

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI
CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA IN TECNOLOGIE ALIMENTARI

**Metodi di rilevazione degli allergeni e strategie per la riduzione del
potere allergico: il caso studio dell'arachide**

Tesi in
Tecnologie Alimentari I

Relatrice

Prof.ssa Maria Fiorenza Caboni

Correlatrice

Dott.ssa Alessandra Iosi

Candidata

Martina Visani

matricola 826175

Anno Accademico 2019/2020

Sessione unica

INDICE

INDICE	2
INTRODUZIONE	4
CAPITOLO 1 - GLI ALLERGENI DELL'ARACHIDE	6
1.1 Cosa significa allergia alimentare	6
1.2 Nomenclatura ufficiale	6
1.3 Classificazione biochimica	7
<i>1.3.1 Proteine di deposito (SSP)</i>	<i>9</i>
<i>1.3.2 Proteine di trasferimento lipidico non specifiche (nsLTP)</i>	<i>11</i>
<i>1.3.3 Oleosine</i>	<i>12</i>
<i>1.3.4 Defensine</i>	<i>12</i>
<i>1.3.5 Profiline</i>	<i>13</i>
<i>1.3.6 Proteine di patogenesi 10 (PR-10)</i>	<i>13</i>
CAPITOLO 2 - LA RILEVAZIONE DEGLI ALLERGENI NELLE MATRICI ALIMENTARI	15
2.1 Normativa vigente in materia di etichettatura dei prodotti alimentari	15
2.2 Criticità nella rilevazione degli allergeni	19
2.3 Metodi utilizzati per la ricerca di allergeni dell'arachide	19
<i>2.3.1 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)</i>	<i>20</i>
<i>2.3.1.1 Saggi diretti</i>	<i>20</i>
<i>2.3.1.2 Saggi indiretti</i>	<i>21</i>
<i>2.3.2 LFA (Lateral flow assay)</i>	<i>24</i>

2.3.3 Biosensori SPR (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)	26
2.3.4 Spettrometria di massa	28
2.3.5 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	31
CAPITOLO 3 - POSSIBILI STRATEGIE PER LA RIDUZIONE DEL POTERE ALLERGICO	36
3.1 Trattamenti termici	36
3.2 Trattamenti non termici	37
3.2.1 Raggi γ	37
3.2.2 Luce UV pulsata (<i>PUV</i>)	39
3.2.3 Alte pressioni	39
3.2.4 Idrolisi e cross-linking con enzimi	40
3.2.5 PEF (<i>campi elettrici pulsati</i>)	42
3.2.6 Acidi organici	43
3.2.7 Ingegneria genetica	44
CONCLUSIONI	47
BIBLIOGRAFIA	49
SITOGRAFIA E REGOLAMENTI	59

INTRODUZIONE

L'arachide (*Arachis hypogaea* L.) è una coltura originaria del Sud America che al giorno d'oggi è largamente diffusa anche in Cina, India, Africa, Giappone e Stati Uniti (Settaluri, et al., 2012), con una produzione mondiale di circa 45 milioni di tonnellate all'anno (FAOSTAT, 2018). A livello botanico, è una leguminosa che si differenzia dalle altre piante della famiglia perché produce i suoi frutti sottoterra (Toomer, 2020); come tutte le leguminose ha la capacità di fissare l'azoto dall'aria e di rilasciarne notevoli quantità nel terreno rendendolo fertile. Di conseguenza, la sua coltivazione necessita di un uso limitato di concimi chimici e perciò si tratta di una coltura interessante per la sostenibilità ambientale, caratteristica attualmente sempre più richiesta. La parte edibile è il seme che contiene lipidi per circa il 50% sulla sostanza secca e viene classificata come oleaginosa; ha, inoltre, un buon contenuto in proteine (circa il 25%), fibra, vitamine del gruppo B ed E e minerali come magnesio, potassio e calcio. È proprio per la sua composizione che studi epidemiologici hanno evidenziato dei benefici associati al consumo di arachidi, come la riduzione dell'incidenza di malattie cardiovascolari e diabete (Bonku & Yu, 2019). Queste motivazioni, unite alla sua ampia disponibilità e al basso costo di produzione rispetto agli altri tipi di frutta secca a cui può essere paragonata per composizione e tipo di impiego, è una coltura molto utilizzata a livello mondiale per l'estrazione di olio, farine e isolati proteici usati come ingredienti per snacks e salse e per la produzione di burro d'arachidi e noccioline tostate (Toomer, 2020). Il problema principale correlato al consumo di arachidi è dato dal fatto che contiene allergeni che ne impediscono il consumo ad un numero crescente di persone, in particolare bambini. Infatti, si stima che il 2% della popolazione occidentale sia allergica all'arachide e che questo valore sia in continua crescita (Zhang, et al., 2019) e la risposta anafilattica è una delle più serie; da uno studio condotto negli Stati Uniti è infatti emerso che l'arachide è stata la causa di morte per allergia alimentare per ben 17 individui su un totale di 31 casi registrati tra il 2001 e il 2006 (Bock, et al., 2007). Da qui nasce la necessità di prevenire

l'esposizione, individuando la presenza di questo allergene anche in minime quantità nelle matrici alimentari e studiando la possibile applicazione di metodi chimici, fisici e biologici per ridurre il potere allergico.

CAPITOLO 1 - GLI ALLERGENI DELL'ARACHIDE

1.1 Cosa significa allergia alimentare

L'allergia alimentare è una reazione immunologica legata all'ingestione degli alimenti. Diversamente dalle sostanze tossiche o dagli agenti infettivi, che costituiscono un pericolo per tutta la popolazione, nel caso dell'allergia alimentare alcune proteine, normalmente presenti negli alimenti, sono in grado di determinare reazioni immediate o ritardate di diversa gravità fino ad eventi fatali solo per gli individui predisposti (Ministero della Salute, 2018). In particolare, la proteina introdotta nell'organismo in grado di indurre una risposta immunitaria è detta antigene, mentre le molecole proteiche che si formano e che reagiscono con l'antigene sono dette anticorpi. La specificità immunologica tra antigene e anticorpo è data da determinati siti delle loro superfici, detti rispettivamente epitopi e paratopi.

1.2 Nomenclatura ufficiale

Nel caso dell'arachide, la WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee (www.allergen.org) che è l'unico gruppo di esperti autorizzato a declinare o accettare come allergeni le richieste pervenute e, in quest'ultimo caso, ad assegnargli un nome, ha riconosciuto ad oggi 16 proteine allergeniche nell'arachide. La nomenclatura ufficiale prevede che il nome sia costituito dalle seguenti parti:

- Le prime tre lettere del genere;
- Una lettera per la specie;
- Un numero arabo, che di solito è lo stesso per le proteine appartenenti alla stessa classe biochimica ma a specie differenti.

Inoltre, ogni allergene può poi presentare isoallergeni o isoforme, con i quali condividono gran parte della sequenza amminoacidica e le stesse proprietà biochimiche e vengono distinti aggiungendo un punto e un suffisso numerico dopo il numero arabo (Pomés, et al., 2018). Si deduce che gli allergeni dell’arachide sono chiamati con il nome “Ara h” seguito da un numero che va da 1 a 17, ad eccezione di Ara h 4 che è stato rinominato Ara h 3.02 e il numero 4 non è più disponibile per non creare confusione con la letteratura già esistente (Palladino & Breiteneder, 2018).

1.3 Classificazione biochimica

Gli allergeni dell’arachide, a seconda della loro funzione biologica, possono essere suddivisi in diverse famiglie proteiche (Tabella 1): proteine di deposito (*seed storage proteins*, SSP), oleosine, defensine, proteine di trasferimento lipidico non specifiche (*lipid transfer proteins*, LTP), proteine di patogenesi 10 (*pathogenesis-related class 10 proteins*, PR-10) e profiline (Mastorilli, et al., 2017).

Allergen (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, 2019)	Biochemical name (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, 2019)	MW (SDS-PAGE) (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, 2019)	Isoelectric point	Isomer (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, 2019)	Length of peptide chain (Kleber-Janke, Cramer, Appenzeller, Schlaak, & Becker, 1999)	Biological function
Ara h 1	Cupin (Vicillin-type, 7S globulin)	64 kDa	5.4(Kleber-Janke et al., 1999)		525aa	seed storage protein
Ara h 2	Conglutin (2Salbumin)	17 kDa 19 kDa(Apostolovic et al., 2013)	5.51 5.50(Schmidt et al., 2010)	Ara h 2.0101 Ara h 2.0201	146aa	seed storage protein

Allergen (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, 2019)	Biochemical name (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, 2019)	MW (SDS-PAGE) (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, 2019)	Isoelectric point	Isomer (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, 2019)	Length of peptide chain (Kleber-Janke, Crameri, Appenzeller, Schlaak, & Becker, 1999)	Biological function
Ara h 3	Cupin (Legumin-type, 11S globulin, Glycinin)	58 kDa 61 kDa(Hong, Chen, Zhang, & Ren, 2015)	5.5 4.6(Hong et al., 2015)	Ara h 3.0101 Ara h 3.0201 (Ara h 4)	510aa(Matsuo, Yokooji, & Taogoshi, 2015) 315aa –	Seed storage protein
Ara h 5	Profilin	15 kDa	4.6		131aa	Actin binding protein
Ara h 6	Conglutin (2S albumin)	15 kDa	5.24(Schmidt et al., 2010)		124aa	Seed storage protein
Ara h 7	Conglutin (2S albumin)	15 kDa	5.56 7.49(Schmidt et al., 2010)	Ara h 7.0101 Ara h 7.0201	135aa	Seed storage protein
Ara h 8	Pathogenesis-related protein, PR-10, Bet v 1 family member	17 kDa	- 5.07(Schmidt et al., 2010)	Ara h 8.0101 Ara h 8.0201		seed storage protein
Ara h 9	Nonspecific lipid-transfer protein type 1	9.8 kDa	9–10(Asarnej et al., 2012)	Ara h 9.0101 Ara h 9.0201		fat transporter
Ara h 10	16 kDa oleosin	16 kDa	9.61 9.36(Schmidt et al., 2010)	Ara h 10.0101 Ara h 10.0102		
Ara h 11	14 kDa oleosin	14 kDa	10.08(Schmidt et al., 2010) –	Ara h 11.0101 Ara h 11.0102		
Ara h 12	Defensin	8 kDa (reducing), 12 kDa (nonreducing), 5.184 kDa(mass)				defense
Ara h 13	Defensin	8 kDa (reducing), 11 kDa (nonreducing), 5.472 kDa (mass)		Ara h 13.0101 Ara h 13.0102		defense

Allergen (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, 2019)	Biochemical name (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, 2019)	MW (SDS-PAGE) (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, 2019)	Isoelectric point	Isomer (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, 2019)	Length of peptide chain (Kleber-Janke, Cramer, Appenzeller, Schlaak, & Becker, 1999)	Biological function
Ara h 14	Oleosin	17.5 kDa		Ara h 14.0101 Ara h 14.0102 Ara h 14.0103		
Ara h 15	Oleosin	17 kDa				
Ara h 16	nonspecific Lipid Transfer Protein 2	8.5 kDa by SDS PAGE reducing				fat transporter
Ara h 17	nonspecific Lipid Transfer Protein 1	11 kDa by SDS-PAGE reducing				fat transporter

The references marked in the first line of the table are responsible for the contents of the table, unless otherwise noted.

Tabella 1. Gli allergeni dell'arachide (Pi, et al., 2019)

1.3.1 Proteine di deposito (SSP)

Come indicato dal nome, le SSP sono accumulate dall'averne una funzione di riserva e sono utilizzate dal seme come fonte di amminoacidi al momento della germinazione e della crescita (Palladino & Breiteneder, 2018). Le SSP nell'arachide possono essere ulteriormente divise in tre famiglie: viciline o globuline 7S, legumine o globuline 11S (appartenenti entrambe alla superfamiglia delle cupine) e albumine 2S (comprese invece nella superfamiglia delle prolamine) (Ozias-Akins & Breiteneder, 2019). Ara h 1 è una glicoproteina delle viciline ed è costituita da un complesso omotrimerico che si forma grazie alle interazioni idrofobiche tra i residui degli amminoacidi localizzati nei punti di contatto tra i monomeri. Proprio in questa stessa posizione sono collocati anche i suoi epitopi, mentre i siti di legame per le proteasi sono situati in altri punti della sua struttura

primaria (Figura 1); si deduce quindi che le parti allergeniche della proteina hanno un'elevata resistenza alla digestione (Maleki, et al., 2000). Questo spiegherebbe perché Ara h 1, oltre ad essere una delle proteine più presenti nell'arachide con un valore compreso tra il 12% e il 16%, è la responsabile del maggior numero di casi di anafilassi mortale tra gli allergeni alimentari di origine vegetale (Wen, et al., 2007). Ara h 3 è invece una glicoproteina delle legumine e si presenta come un complesso esamerico con ponti disolfuro. All'inizio si pensava che Ara h 3 e Ara h 4 fossero due diverse proteine allergeniche, molto simili alla glicinina che è la principale proteina di deposito della soia (Breiteneder & Radauer, 2004). Successivamente, si è capito che invece esse derivano da due varianti dello stesso gene quindi Ara h 4 è stata rinominata Ara h 3.02 (Palladino & Breiteneder, 2018). Tra le albumine 2S, nell'arachide troviamo Ara h 2, Ara h 6 e Ara h 7. Le proteine di questa famiglia sono caratterizzate da una struttura secondaria predominante ad alfa elica ed elevata compattezza data dai ponti disolfuro che si instaurano tra residui di cisteina. Grazie a quest'ultima caratteristica sono anch'esse molto resistenti al calore e all'azione degli enzimi (Geiselhart, et al., 2018). In particolare, Ara h 2 è l'altro maggiore allergene dell'arachide insieme ad Ara h 1, sia perché rappresenta tra il 5,9% e il 9,3% del contenuto proteico totale sia perché entrambi hanno una frequenza di sensibilizzazione nella popolazione allergica all'arachide che va da un minimo del 65% per Ara h 1 e del 71% per Ara h 2 fino al 100%. In uno studio condotto su 40 soggetti sensibilizzati all'arachide, ad esempio, Ara h 1 e Ara h 2 vengono riconosciuti e legati dalle IgE specifiche nel 65% e nell'85% degli individui. Ara h 6 e Ara h 7 sono, come Ara h 2, molto resistenti ai trattamenti ma differentemente da essa hanno una frequenza di sensibilizzazione molto inferiore (rispettivamente 38% e 43% dei 40 individui allergici esaminati) quindi sono degli allergeni minori (Kleber-Janke, et al., 1999) (Wen, et al., 2007).

