalle alte pressioni idrostatiche sulle proteine allergeniche e la possibilità di ottenere peptidi ipoallergenici mediante l'utilizzo combinato delle alte pressioni. In particolare, è stato studiato

l'effetto del trattamento HHP sulle modificazioni strutturali degli allergeni in un ampio intervallo di condizioni operative che includono sia la gelazione che non. Inoltre sono stati determinati il comportamento reologico e le proprietà funzionali degli allergeni trattati mediante HHP. In seguito all'identificazione dei valori delle caratteristiche del prodotto e delle condizioni operative a cui avviene la transizione da unfolding proteico ad aggregazione, è stato valutato anche l'effetto del trattamento sulle reazioni di idrolisi effettuata mediante enzimi proteolitici. A tale proposito sono state determinate le caratteristiche chimiche fisiche e l'allergenicità dei peptidi prodotti mediante HHP. Per consentirne il confronto, sono state misurate le proprietà dei peptidi prodotti a pressione atmosferica.

Infine, per quantificare l'effetto del processo cos' ottimizzato sull'allergenicità dei peptidi prodotti mediante HHP, la loro risposta immunitaria è stata analizzata mediante tests *in vivo*.

I risultati sperimentali hanno dimostrato che:

- a) Le alte pressioni idrostatiche sono una tecnologia in grado di indurre modificazioni proteiche la cui entità è funzione delle condizioni di processo e delle caratteristiche del prodotto trattato. In proteine gelificanti, come la BSA, le condizioni operative come il livello di pressione applicata, la temperatura ed il tempo di sosta cos' come le proprietà della soluzione quali la concentrazione proteica ed il punto isoelettrico possono spostare la transizione unfolding/gelazione.
- b) Il comportamento reologico dei gels di BSA prodotti mediante HHP dipende dalle condizioni del trattamento che determinano la resistenza/consistenza del gel. Inoltre, si hanno maggiori deviazioni dei gels dal comportamento newtoniano quando sono applicati maggiori livelli di pressione e a maggiori tempi di sosta.
- c) A livelli di pressione inferiori a quelli corrispondenti alla transizione unfolding/gelazione, è possibile valutare gli effetti del trattamento HHP sugli allergeni su scala microscopica. A queste condizioni, l'applicazione delle alte pressioni idrostatiche induce un'anticipazione della denaturazione termica ed una riduzione della temperatura di transizione sol/gel.
- d) Le alte pressioni idrostatiche causano variazioni conformazionali e il dispiegamento degli allergeni, come mostrato dall'incremento delle schiume e dei gruppi tiolici reattivi. A condizioni di trattamento più drastiche e a più elevate concentrazioni proteiche, l'aggregazione molecolare prende il posto dell'unfolding.
- e) Se la reazione d'idrolisi è assistita o anticipata dalle alte pressioni idrostatiche alle condizioni operative che massimizzano l'unfolding proteico, è possibile raggiungere valori maggiori del grado d'idrolisi e produrre peptidi con dimensioni minori. A pressioni molto elevate,

la velocità della reazione d'idrolisi è ridotta a causa della formazione di aggregati e della riduzione dell'attività enzimatica.

- f) Le alte pressioni idrostatiche possono essere applicate anche a proteine non globulari, come le caseine. Anche con queste proteine la reazione d'idrolisi è incrementata e i peptidi sono più piccoli e più omogenei tra loro.
- g) Le cinetiche d'idrolisi delle proteine mediante enzimi proteolitici sono più veloci ad elevate pressioni rispetto alle corrispondenti reazioni a pressione atmosferica come mostrato dall'incremento delle costanti cinetiche di reazione.
- h) I peptidi prodotti mediante idrolisi assistita da alte pressioni idrostatiche possono essere considerati composti ipoallergenici rispetto in quanto la loro risposta immunologica contro gli anticorpi viene ridotta come mostrato da tests in vivo (*Prick tests*).