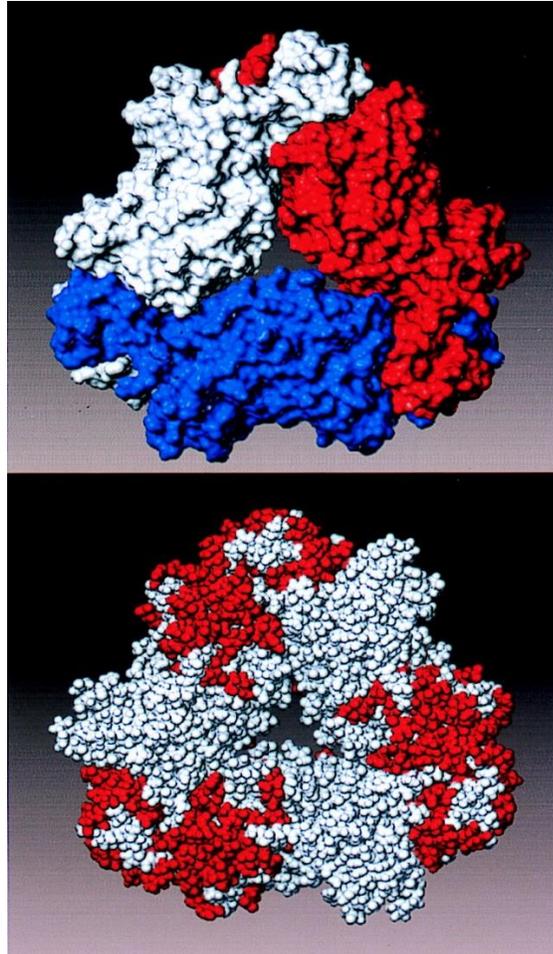


Figura 1. Modello molecolare di Ara h 1. *In alto*, rappresentazione della struttura trimerica dove sono evidenziati con colori diversi i monomeri. *In basso*, gli epitopi di Ara h 1 sono evidenziati in rosso. Si nota che la maggior parte di essi sono situati nelle zone di contatto monomero-monomero (Maleki, et al., 2000).

1.3.2 *Proteine di trasferimento lipidico non specifiche (nsLTP)*

Queste proteine presentano una cavità interna con siti di legame per molecole idrofobiche e anfipatiche (come acidi grassi, fosfolipidi e glicolipidi), permettendone il trasporto. Sono coinvolte in processi cellulari essenziali come biosintesi e stabilizzazione delle membrane, trasmissione di segnali intra ed extracellulari, contribuiscono alla resistenza a stress biotici e abiotici e alla crescita e allo sviluppo della pianta; alcune hanno anche una funzione antimicrobica verso funghi e batteri (Geiselhart, et al., 2018) (Ozias-Akins & Breiteneder, 2019). Le

nsLTP sono le principali responsabili di reazioni allergiche alimentari a vegetali nei Paesi mediterranei (tra cui l'Italia) e la sensibilizzazione è sempre più rilevante in ambito pediatrico (Ministero della Salute, 2018). Nell'arachide, le nsLTP allergeniche sono Ara h 9, Ara h 16 e Ara h 17. A causa dell'elevata resistenza a processi proteolitici, termici e a variazioni di pH, Ara h 9 è una delle cause di reazioni sistemiche in questi Paesi, soprattutto per cross-reattività negli individui sensibili ad altre nsLTP come ad esempio Pru p 3, che è un allergene della pesca (Romano, et al., 2012).

1.3.3 Oleosine

Le oleosine sono proteine specializzate nella stabilizzazione degli oleosomi, organelli presenti nelle cellule dei semi delle piante deputati all'immagazzinamento dei trigliceridi. Il core idrofobico degli oleosomi è rivestito da uno strato fosfolipidico in cui sono inserite queste proteine altamente idrofobiche con un dominio idrofilico localizzato sulla superficie esterna, all'interfaccia tra la parte lipidica e quella acquosa del citoplasma (Maurer, et al., 2013). Nell'arachide la sensibilizzazione alle oleosine Ara h 10, Ara h 11, Ara h 14 e Ara h 15 è nota principalmente negli individui con gravi allergie all'arachide. Il fatto che siano associate ai lipidi le protegge dalla digestione e ne favorisce l'assimilazione; inoltre, la tostatura ne aumenta il potere allergico (Schwager, et al., 2017).

1.3.4 Defensine

Le defensine sono piccoli peptidi (45-54 amminoacidi) ricchi in cisteina, la quale forma quattro ponti disolfuro che ne stabilizzano la struttura; nel regno vegetale sono ubiquitari e sono accumulati da una stessa struttura terziaria data da tre filamenti a foglietto beta e da una alfa elica, ma sono un meccanismo di difesa ancestrale ancora presente anche nei vertebrati e negli invertebrati. La maggior parte delle defensine estratte dalle piante mostrano un'attività antifungina mentre alcune intervengono contro gli insetti con un effetto di inibizione dell'alfa amilasi

e quindi interferendo nella loro digestione (Thomma, et al., 2002). Nel caso specifico dell'arachide, Ara h 12 e Ara h 13 sono defensine con effetti inibitori contro ceppi di muffe appartenenti ai generi *Cladosporium* e *Alternaria* (Palladino & Breiteneder, 2018).

1.3.5 Profiline

Ara h 5 fa parte della famiglia delle profiline, proteine ubiquitarie nelle cellule eucariotiche, con sequenza amminoacidica molto eterogenea ma dalla struttura altamente conservata. Poiché sono presenti nei pollini di numerose piante, ma anche in numerosi alimenti di origine vegetale, lo sviluppo di una sensibilizzazione allergica verso una profilina pollinica comporta, a causa della elevata similitudine strutturale tra le diverse profiline, la frequente insorgenza di cross-reattività con allergeni da alimenti vegetali. Non vale però il contrario perché non c'è evidenza di una sensibilizzazione primaria a profiline vegetali. Ad esempio, Ara h 5 mostra un'elevata somiglianza strutturale con Bet v 2 e Hev b 8, proteine presenti rispettivamente nel polline della betulla e dell'*Hevea brasiliensis* (da cui si estrae il lattice). Dato che sono denaturate dal calore e dalla digestione gastrica, l'ingestione di vegetali contenenti profiline causa prevalentemente una reazione locale detta Sindrome Orale Allergica (SOA) nel caso in cui il vegetale venga consumato crudo, per questo Ara h 5 può essere considerato un allergene minore dell'arachide (Pucci, et al., 2011) (Wang, et al., 2013).

1.3.6 Proteine di patogenesi 10 (PR-10)

Le proteine di patogenesi sono uno dei meccanismi di difesa inducibili delle piante. Vengono infatti prodotte solo quando si ha un attacco diretto di un patogeno (batteri, funghi, virus) o in circostanze correlate come sostanze chimiche che imitano l'attacco di un microrganismo e in risposta a ferite. In base alle loro proprietà sono divise in 17 classi e Ara h 8 fa parte delle PR-10 (Sels, et al., 2008). Si tratta di un allergene minore perché causa una Sindrome Orale Allergica (SOA)

con l'ingestione solo ai soggetti sensibili ai pollini di betulla, similmente a quanto accade per Ara h 5. Questo perché Ara h 8 ha una struttura molto simile a Bet v 1, con 3 alfa eliche e 7 foglietti beta, nonostante la loro sequenza amminoacidica corrisponda solo per il 48% (Figura 2). La cross-reattività vale anche per le altre PR-10 dato che la loro struttura è molto simile. Ne sono un esempio Gly m 4 (soia), Api g 1 (sedano), Pru av 1 (ciliegia) (Hurlburt, et al., 2013).

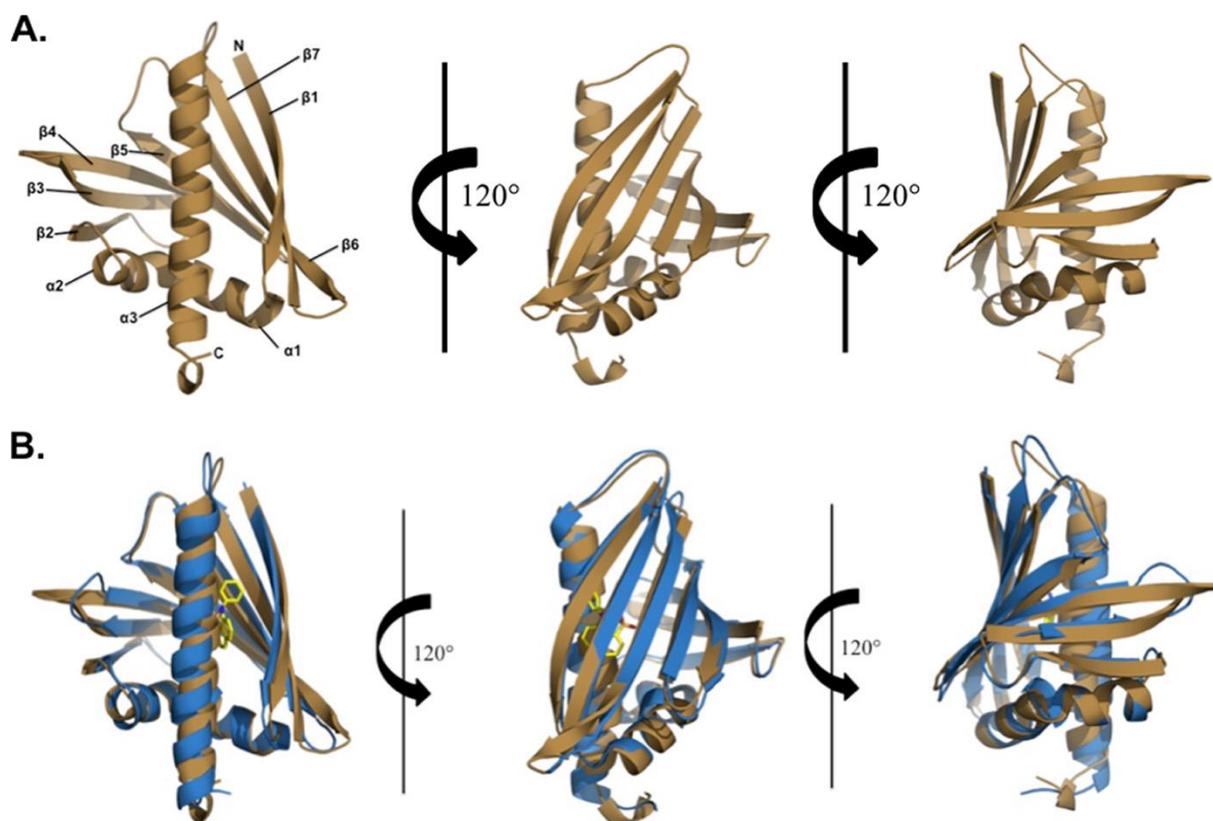


Figura 2. *A*, struttura tridimensionale di Ara h 8, vista da tre diverse angolazioni. *B*, sovrapposizione di Ara h 8 (in marrone) e di Bet v 1 (in blu). Il ripiegamento dei due allergeni è molto simile, con tre alfa eliche e sette foglietti beta, mentre la sequenza amminoacidica è identica per il 48% (Hurlburt, et al., 2013).

CAPITOLO 2 - LA RILEVAZIONE DEGLI ALLERGENI NELLE MATRICI ALIMENTARI

La sensibilizzazione agli allergeni alimentari è in continua crescita e sta diventando un rilevante problema di salute pubblica. Ad oggi, non esistono ancora misure preventive per eliminare l'insorgenza di reazioni allergiche, ma solo farmaci per il trattamento dei sintomi (antistaminici, cortisone, adrenalina). Di conseguenza, l'unico modo per evitarle è escludere dalla dieta gli alimenti che le causano. Tuttavia, non sempre la prevenzione è così facile da mettere in pratica: per i soggetti più sensibili anche le quantità più piccole di allergene possono metterne a rischio la vita, provocando gravi reazioni anafilattiche. Da qui nasce la necessità di individuare con precisione gli allergeni nelle varie matrici alimentari, soprattutto quelle complesse, in cui possono essere presenti le minime tracce di una sostanza allergenica. Inoltre, assume fondamentale importanza la comunicazione del pericolo al consumatore da parte delle aziende produttrici, in modo che possa essere adeguatamente informato per evitare prodotti potenzialmente dannosi (Marzano, et al., 2020).

2.1 Normativa vigente in materia di etichettatura dei prodotti alimentari

La normativa in vigore nell'Unione Europea è il Regolamento (UE) N. 1169/2011, che stabilisce e armonizza le regole di etichettatura dei prodotti alimentari a livello comunitario. Questo documento ha definito un elenco di 14 allergeni che devono essere obbligatoriamente inseriti in etichetta, riportati nell'Allegato II (Figura 3). Citando il Regolamento all'articolo 9, paragrafo 1, lettera c) è obbligatorio riportare, tra le altre indicazioni, *“qualsiasi ingrediente o coadiuvante tecnologico elencato nell'allegato II o derivato da una sostanza o un prodotto elencato in detto allegato che provochi allergie o intolleranze usato nella fabbricazione o nella preparazione di un alimento e ancora presente nel prodotto finito, anche se in forma alterata”*. Come precisato nell'articolo 44, paragrafi 1 e 2, è obbligatoria la fornitura delle indicazioni di cui all'articolo 9, paragrafo

1, lettera c) anche per gli alimenti non preimballati come quelli sfusi o i piatti serviti nella ristorazione collettiva, attraverso mezzi stabiliti dallo Stato membro stesso. Come riportare le indicazioni relative agli allergeni in etichetta è spiegato all'articolo 21, paragrafo 1: *“Fatte salve le disposizioni adottate ai sensi dell'articolo 44, paragrafo 2, le indicazioni di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettera c), sono conformi ai requisiti seguenti:*

a) figurano nell'elenco degli ingredienti conformemente alle disposizioni stabilite all'articolo 18, paragrafo 1, con un riferimento chiaro alla denominazione della sostanza o del prodotto figurante nell'elenco dell'allegato II; nonché

b) la denominazione della sostanza o del prodotto figurante nell'allegato II è evidenziata attraverso un tipo di carattere chiaramente distinto dagli altri ingredienti elencati, per esempio per dimensioni, stile o colore di sfondo.

In mancanza di un elenco degli ingredienti, le indicazioni di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettera c), includono il termine «contiene» seguito dalla denominazione della sostanza o del prodotto figurante nell'elenco dell'allegato II.

Quando più ingredienti o coadiuvanti tecnologici di un alimento provengono da un'unica sostanza o da un unico prodotto figurante nell'elenco dell'allegato II, ciò è precisato nell'etichettatura per ciascun ingrediente o coadiuvante tecnologico in questione.

Nei casi in cui la denominazione dell'alimento fa chiaramente riferimento alla sostanza o al prodotto in questione, le indicazioni di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettera c), non sono richieste.”

È chiaro quindi che gli allergeni devono distinguersi dalle altre sostanze anche a livello grafico e che va indicato per ogni ingrediente da quale prodotto allergenico deriva. Tuttavia, il problema principale per le industrie alimentari non è costituito dagli ingredienti allergenici aggiunti volontariamente nella formulazione del prodotto, ma dalle tracce di un allergene che possono finire accidentalmente durante il processo all'interno

di una matrice non allergenica, i cosiddetti “allergeni nascosti”. Come precauzione, i produttori spesso mettono in etichetta “può contenere tracce di” per una determinata sostanza potenzialmente pericolosa per il consumatore quando non hanno la certezza di poterne verificare la loro effettiva presenza o assenza. Questo svantaggia non solo i soggetti sensibili, che devono evitare molti alimenti magari non realmente nocivi per la loro salute, ma anche l’azienda che ne risente in senso economico per la perdita di consumatori. Questa criticità rende quindi ancora più necessario trovare uno strumento preciso e affidabile che permetta di indentificare anche le più piccole quantità di allergeni e che sia possibilmente economico e rapido.

ALLEGATO II

SOSTANZE O PRODOTTI CHE PROVOCANO ALLERGIE O INTOLLERANZE

1. Cereali contenenti glutine, cioè: grano, segale, orzo, avena, farro, kamut o i loro ceppi ibridati e prodotti derivati, tranne:
 - a) sciroppi di glucosio a base di grano, incluso destrosio⁽¹⁾;
 - b) maltodestrine a base di grano⁽¹⁾;
 - c) sciroppi di glucosio a base di orzo;
 - d) cereali utilizzati per la fabbricazione di distillati alcolici, incluso l'alcol etilico di origine agricola.
2. Crostacei e prodotti a base di crostacei.
3. Uova e prodotti a base di uova.
4. Pesce e prodotti a base di pesce, tranne:
 - a) gelatina di pesce utilizzata come supporto per preparati di vitamine o carotenoidi;
 - b) gelatina o colla di pesce utilizzata come chiarificante nella birra e nel vino.
5. Arachidi e prodotti a base di arachidi.
6. Soia e prodotti a base di soia, tranne:
 - a) olio e grasso di soia raffinato⁽¹⁾;
 - b) tocoferoli misti naturali (E306), tocoferolo D-alfa naturale, tocoferolo acetato D-alfa naturale, tocoferolo succinato D-alfa naturale a base di soia;
 - c) oli vegetali derivati da fitosteroli e fitosteroli esteri a base di soia;
 - d) estere di stanolo vegetale prodotto da steroli di olio vegetale a base di soia.
7. Latte e prodotti a base di latte (incluso lattosio), tranne:
 - a) siero di latte utilizzato per la fabbricazione di distillati alcolici, incluso l'alcol etilico di origine agricola; b) latticello.
8. Frutta a guscio, vale a dire: mandorle (*Amygdalus communis* L.), nocciole (*Corylus avellana*), noci (*Juglans regia*), noci di acagiù (*Anacardium occidentale*), noci di pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], noci del Brasile (*Bertholletia excelsa*), pistacchi (*Pistacia vera*), noci macadamia o noci del Queensland (*Macadamia ternifolia*), e i loro prodotti, tranne per la frutta a guscio utilizzata per la fabbricazione di distillati alcolici, incluso l'alcol etilico di origine agricola.
9. Sedano e prodotti a base di sedano.
10. Senape e prodotti a base di senape.
11. Semi di sesamo e prodotti a base di semi di sesamo.
12. Anidride solforosa e solfiti in concentrazioni superiori a 10 mg/kg o 10 mg/litro in termini di SO₂ totale da calcolarsi per i prodotti così come proposti pronti al consumo o ricostituiti conformemente alle istruzioni dei fabbricanti.
13. Lupini e prodotti a base di lupini.
14. Molluschi e prodotti a base di molluschi.

⁽¹⁾ E i prodotti derivati, nella misura in cui la trasformazione che hanno subito non è suscettibile di elevare il livello di allergenicità valutato dall'Autorità per il prodotto di base da cui sono derivati.

2.2 Criticità nella rilevazione degli allergeni

Per garantire il rispetto delle norme sull'etichettatura è necessario che la rilevazione e la quantificazione degli allergeni sia affidabile e precisa. Tuttavia, identificare gli allergeni nei prodotti alimentari può essere difficile, soprattutto se presenti in tracce o se si trovano in matrici complesse da cui è difficile estrarli e purificarli a causa dell'interferenza con altri componenti e del processo subito. Inoltre, non tutti i kit commerciali disponibili sul mercato sono stati validati dall'AOAC (Association of Official Analytical Chemists) Research Institute, associazione no-profit che stabilisce metodi ufficiali standard di analisi chimica e microbiologica, e questo rende difficile avere risultati affidabili e confrontabili tra laboratori differenti. Un altro problema è legato sia alla soglia di sensitizzazione, che predispone la sintesi di anticorpi specifici che provocheranno la reazione allergica non appena l'allergene viene reintrodotta nell'organismo, sia alla soglia minima di allergene che provoca una reazione e che quindi è indispensabile rilevare con i metodi disponibili per poter tutelare al massimo la salute del consumatore. Non solo i soggetti allergici hanno una diversa sensibilità verso una stessa sostanza, ma inoltre non tutte le metodiche hanno lo stesso livello di accuratezza e precisione; va poi tenuto conto che una stessa procedura analitica può avere diversa efficacia a seconda della matrice utilizzata. Di conseguenza, è difficile standardizzare un metodo per la rilevazione degli allergeni e stabilire una soglia minima di quantificazione, anche se si ritiene che in generale il limite di quantificazione dovrebbe essere compreso tra 1 e 100 ppm (mg di allergene per kg di prodotto) a seconda della sostanza allergenica considerata (Poms, et al., 2004) (Wen, et al., 2007).

2.3 Metodi utilizzati per la ricerca di allergeni dell'arachide

I metodi per la rilevazione degli allergeni possono essere suddivisi in due grandi gruppi a seconda del target:

- Quando il target è la proteina stessa si possono utilizzare metodi immunologici (ELISA, LFA, biosensori) o non immunologici (spettrometria di massa abbinata

alla HPLC) (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2014);

- Quando i target sono i frammenti di DNA codificanti per quella proteina vengono utilizzate tecniche PCR quantitative, come la real-time PCR o la più recente digital PCR (Pierboni, et al., 2018).

2.3.1 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

ELISA è un test immunoenzimatico, che permette di identificare la presenza di antigeni o di anticorpi in un campione. La sua efficacia si basa sulla specificità di reazione tra un antigene e il suo anticorpo che si legano formando un complesso. Il complesso antigene-anticorpo può essere visualizzato con lo sviluppo di una determinata colorazione per reazione enzimatica innescata dall'aggiunta di substrato specifico per l'enzima (in genere beta-galattosidasi, glucosio-ossidasi, perossidasi o fosfatasi alcalina) coniugato all'anticorpo. Per ottenere risultati quantitativi, si misura l'assorbanza del colore prodotto a una determinata lunghezza d'onda (Aydin, 2015).

Per la quantificazione degli allergeni dell'arachide sono disponibili diversi kit ELISA, molto utilizzati per le analisi di routine nei laboratori perché caratterizzati da facilità d'uso, alta sensibilità, specificità e brevi tempi di analisi. Tuttavia, ogni kit è molto diverso dagli altri per target, buffer di estrazione, range di quantificazione, limiti di rilevazione e quantificazione, standard di riferimento impiegato e modo di esprimere i risultati ottenuti (Jayasena, et al., 2015). Di conseguenza, tutti questi fattori rendono difficilmente confrontabili i risultati di differenti kit, soprattutto se ottenuti in laboratori diversi (Wen, et al., 2007).

2.3.1.1 Saggi diretti

Nonostante esistano diverse varianti del test ELISA a seconda del metodo utilizzato per la rilevazione, quello più diffuso per gli allergeni è il sandwich ELISA, il cui

principio sta alla base del funzionamento di quasi tutti i kit commerciali per l'arachide. In questo saggio, degli anticorpi specifici per gli allergeni da identificare sono immobilizzati su un supporto solido, di solito una piastra multipozzetto.

Il campione da analizzare viene sottoposto ad una fase di incubazione, in cui gli antigeni specifici presenti nella matrice si legano all'anticorpo (Figura 4). Dopo aver eseguito un lavaggio, ossia un'eliminazione di tutte le molecole presenti nel test fuori dal complesso antigene-anticorpo, per evitare interferenze, viene aggiunto un secondo anticorpo coniugato ad un enzima.

Il secondo anticorpo essendo specifico per l'antigene, si va a legare ad esso, formando un "sandwich" anticorpo-antigene-anticorpo. Aggiungendo il substrato per l'enzima, si otterrà una reazione colorimetrica. L'assorbanza misurata dopo la reazione è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita presente.

Un altro approccio utilizzato per la quantificazione degli allergeni è l'ELISA competitivo. Questo saggio è preferito quando bisogna individuare proteine di piccole dimensioni. Sul supporto solido si trovano ancorati gli anticorpi specifici all'antigene di interesse, a cui vengono aggiunti gli antigeni marcati dall'enzima e il campione da analizzare (Figura 5). Se nel campione non è presente l'antigene, gli antigeni marcati dall'enzima si legheranno a tutti gli anticorpi presenti sul supporto solido; viceversa se nel campione è presente l'antigene, si avrà competizione tra l'antigene non marcato del campione e quello marcato nei confronti degli anticorpi. La misura dell'assorbanza del prodotto della reazione enzimatica sarà inversamente proporzionale alla concentrazione di antigene presente nel campione (Poms, et al., 2004).

2.3.1.2 Saggi indiretti

Oltre a quelli diretti sopra citati, esistono anche metodi di rilevazione indiretta dell'antigene. Si basano sull'utilizzo di un secondo anticorpo marcato dall'enzima mentre l'anticorpo primario non è marcato. L'anticorpo secondario riconosce

l'anticorpo primario legandosi ad esso. Nel caso del sandwich ELISA indiretto, l'assorbanza del prodotto di reazione enzimatica misurata è direttamente proporzionale alla quantità di antigene presente, invece nell'ELISA competitivo indiretto la reazione è inversamente proporzionale all'antigene presente nel campione (Schubert-Ullrich, et al., 2009).

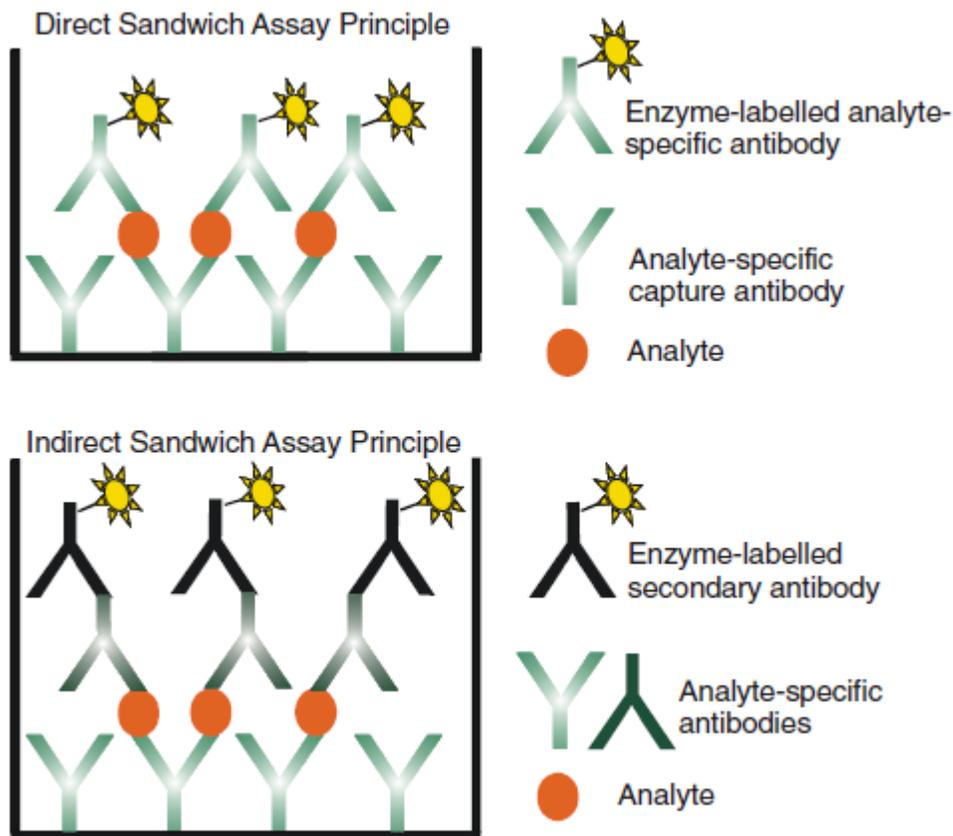


Figura 4. In alto, sandwich ELISA diretto con l'utilizzo di un anticorpo marcato da un enzima, specifico all'antigene. In basso, sandwich ELISA indiretto in cui è impiegato un anticorpo secondario marcato da un enzima (Schubert-Ullrich, et al., 2009).

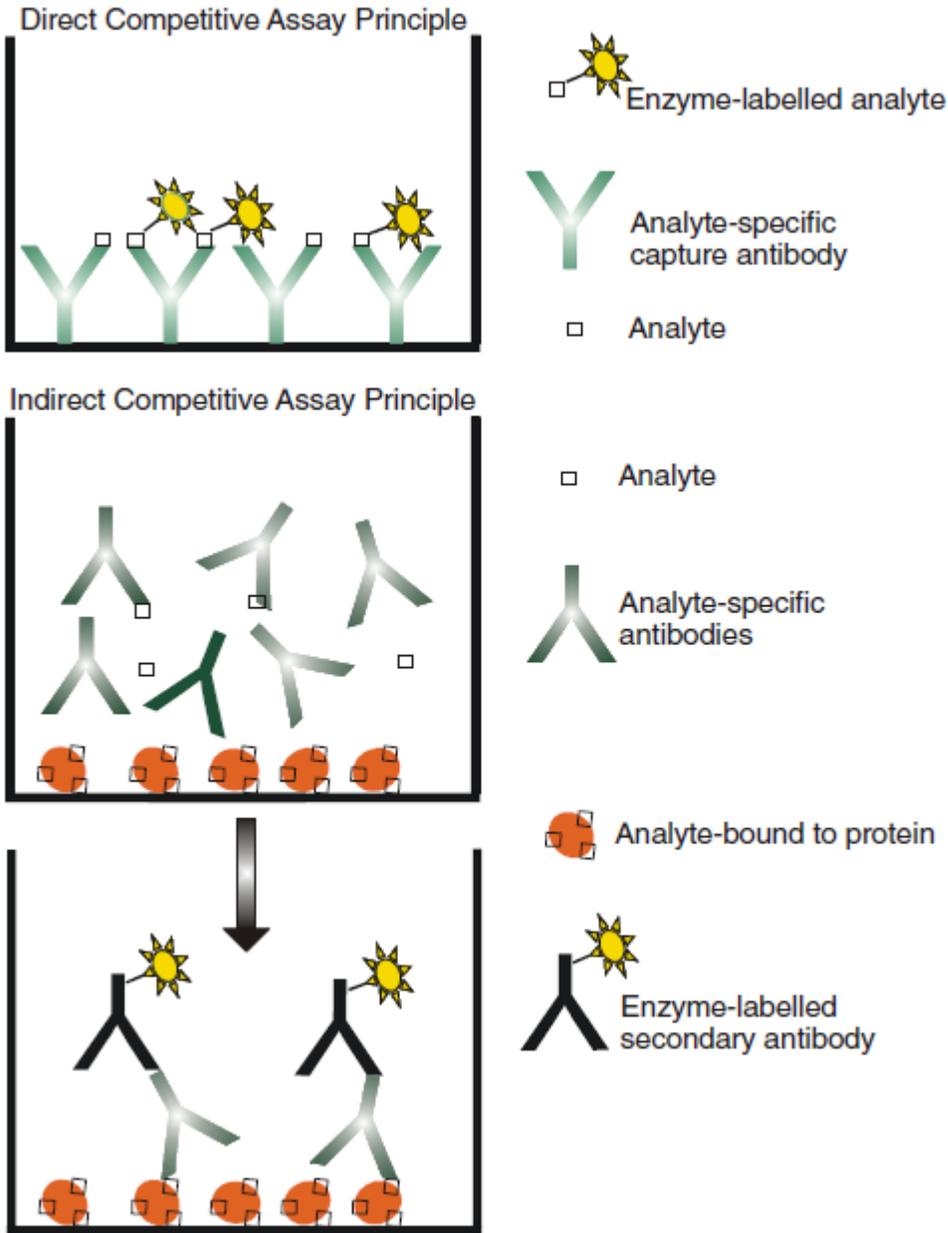


Figura 5. Sopra, raffigurazione di ELISA competitivo diretto in cui si crea competizione tra l'analita del campione e quello marcato. Sotto, ELISA competitivo indiretto con un anticorpo secondario marcato (Schubert-Ullrich, et al., 2009).

2.3.2 LFA (*Lateral flow assay*)

LFA è un test immunoenzimatico che si basa sugli stessi principi di ELISA e può quindi essere svolto con la metodica sandwich o quella competitiva. Il test viene eseguito su una membrana dove il campione, posizionato ad una estremità, si muove per capillarità verso una prima zona in cui sono presenti gli anticorpi specifici per l'antigene da individuare marcati da una sostanza per la rilevazione, poi il complesso antigene-anticorpo prosegue il suo flusso verso la vera e propria zona di rilevazione (test line) in cui sono presenti altri anticorpi specifici per l'antigene (Figura 6). Il risultato positivo è dato da una banda colorata visibile ad occhio nudo. La control line, posizionata successivamente alla test line, indica che il test si è svolto correttamente se risulta colorata (Schubert-Ullrich, et al., 2009).

Il suo maggiore vantaggio rispetto ad ELISA è la mancanza delle fasi di incubazione e lavaggio che lo rendono un saggio più rapido. Infatti, mentre LFA richiede in generale solo una decina di minuti per ottenere un risultato, ELISA impiega all'incirca 30-35 minuti per i kit più rapidi. Tuttavia, ELISA, in particolare nel formato sandwich, è il test preferito per la rilevazione degli allergeni dell'arachide perché ha una maggiore sensibilità e precisione, con un LOD che può arrivare fino a 0,15 mg/kg, e permette di ottenere risultati quantitativi a differenza di LFA che dà una risposta qualitativa. Come è infatti mostrato nella Tabella 2, esistono tre kit sandwich ELISA certificati da AOAC per la quantificazione degli allergeni dell'arachide (Wen, et al., 2007).

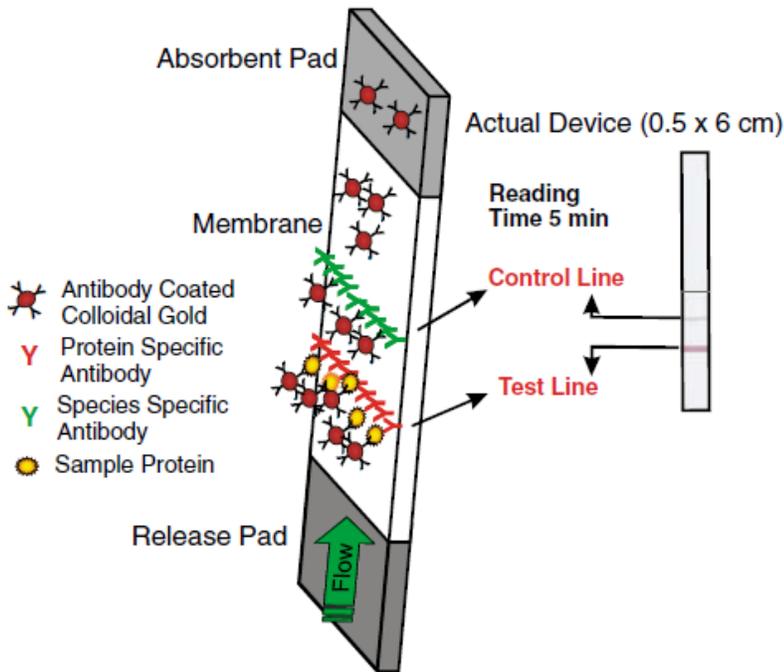


Figura 6. Esempio di lateral-flow assay nel formato sandwich (Schubert-Ullrich, et al., 2009).

Test kit	Target	Format	Screening/ quantification	Sensitivity	Testing time	Company	AOAC validation
I. Protein-based methods — enzyme-linked immunosorbent assay							
Alert	Peanut proteins	Sandwich	Screening	5 ppm	30 min	Neogen	No
Veratox	Peanut proteins	Sandwich	Quantification	2.5 ppm	30 min	Neogen	Yes
RIDASCREEN peanut	Peanut proteins	Sandwich	Quantification	2.5 ppm	90 min	R-Biopharm	No
RIDASCREEN FAST peanut	Peanut proteins	Sandwich	Quantification	1.5 ppm	30 min	R-Biopharm	Yes
BioKits peanut	Ara h1	Sandwich	Quantification	<0.1 ppm	75 min	Tepnel	Yes
Peanut residue	Ara h2	Sandwich	Screening	1 ppm	30 min	Elisa System	No
Peanut visual immunoassay		Sandwich	Quantification	0.5 ppm	120 min	Tecra	No
Single-Aller-Gene © Peanut ELISA	Ara h1	NA	NA	<2.5 ppm	NA	Eurofins Scientific	No
Peanut DiagnoKit	Major allergens	Competitive	Quantification	NA	95 min	Abkem Iberia	No
II. Protein-based methods — lateral flow assay							
Reveal	Peanut proteins	Sandwich	Screening	5 ppm	10 min	Neogen	No
BioKits rapid peanut	Ara h1	Sandwich	Screening	5 ppm	10 min	Tepnel	No
III. DNA-based methods							
Single-Aller-Gene © DNA tests Peanut PCR	NA	NA	NA	12 ppm	NA	Eurofins Scientific	No
Multi-Aller-Gene © Multi-Allergen Screening Test Peanut PCR	NA	NA	Screening	6 ppm	NA	Eurofins Scientific	No
Surefood Peanut PCR-ELISA	NA	PCR-ELISA	NA	10 to 50 ppm	4 to 6 h	R-Biopharm	No
Surefood Peanut Real-Time-PCR	NA	Real-Time-PCR	NA	10 to 50 ppm	60 min	R-Biopharm	No

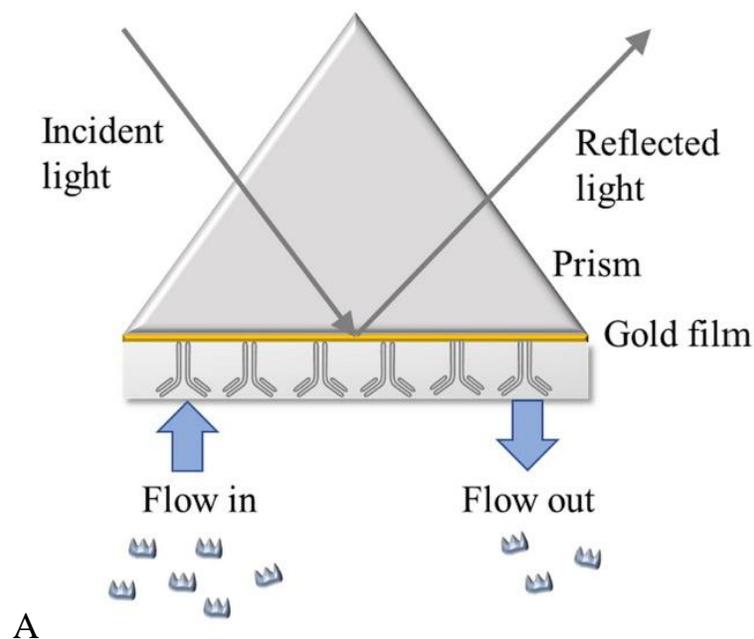
NA = not available.

Tabella 2. Kit commerciali per allergeni dell'arachide (Wen, et al., 2007).

2.3.3 Biosensori SPR (*Surface Plasmon Resonance*)

I biosensori SPR permettono di monitorare in tempo reale l'interazione degli allergeni in un campione con i loro recettori specifici, senza l'impiego di marcatori. Il biosensore, nella configurazione classica di Kretschmann, è costituito da un chip di metallo (di solito oro) dove da una parte si trova un prisma di vetro e dall'altra sono attaccati i recettori specifici per l'allergene da rilevare (Figura 7A). Un fascio di luce viene fatto incidere sul metallo attraverso il prisma, con una angolazione tale da avere totale riflessione. Il sensore funziona per un fenomeno fisico, la risonanza plasmonica di superficie, oscillazioni di elettroni che esistono all'interfaccia tra un metallo e un dielettrico (in questo caso tra oro e campione). L'eccitazione dei plasmoni, dovuta all'assorbimento di parte dell'energia del fascio di luce da parte di questa onda, genera risonanza. La condizione di risonanza è molto sensibile alla variazione dell'indice di rifrazione dovuto al legame degli analiti con i recettori, quindi permette di monitorare l'adsorbimento e il desorbimento di determinate molecole con la superficie. In particolare, quando gli analiti si legano si ha una riduzione dell'intensità della luce riflessa dalla parte del prisma e quindi anche una variazione dell'angolo di rifrazione che è direttamente proporzionale all'intensità del legame. Con un software di analisi dei dati, è possibile visualizzare su un grafico l'andamento dell'associazione e della dissociazione degli analiti con i recettori, sulla base dei diversi angoli di rifrazione (Figura 7B) (Zhou, et al., 2019). Nonostante la buona specificità e sensibilità dei sensori SPR, la strumentazione necessaria ha un costo elevato ed è ingombrante perciò sono poco diffusi nei laboratori per analisi di routine. Per ovviare a questi problemi, si sta studiando l'applicazione di una sonda a fibra ottica invece del prisma di vetro come sensore. Tuttavia, si è notato che a causa delle caratteristiche intrinseche della fibra ottica la sensibilità è inferiore rispetto ai biosensori SPR nella configurazione di Kretschmann. Infatti, a causa della perdita di polarizzazione si ha un calo di riflessione (Obando & Booksh, 1999). Dei ricercatori belgi (Pollet, et al., 2011) hanno provato a migliorare la sensibilità di un biosensore SPR a fibra ottica per la

rilevazione dell'allergene Ara h 1 in una matrice complessa (barretta di cioccolato) immobilizzando gli anticorpi specifici su nanoparticelle magnetiche. Sfruttando la proprietà del superparamagnetismo che le caratterizza, hanno riportato risultati soddisfacenti: confrontando il LOD ottenuto con quello di un biosensore SPR a fibra ottica senza nanoparticelle, è stato dimostrato come questo fosse migliorato di ben due ordini di grandezza, da 9 $\mu\text{g/mL}$ a 0,09 $\mu\text{g/mL}$. Inoltre, il biosensore a nanoparticelle è stato confrontato con un kit commerciale ELISA per l'arachide, il "Ridascreen fast", ed è emerso che non solo i tempi di analisi sono stati ridotti della metà (dai 45 minuti di ELISA ai 20 minuti della fibra ottica), ma anche che questo nuovo approccio ha un LOD assolutamente confrontabile con quello del test ELISA (0,09 $\mu\text{g/mL}$ contro 0.1 $\mu\text{g/mL}$).



B

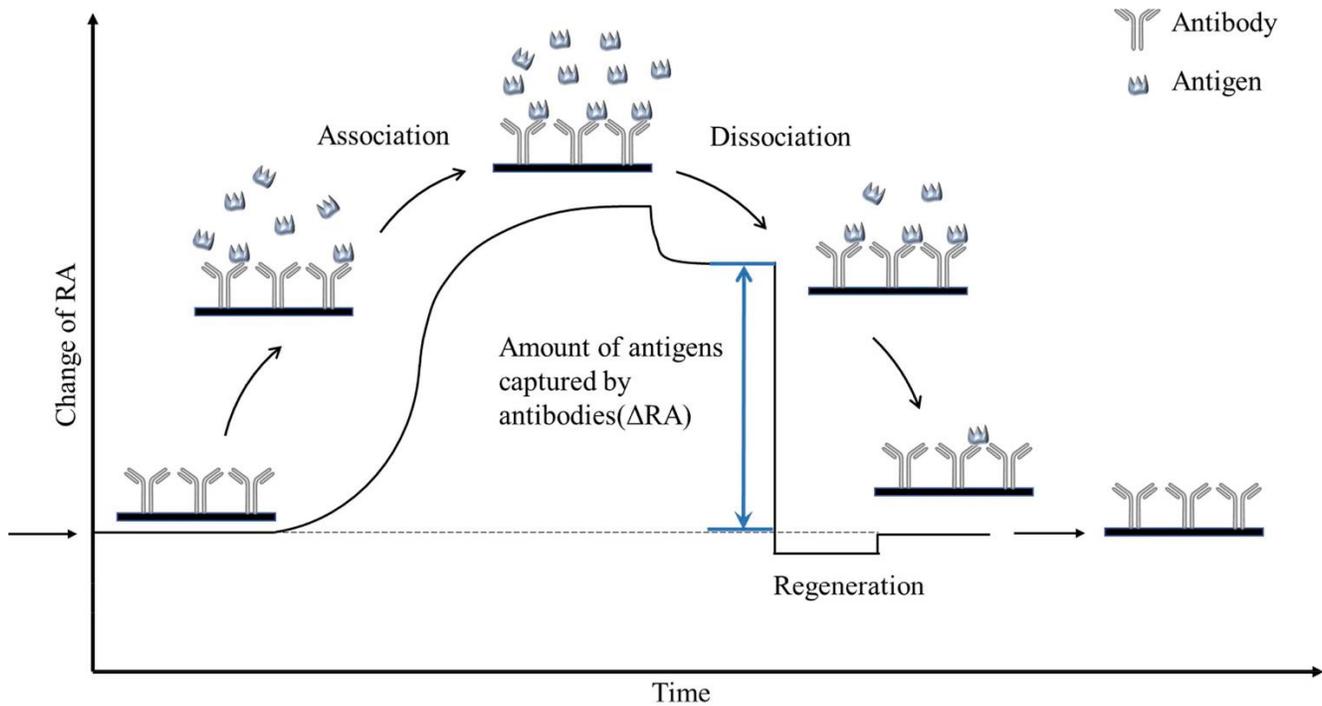


Figura 7. A, struttura di un biosensore SPR nella configurazione di Kretschmann. B, monitoraggio in tempo reale degli allergeni sulla base di interazioni antigene-anticorpo (Zhoua, et al., 2019).

2.3.4 Spettrometria di massa

Lo spettrometro di massa è uno strumento molto sensibile che permette di identificare gli ioni ottenuti dalla ionizzazione ed eventuale frammentazione degli analiti d'interesse in base al loro rapporto m/z e di quantificare gli analiti, che vengono separati tramite tecniche cromatografiche, in particolare per gli allergeni si preferiscono l'HPLC o l'UHPLC perché garantiscono la maggiore efficienza separativa (Ministero della Salute, 2018).

La rilevazione degli allergeni tramite spettrometria di massa richiede prima di tutto una fase preliminare per stabilire quali sono le proteine da rilevare nella matrice, selezionare i peptidi target e verificare la specificità di questi peptidi per le proteine che si vogliono

individuare. Gli allergeni vengono scelti considerando la quantità in cui possono essere presenti nella matrice da esaminare, la facilità di estrazione da essa, la riproducibilità della digestione enzimatica e la resistenza a processi tecnologici. Successivamente, appoggiandosi agli studi esistenti è necessario capire se per le proteine scelte sono già stati identificati dei peptidi specifici, cioè sequenze amminoacidiche tipiche solo di quella proteina e non di altri allergeni simili con cui condividono buona parte della struttura primaria (come isoforme o allergeni di altre sostanze appartenenti alla stessa classe biochimica), in modo che l'identificazione sia univoca. Inoltre, è fondamentale che tra i peptidi specifici vengano scelti quelli con caratteristiche idonee alla lettura allo spettrometro, come ad esempio un rapporto m/z ottimale, una forte intensità di segnale, un adeguato tempo di ritenzione e con un profilo di frammentazione riproducibile, derivanti da proteine non soggette a scissioni mancate da parte dell'enzima (Marzano, et al., 2020). Per quanto riguarda l'arachide, una recente ricerca ha messo in luce 16 peptidi specifici per le proteine Ara h 1 e Ara h 3 tenendo conto non solo degli aspetti precedentemente elencati ma anche di due differenti varietà commerciali (Virginia e Spanish) (Gavage, et al., 2020). Se uno studio di questo tipo non è ancora stato fatto sulla proteina d'interesse, spesso si ricorre alla shotgun proteomics, cioè ad una frammentazione di tutto il contenuto proteico di un campione in peptidi per identificarli e quantificarli (Croote & Quake, 2016). Per risalire alla proteina di provenienza delle varie sequenze amminoacidiche si può fare riferimento a banche dati come Allergen Peptide Browser (<http://www.AllergenPeptideBrowser.org/>).

Per incrementare la sensibilità analitica possono essere utili fasi della preparazione del campione volte ad eliminare possibili interferenti: ad esempio, si può ricorrere all'eliminazione dei grassi con solventi apolari come l'esano (Marzano, et al., 2020), si possono effettuare anche purificazioni del campione in seguito al trattamento enzimatico, mediante SPE (Solid Phase Extraction) (Bignardi, et al., 2013) (Planque, et al., 2017). Nella fase di digestione viene utilizzata principalmente la tripsina per ottenere i peptidi,

poi si passa in cromatografia per poter separare e selezionare dalla miscela peptidica solo quelli di interesse, scelti sulla base dei criteri spiegati precedentemente, che saranno i markers dell'allergene da identificare. I peptidi vengono infine sottoposti alla rilevazione dello spettrometro di massa (Croote & Quake, 2016). Nel caso degli allergeni, la spettrometria di massa tandem (MS/MS) è quella preferita perché consente di ottenere una accurata quantificazione grazie alla specificità del sistema che consente di selezionare e riframmentare specifici e scelti ioni che vengono poi riframmentati e analizzati, garantendo identificazione e quantificazione ottimali (Domon & Aebersold, 2006). Specificità e sensibilità, unite alla possibilità di individuare numerose proteine allergeniche contemporaneamente, rendono la tecnica HPLC-MS-MS più versatile rispetto ai saggi immunochimici, anche a fronte delle modificazioni che le proteine possono subire durante un processo tecnologico, riducendo i rischi di falsi negativi a causa della denaturazione della struttura proteica e all'interferenza con altre molecole che rendono gli epitopi non disponibili per la reazione (Croote & Quake, 2016). Diversi studi condotti su matrici complesse che uniscono cromatografia e spettrometria hanno dimostrato la capacità di individuare più allergeni insieme nell'ordine dei ppm (Careri, et al., 2007) (Bignardi, et al., 2013). In particolare, una tecnica UHPLC-MS/MS preceduta da una purificazione dei campioni tramite SPE ha registrato per ben 10 allergeni i limiti di quantificazione più bassi tra quelli riportati in letteratura, tra cui l'arachide con un LOQ di 2,5 mg/kg (Planque, et al., 2017). Tuttavia, la diffusione di questa tecnica è limitata nei laboratori dove si eseguono analisi di routine per gli allergeni a causa della complessità della tecnica analitica e dei costi elevati; le sue prospettive di utilizzo in questo campo sono legate principalmente ad analisi di secondo livello, ovvero come test di conferma dei risultati ottenuti con saggi ELISA. A questo scopo, un protocollo LC/MS/MS applicato a dei campioni di gelato addizionati con quantità note di Ara h 1 si è dimostrato efficace come tecnica analitica di conferma per ELISA; tutti i markers sono stati identificati fino a 10 ppm grazie all'aggiunta ai campioni di una molecola di 50 kDa detta "cutoff filter"

per escludere tutte le proteine con basso peso molecolare presenti nel campione che avrebbero potuto generare interferenza (Shefcheck & Musser, 2004).

2.3.5 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La PCR è una tecnica indiretta di rilevazione degli allergeni perché permette di identificare geni marker specifici per la codifica della proteina d'interesse. Anche in questo caso è fondamentale impiegare come target delle sequenze nucleotidiche tipiche per non avere falsi positivi o falsi negativi e, analogamente a quanto detto per i peptidi, si può fare riferimento alla letteratura e a banche dati pubbliche. La PCR consiste nell'amplificare la sequenza di DNA scelta attraverso vari cicli ripetuti di reazione (il numero di ripetizioni è generalmente compreso tra 30 e 40 per fare in modo che il prodotto sia "visibile"), dopo aver estratto con elevato grado di purezza il DNA dal campione e averlo aggiunto alla soluzione con i reagenti. Ogni ciclo è costituito da diverse fasi, ognuna delle quali avviene a una determinata temperatura:

- Denaturazione del DNA a 90°C che causa il distacco dei due filamenti;
- Attacco dei primers a monte e a valle della sequenza che si vuole amplificare (annealing) abbassando la temperatura fino a 50°- 60°C;
- Estensione/amplificazione a 72°C da parte di un enzima particolare, la Taq polimerasi, che crea una copia del frammento stampo;
- Ulteriore denaturazione per bloccare la sintesi e separare il nuovo frammento da quello stampo.

L'approccio classico per la lettura del prodotto amplificato tramite PCR è di tipo end-point, ovvero richiede l'applicazione dell'elettroforesi su gel e i risultati ottenuti sono semplicemente qualitativi perché l'intensità delle bande non è proporzionale alla quantità iniziale del frammento di DNA target. Per questo motivo, per la determinazione degli

allergeni si preferiscono metodiche analitiche quantitative come la real-time PCR e la digital PCR.

La real-time PCR non richiede nessun passaggio post-reazione come l'elettroforesi per poter visualizzare il risultato, ma si basa sulla misurazione della fluorescenza emessa in tempo reale man mano che si forma il prodotto di reazione; la quantità di fluorescenza prodotta è proporzionale alla quantità di copie di DNA generate, poi si risale alla quantità di frammenti inizialmente presenti nel campione grazie alla curva che ne risulta. Per poter ottenere un segnale luminoso si può ricorrere a diverse strategie. Il modo più semplice ed economico è quello di utilizzare delle colorazioni che intercalano con la doppia elica del DNA, ma così non è possibile distinguere tra i prodotti specifici e non specifici di amplificazione (Klein, 2002). Al loro posto, si utilizzano di solito sonde fluorescenti costituite da un oligonucleotide gene-specifico contenente due fluorocromi, detti reporter e quencher. Durante la fase di annealing, la sonda si lega al filamento target senza che si produca fluorescenza; nella fase successiva di estensione, l'attivazione della polimerasi causa il distacco della sonda e dei fluorocromi, i quali vengono sostituiti dal nuovo filamento complementare sintetizzato; ora il reporter, essendo libero e solubile, emette fluorescenza (Poms, et al., 2004). La real-time PCR è una tecnica analitica molto studiata per cercare di superare i limiti caratteristici dei saggi immunochimici, come la difficoltà di individuare gli allergeni in matrici complesse dovuta all'elevato numero di molecole interferenti e ai processi tecnologici che ne causano la denaturazione e quindi la perdita degli epitopi specifici per l'anticorpo (Hird, et al., 2003). Tuttavia, nonostante il DNA sia più resistente a trattamenti termici, la sensibilità della PCR risente della presenza di inibitori quindi se il materiale genetico non viene estratto con un livello di purezza adeguato, i risultati non sono affidabili (Wen, et al., 2007). Ad esempio, l'arachide è una matrice ricca in grassi, inibitori della PCR, quindi è necessario eliminarli prima di passare all'analisi; in uno studio (Hird, et al., 2003), prima di applicare un protocollo di real-time PCR per l'identificazione di Ara h 2 in campioni addizionati con l'arachide sono stati testati 7

diversi kit di estrazione commerciali ed è emerso che l'utilizzo di un kit per l'estrazione nei vegetali ha portato all'inibizione della Taq polimerasi per la presenza di un'alta concentrazione di inibitori. Di conseguenza, questo lavoro mette in evidenza che non bisogna sottovalutare l'importanza della fase di estrazione e che è necessario ricercare la giusta procedura per ogni matrice considerata al fine di ottenere il maggior grado di purezza possibile. Proprio perché sia test immunochimici come ELISA sia real-time PCR hanno vantaggi e svantaggi, quando questi saggi vengono confrontati, i risultati ottenuti mostrano valori simili in termini di sensibilità. Ad esempio, in una ricerca condotta su 33 alimenti diversi presenti sul mercato tedesco (principalmente cereali, snack e dolci) è stato visto che, sebbene i risultati ottenuti con una real-time PCR e un saggio ELISA di tipo sandwich non siano in completo accordo, sono entrambi adatti per la rilevazione di tracce di arachide in matrici processate (Stephan & Vieths, 2004). Inoltre, diversi studi in letteratura (Scaravelli, et al., 2008), (Miyazaki, et al., 2019) sull'applicazione della real-time PCR mostrano la capacità di rilevare fino a 10 ppm di arachide, una sensibilità simile a quella dei kit ELISA diffusi per le analisi di routine.

Un altro approccio sviluppato di recente è la Digital PCR. Il concetto di base è quello di distribuire il DNA presente nel campione in numerose frazioni di dimensioni molto piccole, fino a pochi picolitri. Questo può essere suddiviso in numerosissime micro-gocce (droplet Digital PCR) oppure separato in diversi compartimenti di un microchip (chamber-based Digital PCR). In ogni micro-goccia o cella viene quindi fatta avvenire la convenzionale reazione di PCR utilizzando sonde fluorescenti come nel caso della real-time PCR e al termine della reazione si procede con la quantificazione del segnale fluorescente ottenuto. In entrambi i casi si tratta di un approccio "end point", in cui vengono contati i risultati positivi e quelli negativi a seconda che ci sia stata o meno emissione di fluorescenza e quindi che il DNA fosse presente o meno in ogni micro-comparto. Successivamente, grazie ad analisi statistiche dei risultati si può risalire alla quantità di DNA target inizialmente presente nel campione (Pecoraro, 2019). I vantaggi

di questa tecnica risiedono nel fatto che è possibile ottenere una assoluta quantificazione del target senza far riferimento a una curva di calibrazione standard, si riduce l'interferenza con gli inibitori grazie all'elevata diluizione ed è possibile avere buoni risultati anche su campioni complessi e con basse concentrazioni del target. A differenza della real-time PCR, dove anche solo nel caso di una parziale inibizione dell'amplificazione si ha un ritardo nella comparsa del segnale fluorescente e quindi una sottostima della concentrazione del target, nella dPCR questo effetto viene decisamente ridotto quindi è una metodica estremamente precisa anche per campioni molto elaborati. Sebbene in letteratura siano presenti ancora pochi studi, una ricerca per la determinazione di soia e arachide in diverse matrici alimentari ha dimostrato che la digital PCR è una metodica analitica promettente perché consente di identificare più allergeni contemporaneamente senza che la sensibilità sia minore, condizione difficilmente ottenibile con la real-time PCR; inoltre, in questo caso è stato possibile utilizzare un solo metodo di estrazione del DNA, riducendo costi e tempi di analisi (Pierboni, et al., 2018).

Un altro formato disponibile è la PCR-ELISA, che unisce l'utilizzo di un target genomico alla tecnica di rivelazione semplice ed economica del saggio ELISA. Dopo l'amplificazione del DNA target tramite PCR, il prodotto viene marcato da una sonda proteica specifica per la sequenza nucleotidica. La proteina viene riconosciuta da un anticorpo marcato da un enzima quindi si può risalire alla concentrazione di DNA grazie al colore che si produce quando viene aggiunto il substrato per l'enzima. Sebbene anche questa metodica permetta una lettura del risultato senza elettroforesi, si tratta di un'analisi semi-quantitativa e non quantitativa come nel caso della real-time PCR (Poms, et al., 2004).

In generale, la PCR è poco diffusa nelle industrie alimentari a differenza di ELISA e LFA a causa del costo elevato della strumentazione necessaria; un altro fattore da considerare è che, trattandosi di un'analisi indiretta basata sul DNA presente nel campione, non è detto che ci sia correlazione diretta tra il materiale genomico presente e l'effettivo contenuto di

allergeni (Wen, et al., 2007). Tuttavia, per l'arachide esistono anche alcuni kit commerciali di tipo PCR, sia in modalità real-time che combinata ad ELISA, con LOD che vanno da 10 a 50 ppm (Tabella 2). Similmente a quanto detto per la spettrometria di massa, alcuni studi che applicano la PCR per la determinazione di allergeni nelle matrici alimentari ne prevedono l'impiego come test di conferma per ELISA più che per analisi di primo livello (Miyazaki, et al., 2019).

CAPITOLO 3 - POSSIBILI STRATEGIE PER LA RIDUZIONE DEL POTERE ALLERGICO

Attualmente, non esistendo misure preventive per l'insorgenza delle reazioni allergiche, si stanno studiando tecniche per rendere gli allergeni presenti nei prodotti non-immunoreattivi. In questo modo, anche gli individui allergici potrebbero consumare gli alimenti contenenti determinate sostanze allergiche senza alcun rischio per la loro salute. Tuttavia, è difficile capire l'effettiva efficacia di un trattamento sulla risposta immunitaria perché spesso gli studi vengono condotti su modelli *in vitro* e con allergeni puri invece che nell'intera matrice. Inoltre, bisogna considerare che ogni allergene può subire modificazioni differenti a seconda della sua natura, della matrice in cui si trova e del processo tecnologico utilizzato. Numerosi metodi di tipo fisico, chimico e biologico vengono applicati sugli allergeni dell'arachide e spesso vengono combinati tra loro per cercare di ottenere un maggiore decremento del potere allergico (Pi, et al., 2019) (Shah, et al., 2019).

3.1 Trattamenti termici

I trattamenti termici sono sicuramente i metodi più studiati perché strettamente correlati alle abitudini di consumo dell'arachide. Infatti, mentre la popolazione asiatica tende a preferire le arachidi bollite o fritte, nei paesi occidentali si consumano prevalentemente le arachidi tostate. Diversi studi dimostrano che gli allergeni contenuti nelle arachidi tostate, confrontate con quelle crude, bollite e fritte hanno una maggiore capacità di legare le IgE e quindi in questo caso il processo termico determina un incremento del loro potere allergico (Maleki, et al., 2000) (Zhang, et al., 2019). Ciò è dovuto al fatto che durante il processo di tostatura, la reazione di Maillard causa delle modificazioni covalenti alla struttura proteica, determinando una riduzione della solubilità degli allergeni e un aumento della resistenza alla digestione a livello dello stomaco. Di conseguenza, giungono intatti nel tratto intestinale e la capacità di legare le immunoglobuline è

maggiore (Maleki, et al., 2000) (Kopper, et al., 2005). Al contrario, gli altri metodi di cottura diminuiscono il potere allergico dell'arachide. Ad esempio, in uno studio condotto su due diverse varietà di arachide sottoposte a frittura, bollitura e tostatura si è visto che nei primi due casi non solo Ara h 1, Ara h 2 e Ara h 3 legano un numero minore di IgE, ma che contemporaneamente diminuisce la quantità di Ara h 1 presente nel prodotto, rispetto alle arachidi tostate (Beyer, et al., 2001). Per incrementare l'effetto di un trattamento termico, si è provato a studiare l'effetto della glicosilazione sugli epitopi, ovvero l'associazione covalente tra proteine e zuccheri. Aggiungendo glucosio ad Ara h 2 e 6 estratti e purificati da arachidi crude, si è visto che la capacità di legare IgE è minore rispetto al trattamento termico condotto in assenza di glucosio (Vissers, et al., 2011a). Inoltre, la capacità di legare IgE da parte di Ara h 1 è ridotta di 9000 volte quando viene sottoposto ad un trattamento a 145°C per 20 minuti in presenza di glucosio in confronto ad Ara h 1 non trattato; Ara h 1 sottoposto allo stesso trattamento termico senza glucosio ha mostrato una diminuzione solo di 3,6 volte e il grande decremento ottenuto con gli zuccheri potrebbe essere dovuto alla formazione di aggregati di grandi dimensioni (Vissers, et al., 2011b).

3.2 Trattamenti non termici

Proprio perché la tostatura non aiuta a ridurre il potere allergico dell'arachide e che trattamenti termici elevati non impattano solo sulle proprietà degli allergeni ma anche sulle caratteristiche organolettiche e nutrizionali degli alimenti, portando magari a risultati non desiderati, vengono studiate anche altre tecnologie non termiche per cercare di conciliare alta qualità e ridotta allergenicità (Ekezie, et al., 2018) (Shah, et al., 2019).

3.2.1 Raggi γ

I raggi gamma sono onde elettromagnetiche ad alta frequenza con elevata capacità penetrante, generate da un acceleratore di elettroni a partire dal decadimento radioattivo di cesio 137 o cobalto 60. Il loro meccanismo d'azione si basa sulla ionizzazione della

materia con produzione di radicali liberi. Oltre a danneggiare le cellule microbiche agendo sul DNA ottenendo un effetto pastorizzante, l'esposizione ai raggi gamma causa modificazioni dei nutrienti. In particolare, per quanto riguarda le proteine, si hanno cambiamenti strutturali (come frammentazione, aggregazione, cross-linking con altre molecole, modificazioni degli amminoacidi, formazione di gruppi reattivi) provocati direttamente dai fotoni o dalle specie reattive che si generano (Ekezie, et al., 2018). Gli studi condotti applicando i raggi gamma hanno dimostrato che questi possono alterare la capacità degli epitopi nel legare le immunoglobuline. Ad esempio, l'esposizione di Ara h 6 e di un estratto di proteine di arachide a trattamenti di diverse dosi (1 – 10 kGy) ha provocato cambiamenti nella struttura secondaria e terziaria con perdita degli epitopi. Gli effetti maggiori si sono avuti con dosi più alte di radiazioni, cioè a 10 kGy, dove l'abilità di legare IgG da parte di Ara h 6 è diminuita fino al 5% (Luo, et al., 2013). Le radiazioni gamma, sebbene promettenti per la riduzione del potere allergico, hanno una bassa prospettiva di applicazione. Prima di tutto, si ha una perdita del valore nutrizionale dell'alimento trattato: una ricerca condotta sulle arachidi in guscio, pelate e scottate sottoposte a diverse dosi di radiazioni gamma (fino a 10 kGy) e poi monitorate durante un periodo di conservazione di sei mesi a temperatura ambiente ha dimostrato che si ha una perdita modesta nel contenuto di tocoferoli e una maggiore produzione di composti di ossidazione rispetto alle arachidi non trattate e che questi effetti sono ancora più accentuati nei campioni pelati (De Camargo, et al., 2012). Inoltre, nonostante sia stata dimostrata la non tossicità delle radiazioni gamma per l'uomo alle dosi in cui vengono trattati gli alimenti e che queste siano state autorizzate dalla FAO/IAEA/WHO Expert Committee nel 1980 fino a dosi massime di 10 kGy, ancora non tutti i Paesi hanno permesso l'utilizzo di questa tecnologia e, anche quando possibile, l'utilizzo è esteso a pochi alimenti. Nell'Unione Europea, l'irraggiamento è consentito solo su erbe essiccate, spezie e condimenti vegetali (Dir. 1999/2/CE e Dir. 1999/3/CE), sempre con un massimo di 10 kGy. Di conseguenza, l'applicazione con l'obiettivo di ottenere matrici alimentari

ipoallergeniche non può trovare spazio in questo contesto, anche per altre modificazioni che la radiazione ad alta energia provoca su altri nutrienti della matrice.

3.2.2 Luce UV pulsata (PUV)

La luce ultravioletta pulsata è una tecnologia che sfrutta un ampio spettro di lunghezze d'onda (da 200 nm a 1000 nm). L'energia viene immagazzinata in un condensatore e rilasciata come impulsi ad alta intensità, in un numero che va da 1 a 20 impulsi per secondo (Yang, et al., 2012) (Shah, et al., 2019) (Dong, et al., 2020). Un trattamento PUV condotto su estratti di arachide e su burro di arachidi, rispettivamente della durata di 4 e 3 minuti, applicando 3 impulsi/secondo ad una distanza di 14,6 cm dall'asse centrale della lampada, è risultato più efficace della bollitura nel ridurre il potere allergico; inoltre, confrontata con i campioni non trattati, la capacità di legare IgE è ridotta di sette volte. I buoni risultati ottenuti applicando PUV sono dovuti alla formazione di aggregati irreversibilmente insolubili (Chung, et al., 2008). Anche Yang et al. (2012) hanno riportato una diminuzione del potere allergico di Ara h 1, Ara h 2 e Ara h 3 in campioni di burro di arachide e di estratti di arachidi crude e tostate, sottoposti a PUV per durate differenti (da 1 a 6 minuti) e a varie distanze dalla lampada (da 10,8 a 18,2 cm). Come si può facilmente immaginare, l'effetto è più evidente per tempi di applicazione maggiori e per distanze minori dalla lampada. Nonostante i risultati incoraggianti, l'utilizzo dei PUV a livello industriale non è ancora diffuso perché mancano studi *in vivo* che confermino la reale efficacia di questo trattamento nella riduzione del potere allergico; anche in questo caso, resta da verificare l'impatto della radiazione sull'entità dell'ossidazione lipidica.

3.2.3 Alte pressioni

Le alte pressioni vengono comunemente impiegate nelle industrie alimentari per ridurre la carica microbica con minimi danni qualitativi del prodotto, dato che questa tecnologia non agisce sui legami covalenti ma modifica le interazioni più deboli come legami a ponte idrogeno, interazioni idrofobiche e legami ionici. Di conseguenza, le sostanze d'interesse

nutrizionale e organolettico come vitamine, pigmenti e composti volatili non subiscono alterazioni: le proteine mantengono intatti gli amminoacidi e la loro struttura primaria, ma cambiano la struttura secondaria, terziaria e quaternaria a seconda del livello di pressione applicato e del tempo di esposizione. Sono proprio le variazioni strutturali che ne derivano che permettono una riduzione del potere allergico. Infatti, è stato dimostrato che le alte pressioni idrostatiche (≥ 400 Mpa), modificando la conformazione spaziale di Ara h 1 con la formazione di nuovi multimeri, alterano la posizione di alcuni epitopi. L'effetto massimo è stato registrato a 600 Mpa per 1200 s, con una riduzione del potere allergico del 74,7% rispetto al campione non trattato (Pan, et al., 2020). Risultati simili stati riscontrati anche da Huang et al. (2014b), in cui è stato visto che l'immunoreattività dell'arachide diminuisce del $69.2 \pm 5.3\%$ e del $73.3 \pm 1.9\%$ dopo 10 minuti a 600 e 800 Mpa rispettivamente, in confronto con il campione non sottoposto al trattamento. Unendo due tecnologie diverse secondo l'approccio degli "hurdles", è emerso che l'associazione tra alte pressioni e alte temperature diminuisce in modo ancora più marcato il poter allergico. Sottoponendo estratti di Ara h 2 a 600 Mpa e temperature comprese tra 55 e 75°C, la capacità di legare le IgE è diventata quasi nulla (Long, et al., 2016). Ovviamente, nel caso di un trattamento spinto come questo, bisognerebbe prendere in considerazione gli effetti organolettici che ne derivano. In conclusione, dai dati presenti in letteratura per quanto riguarda l'arachide, le alte pressioni sembrano essere una buona soluzione per ottenere alimenti ipoallergenici, anche se sono necessarie maggiori valutazioni della risposta immunologica nell'uomo dei prodotti trattati.

3.2.4 Idrolisi e cross-linking con enzimi

I trattamenti enzimatici sono uno degli approcci chimici più promettenti per ottenere alimenti ipoallergenici. I vantaggi risiedono nel fatto che gli enzimi degradano efficacemente gli epitopi e producono modificazioni chimiche sicure per il prodotto. Possono agire sull'allergene in due modi diversi: nascondendo i siti antigenici tramite fenomeni di cross-linking e impedendo il loro legame con gli anticorpi specifici, oppure

scindendo la proteina in frammenti, distruggendo così la sua conformazione nativa e alterandone le proprietà fisico-chimiche. La diminuzione della capacità di legare le immunoglobuline delle proteine trattate dipende da diversi fattori, tra cui la natura dell'allergene, le condizioni di processo, la penetrazione dell'enzima nella matrice e il rapporto enzima-substrato (Shah, et al., 2019). Ad esempio, la stabilità alla digestione che caratterizza molti allergeni rende difficile ottenere una buona efficacia con l'utilizzo di enzimi umani (pepsina, tripsina e chimotripsina). Tra gli allergeni dell'arachide, Ara h 2 è uno dei più resistenti e mostra una azione inibitoria della tripsina, aumentata dalla tostatura. Per questo, da uno studio condotto su arachidi tostate è emerso che il pretrattamento del prodotto con un blanching accresce l'efficienza idrolitica di tripsina e α -chimotripsina; il risultato migliore è stato ottenuto combinando i due enzimi in rapporto 1:1 (ad una concentrazione totale del 0,15%), riducendo così Ara h 1 e Ara h 2 negli estratti solubili fino al 100% e al 98%, rispettivamente, sulla base di un saggio ELISA (Yu, et al., 2011). Anche gli ultrasuoni sono un utile strumento per il pretrattamento di arachidi tostate perché, similmente al blanching, favoriscono l'attività enzimatica, con il vantaggio che mantengono meglio la qualità organolettica del prodotto (Li, et al., 2013) (Yu, et al., 2015). Oltre alle proteasi presenti nel tratto gastro-intestinale umano, possono essere applicati anche altri enzimi non specifici (come alcalasi, papaina, neutrase e bromelina) anche se tra questi, secondo uno studio condotto su Ara h 1, Ara h 2 e Ara h 6, solo l'alcalasi dimostra un'elevata capacità nel ridurre la loro presenza in arachidi crude (Yu & Mikiashvili, 2020). L'ostacolo comune all'impiego delle proteasi risiede nel fatto che le proprietà sensoriali dell'alimento risultano alterate. Per ovviare a questo problema, una recente ricerca ha dimostrato che l'utilizzo della transglutaminasi negli estratti proteici dell'arachide precedentemente sottoposti a idrolisi per ottenere un prodotto ipoallergenico, permette di non modificare la riduzione del potere allergico ottenuta con il trattamento enzimatico, ma allo stesso tempo aumenta le proprietà funzionali della matrice, come capacità emulsionante e schiumogena (Meng, et al., 2020). Per quanto

riguarda il cross-linking, sia la perossidasi che la polifenolossidasi possono essere sfruttati per ridurre il potere allergico nell'arachide. Entrambi catalizzano l'ossidazione dei fenoli a *o*-chinoni, i quali possono poi reagire con altri composti fenolici, amminici e sulfidrici. Se il chinone e uno di questi altri gruppi si trovano su due proteine diverse, si ha un fenomeno di cross-linking tra le due strutture proteiche. Uno studio ha dimostrato che, a parità di condizioni di incubazione (37°C e pH 8 in presenza di acqua ossigenata), la perossidasi non riduce il contenuto di Ara h 1 e Ara h 2 nelle arachidi crude, mentre al contrario l'effetto è molto marcato in quelle tostate (Chung, et al., 2004). Nel caso della polifenolossidasi, è stato aggiunto acido caffeico ad estratti di arachide, in modo che il cross-linking potesse avvenire anche tra proteine non contenenti residui di tirosina. La sinergia tra l'enzima e il composto fenolico ha portato a un decremento maggiore della capacità di legare IgE rispetto all'impiego della PPO e dell'acido caffeico separatamente (Chung, et al., 2005).

3.2.5 PEF (*campi elettrici pulsati*)

I PEF si basano sull'erogazione di una scarica di impulsi ad alto voltaggio su un prodotto posto tra due elettrodi. Ne deriva una elettroporazione reversibile o irreversibile delle cellule, che viene sfruttata principalmente per l'inattivazione microbica o per l'estrazione di determinate sostanze. Per quanto riguarda gli allergeni, non ci sono ancora molti studi sull'applicazione dei PEF e i pochi dati presenti in letteratura non sono particolarmente promettenti. Uno studio ha analizzato l'effetto di questa tecnologia su allergeni di arachide (Ara h 2 e 6) e mela (Mal d 1 e 3) impiegando un voltaggio fino a 35 kV/cm, energia fino a 130 kJ/kg e una frequenza di 2 Hz; tramite spettroscopia a dicroismo circolare, è stato dimostrato che non ci sono stati cambiamenti significativi nella struttura secondaria ed è più probabile che le minime variazioni siano state causate dalle oscillazioni di temperatura registrate durante il trattamento (Johnson, et al., 2010). In una ricerca più recente si è visto che l'utilizzo di PEF ha portato alla formazione di random coils e ripiegamenti; tuttavia, con uno studio *in vitro* sembra che, in modo simile a quanto accade per le arachidi tostate,

l'aumento della digeribilità dovuta alla perdita della struttura secondaria incrementa il potere allergico perché si ha un'esposizione maggiore degli epitopi (Vanga, et al., 2016). Di conseguenza, sarebbero necessari ulteriori approfondimenti sull'applicazione dei PEF con lo scopo di ottenere prodotti ipoallergenici perché i dati presenti per ora in letteratura sono scarsi per valutarne l'effettiva efficacia.

3.2.6 Acidi organici

In letteratura sono presenti diversi lavori che riportano l'effetto di vari acidi organici sugli allergeni dell'arachide. Tra questi, l'acido fitico è stato proposto da Chung e Champagne (2007) come additivo per ottenere bevande ipoallergeniche contenenti burro di arachidi (smoothie) per la sua capacità di formare complessi insolubili con Ara h 1, Ara h 2 e Ara h 3. In particolare, il legame coinvolge gruppi amminici presenti nella catena laterale di amminoacidi come la lisina e i gruppi fosfato dell'acido fitico. Trattando estratti di arachidi crude e tostate, si è visto che il contenuto proteico è stato ridotto notevolmente, in particolare in corrispondenza delle bande di queste tre proteine in SDS-PAGE. La diminuzione è stata più marcata negli estratti crudi che tostate perché i primi hanno più gruppi amminici liberi presenti nella catena laterale della lisina rispetto ai secondi, dato che vengono consumati come substrati della reazione di Maillard durante il processo di tostatura. Bisogna considerare però che, siccome la lisina è presente in forma cationica solo a pH minori di 8, trattamenti a pH 8,5 non hanno alcun effetto sul contenuto di allergeni negli estratti, mentre a pH 3 e 7 questo viene ridotto perché riesce a legare i gruppi fosfato carichi negativamente dell'acido fitico. Oltre a una minore presenza di allergeni, i ricercatori hanno dimostrato tramite un saggio ELISA con siero di pazienti allergici che negli estratti ottenuti la capacità di legare IgE è ridotta di sei volte rispetto ai campioni non trattati. Nonostante i buoni risultati *in vitro* e le proprietà positive dimostrate dell'acido fitico come antiossidante, i complessi che si formano sono insolubili a pH acidi e neutri ma non a quelli alcalini. Di conseguenza, a livello intestinale (pH 8) si potrebbe avere un rilascio degli allergeni e quindi una reazione allergica negli individui sensibilizzati

(Chung & Champagne, 2007). Per ovviare a questo problema, lo stesso autore ha studiato l'effetto di altre sostanze fenoliche, l'acido tannico e l'acido gallico (cioè il relativo monomero). Applicando diverse quantità di acido tannico a campioni di burro d'arachidi, il contenuto di proteine è diminuito all'aumentare della concentrazione, fino a una quasi totale scomparsa delle bande in SDS-PAGE a 2 mg/mL e i complessi sono risultati stabili sia a pH 2 sia a pH 8. Diversamente, l'acido gallico si è dimostrato meno efficace perché il decremento del contenuto proteico è iniziato solo ad una concentrazione di 4 mg/mL e i complessi sono instabili ad entrambi i pH. Così come era emerso per l'acido fitico, la capacità di legare IgE si riduce proporzionalmente all'incremento della concentrazione di acido tannico (75% a 1 mg/mL e 100% a 2 mg/mL). Inoltre, è stato dimostrato che in presenza di 1 M di NaCl non si avrebbero fenomeni di interferenza nel legame tra proteine e acido tannico quindi questa strategia è applicabile in alimenti contenenti sale (Chung & Reed, 2012). Un'altra ricerca propone l'impiego di acido oleico nella sua forma salina di sodio oleato, visto che è in grado di ridurre la capacità di legare IgE ad una concentrazione di 5 mM in campioni di arachide, superando così il problema della diversa polarità di acido oleico e allergeni che non permetterebbe la loro interazione (Chung, et al., 2015).

3.2.7 *Ingegneria genetica*

L'ingegneria genetica è una tecnologia che permette di ottenere organismi geneticamente modificati (OGM), cioè che possiedono un patrimonio genetico modificato appositamente per ottenere un determinato scopo. Le modificazioni consistono in genere nell'eliminare, aggiungere o modificare elementi genici per silenziarne o esprimerne l'attività e quindi bloccare o stimolare la produzione di determinate proteine. La sintesi degli allergeni può essere quindi inibita a due livelli differenti, trascrizionale (TGS) o post-trascrizionale (PTGS), a seconda che venga bloccata la produzione di mRNA o che questo venga degradato dopo essere già stato prodotto. Per l'arachide viene più comunemente utilizzato il PTGS per via della sua specificità nel degradare l'mRNA. In particolare, l'mRNA interference (RNAi) è un approccio post-trascrizionale promettente per eliminare il

filamento di RNA codificante per gli allergeni. Consiste nell'isolare frammenti di DNA codificanti per la proteina target e utilizzarli come transgeni all'interno di una cassetta genetica, cioè un elemento genetico mobile che viene poi inserito all'interno della cellula sfruttando uno dei seguenti metodi:

- La biolistica, che consiste nell'inserire microsfere di metallo ricoperte di DNA all'interno della cellula;
- L'utilizzo di *Agrobacterium tumefaciens* come vettore per la trasmissione del DNA grazie alla sua capacità di integrare un plasmide, detto T-DNA, all'interno del genoma vegetale.

Successivamente, è necessario non solo valutare se il materiale genetico estraneo è stato effettivamente integrato all'interno della cellula con analisi molecolari, ma anche eseguire analisi immunologiche sui semi transgenici per verificare la scomparsa dell'allergene e la qualità nutrizionale del prodotto ottenuto (Dodo, et al., 2005). Uno studio ha dimostrato che l'utilizzo della RNAi tramite infezione da *Agrobacterium tumefaciens* porta a una riduzione significativa del contenuto di Ara h 2 nelle arachidi transgeniche di prima generazione e che di conseguenza anche il potere allergico degli estratti proteici risulta minore, sottoponendo ad ELISA il siero di pazienti allergici; inoltre, i ricercatori non hanno riscontrato nessun tipo di differenza nel fenotipo, nel tasso di crescita e nella produzione di semi tra le piante transgeniche e quelle non modificate. Un aspetto interessante emerso da questo lavoro è che nella prima generazione si osserva che non tutti i semi di uno stesso baccello presentano una riduzione nel contenuto di Ara h 2. Dato che questo fenomeno è dovuto all'eterozigosi che caratterizza la prima generazione di piante transgeniche, si prevede che nelle generazioni seguenti si arriverà ad una omozigosi per il silenziamento genico e quindi un maggiore numero di semi ipoallergenici (Dodo, et al., 2008). Risultati simili sono stati ottenuti anche da un'altra ricerca condotta su Ara h 2 e Ara h 6 per quanto riguarda tutti e tre gli aspetti precedentemente considerati (silenziamento genico, riduzione della capacità di legare IgE da parte di siero di pazienti

allergici e assenza di differenze tra piante modificate e non). In questo caso è stato visto anche che, a differenza di quanto previsto, l'inattivazione della sintesi di Ara h 2 e Ara h 6 non ha favorito lo sviluppo *in vitro* di *Aspergillus flavus* (responsabile della contaminazione dell'arachide di aflatossine), nonostante Ara h 2 abbia una funzione inibitoria nei confronti della tripsina che è un meccanismo di difesa contro insetti e patogeni tipico delle piante (Chu, et al., 2008). Sebbene la specificità di una tecnica come l'RNA interference sia elevata e permetta di raggiungere buoni risultati nel silenziamento genico, gli OGM sono tuttora una tematica controversa. Questo perché non è ancora ben chiaro se esistano dei rischi per la salute dell'uomo a seguito di un consumo a lungo termine di alimenti transgenici. A livello europeo è stato stabilito che la commercializzazione di prodotti geneticamente modificati è possibile solo se questi sono stati preventivamente autorizzati dalla Commissione Europea a seguito di una valutazione del rischio per la salute umana e per l'ambiente da parte dell'EFSA. La normativa di riferimento è rappresentata dal Regolamento (CE) n. 1829/2003 e dal Regolamento (CE) n. 1830/2003, che stabiliscono la procedura di autorizzazione all'immissione in commercio, i requisiti specifici in materia di tracciabilità ed etichettatura e fissano la soglia di tolleranza della presenza accidentale o tecnicamente inevitabile di OGM. Secondo il registro comunitario, gli OGM attualmente sviluppati, autorizzati e commercializzati sono mais, soia, colza, cotone e barbabietola da zucchero. In Italia, nessuna di queste piante geneticamente modificate viene coltivata a fini commerciali, anche se è consentita la commercializzazione dei loro prodotti nel rispetto delle regole di etichettatura (Direzione generale dell'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione, 2018).

CONCLUSIONI

Gli allergeni sono una delle maggiori problematiche in ambito alimentare, in primo luogo per il fatto che rappresentano un grave rischio per la salute del consumatore, ma anche per le aziende produttrici, visto l'obbligo a livello europeo di riportare tutti gli ingredienti allergenici in etichetta per garantire un elevato grado di sicurezza. Tuttavia, per la rilevazione degli allergeni nelle matrici alimentari ancora oggi non esistono metodi standard di riferimento univoci e per questo i risultati possono non essere affidabili, precisi e riproducibili. L'obiettivo di questo lavoro era di fare una raccolta ragionata delle tecniche di analisi attualmente più diffuse per la rilevazione degli allergeni, mostrandone i rispettivi vantaggi e svantaggi; nonostante, infatti, alcune tecniche pubblicate in letteratura abbiano una buona sensibilità, in generale risulta difficile raggiungere sensibilità soddisfacenti per poter individuare quantità molto basse tipiche di un'eventuale contaminazione accidentale. Un'altra carenza è quella di carattere legislativo: mancano infatti valori di riferimento per poter stabilire quando scrivere in etichetta che un prodotto contiene un allergene, determinati anche sulla base della soglia di sensibilità e di reazione allergica dei consumatori predisposti. In un contesto così complicato, per le industrie alimentari è rischioso dichiarare come "allergen-free" un prodotto senza avere l'evidenza scientifica che sia effettivamente sicuro, come per i consumatori sensibili è difficile trovare alimenti adatti per le loro esigenze. In questo quadro di riferimento, l'arachide oggetto di questo lavoro, contiene gli allergeni alimentari con il maggiore rischio di risposta anafilattica mortale mentre il numero di individui allergici aumenta, specialmente tra i bambini. Bisogna poi considerare che le arachidi vengono largamente consumate in tutto il mondo, soprattutto come ingrediente di vari prodotti (ad esempio snack, dolci e salse), per via del basso costo e delle buone proprietà nutrizionali, tecnologiche e organolettiche che le caratterizzano. Oltre ad ulteriori studi clinici che permettano di comprendere la relazione dose-reazione e di definire a livello legislativo una soglia critica, l'obiettivo da perseguire sarebbe quello di validare un unico kit rapido e semplice di tipo

ELISA per ogni allergene, da utilizzare nelle aziende per controlli di routine; sarebbe poi utile confermare i risultati ottenuti eseguendo analisi di secondo livello tramite PCR e/o cromatografia, con procedure standard che tengano in considerazione delle caratteristiche della matrice in esame. Solo grazie ai dati ricavati da metodi analitici complementari validati si potrebbe arrivare ad una risposta accurata e precisa per ogni alimento, indipendente dal laboratorio, indispensabile per garantire il rispetto delle norme cogenti e tutelare il consumatore.

Siccome non esiste un modo per evitare l'insorgere di una allergia, l'unica alternativa per ovviare al problema è cercare una strategia efficace per ridurre il potere allergico degli alimenti per renderli accessibili anche alla popolazione allergica. Di conseguenza, nell'ultima parte di questo lavoro sono stati analizzati diversi trattamenti termici e non termici, focalizzandosi sull'effetto che hanno sulle proteine dell'arachide. Anche su questo fronte c'è però ancora molta strada da fare, visto che la maggior parte dei risultati promettenti ottenuti fino ad ora emergono principalmente da studi *in vitro*. Prima di poter applicare su larga scala un processo per la riduzione del contenuto di allergeni di un prodotto, sarà necessario andare a valutare l'effetto *in vivo*, prendendo in considerazione anche le possibili modificazioni nutrizionali e sensoriali che queste tecnologie possono provocare ed infine se i costi e i tempi di trattamento sono sostenibili. In particolare, le tecnologie di maggiore interesse che potrebbero vedere una applicazione a questo scopo sono quelle "mild", visto che c'è sempre più l'esigenza di mantenere un elevato livello qualitativo dei prodotti trasformati. In questa ottica, la combinazione di più strategie innovative non termiche potrebbe essere l'approccio più interessante per futuri studi.

BIBLIOGRAFIA

- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15.
- Beyer, K., Morrow, E., Li, X. M., Bardina, L., Bannon, G. A., Burks, A. W., Sampson, H. A. (2001). Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(6), 1077-1081.
- Bignardi, C., Mattarozzi, M., Penna, A., Sidoli, S., Elviri, L., Careri, M., Mangia, A. (2013). A rapid size-exclusion solid-phase extraction step for enhanced sensitivity in multi-allergen determination in dark chocolate and biscuits by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food analytical methods*, 6(4), 1144-1152.
- Bock, S. A., Muñoz-Furlong, A., Sampson, H. A. (2007). Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(4), 1016.
- Bonku, R., Yu, J. (2019). Health Aspects of Peanuts as an Outcome of Its Chemical Composition. *Food Science and Human Wellness*.
- Breiteneder, H., Radauer, C. (2004). A classification of plant food allergens. *Journal of allergy and clinical immunology*, 113(5), 821-830.
- Careri, M., Costa, A., Elviri, L., Lagos, J. B., Mangia, A., Terenghi, M., Cereti, A., Garoffo, L. P. (2007). Use of specific peptide biomarkers for quantitative confirmation of hidden allergenic peanut proteins Ara h 2 and Ara h 3/4 for food control by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(6), 1901-1907.

- Chung, S. Y., Champagne, E. T. (2007). Effects of phytic acid on peanut allergens and allergenic properties of extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(22), 9054-9058.
- Chung, S. Y., Kato, Y., Champagne, E. T. (2005). Polyphenol oxidase/caffeic acid may reduce the allergenic properties of peanut allergens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(15), 2631-2637.
- Chung, S. Y., Maleki, S. J., Champagne, E. T. (2004). Allergenic properties of roasted peanut allergens may be reduced by peroxidase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(14), 4541-4545.
- Chung, S. Y., Mattison, C. P., Reed, S., Wasserman, R. L., Desormeaux, W. A. (2015). Treatment with oleic acid reduces IgE binding to peanut and cashew allergens. *Food chemistry*, 180, 295-300.
- Chung, S. Y., Reed, S. (2012). Removing peanut allergens by tannic acid. *Food chemistry*, 134(3), 1468-1473.
- Chung, S. Y., Yang, W., Krishnamurthy, K. (2008). Effects of pulsed UV-light on peanut allergens in extracts and liquid peanut butter. *Journal of Food Science*, 73(5), C400-C404.
- Chu, Y., Faustinelli, P., Ramos, M. L., Hajduch, M., Stevenson, S., Thelen, J. J., Maleki, S. J., Cheng, H., Ozias-Akins, P. (2008). Reduction of IgE binding and nonpromotion of *Aspergillus flavus* fungal growth by simultaneously silencing Ara h 2 and Ara h 6 in peanut. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(23), 11225-11233.
- Croote, D., Quake, S. R. (2016). Food allergen detection by mass spectrometry: the role of systems biology. *NPJ Systems Biology and Applications*, 2(1), 1-10.
- De Camargo, A. C., Vieira, T. M. F. D. S., Regitano-D'Arce, M. A. B., De Alencar, S. M., Calori-Domingues, M. A., Canniatti-Brazaca, S. G. (2012). Gamma radiation induced

oxidation and tocopherols decrease in in-shell, peeled and blanched peanuts. *International journal of molecular sciences*, 13(3), 2827-2845.

Dodo, H. W., Konan, K. N., Chen, F. C., Egnin, M., Viquez, O. M. (2008). Alleviating peanut allergy using genetic engineering: the silencing of the immunodominant allergen Ara h 2 leads to its significant reduction and a decrease in peanut allergenicity. *Plant biotechnology journal*, 6(2), 135-145.

Dodo, H., Konan, K., Viquez, O. (2005). A genetic engineering strategy to eliminate peanut allergy. *Current allergy and asthma reports*, 5(1), 67-73.

Domon, B., Aebersold, R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 312(5771), 212-217.

Dong, X., Wang, J., Raghavan, V. (2020). Critical reviews and recent advances of novel non-thermal processing techniques on the modification of food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-15.

Ekezie, F. G. C., Cheng, J. H., Sun, D. W. (2018). Effects of nonthermal food processing technologies on food allergens: A review of recent research advances. *Trends in Food Science & Technology*, 74, 12-25.

Gavage, M., Van Vlierberghe, K., Van Poucke, C., De Loose, M., Gevaert, K., Dieu, M., Renard, P., Arnould, T., Gillard, N. (2020). High-resolution mass spectrometry-based selection of peanut peptide biomarkers considering food processing and market type variation. *Food chemistry*, 304, 125428.

Geiselhart, S., Hoffmann-Sommergruber, K., Bublin, M., (2018). Tree nut allergens. *Molecular Immunology*, 100, 71-81.

Hird, H., Lloyd, J., Goodier, R., Brown, J., Reece, P. (2003). Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction. *European Food Research and Technology*, 217(3), 265-268.

- Huang, H. W., Yang, B. B., Wang, C. Y. (2014). Effects of high pressure processing on immunoreactivity and microbiological safety of crushed peanuts. *Food control*, 42, 290-295.
- Hurlburt, B. K., Offermann, L. R., McBride, J. K., Majorek, K. A., Maleki, S. J., Chruszcz, M. (2013). Structure and function of the peanut panallergen Ara h 8. *Journal of Biological Chemistry*, 288(52), 36890-36901.
- Jayasena, S., Smits, M., Fiechter, D., De Jong, A., Nordlee, J., Baumert, J., Taylor, S. L., Pieters, R. H., Koppelman, S. J. (2015). Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(6), 1849-1855.
- Johnson, P. E., Van der Plancken, I., Balasa, A., Husband, F. A., Grauwet, T., Hendrickx, M., Knorr, D., Mills, E. N. C., Mackie, A. R. (2010). High pressure, thermal and pulsed electric-field-induced structural changes in selected food allergens. *Molecular nutrition & food research*, 54(12), 1701-1710.
- Kleber-Janke, T., Cramer, R., Appenzeller, U., Schlaak, M., Becker, W. M. (1999). Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. *International archives of allergy and immunology*, 119(4), 265-274.
- Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in molecular medicine*, 8(6), 257-260.
- Kopper, R. A., Odum, N. J., Sen, M., Helm, R. M., Stanley, J. S., Burks, A. W. (2005). Peanut protein allergens: the effect of roasting on solubility and allergenicity. *International archives of allergy and immunology*, 136(1), 16-22.
- Li, H., Yu, J., Ahmedna, M., Goktepe, I. (2013). Reduction of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2, in roasted peanuts by ultrasound assisted enzymatic treatment. *Food chemistry*, 141(2), 762-768.

- Long, F., Yang, X., Sun, J., Zhong, Q., Wei, J., Qu, P., Yue, T. (2016). Effects of combined high pressure and thermal treatment on the allergenic potential of peanut in a mouse model of allergy. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 35, 133-138.
- Luo, C., Hu, C., Gao, J., Li, X., Wu, Z., Yang, A., Chen, H. (2013). A potential practical approach to reduce Ara h 6 allergenicity by gamma irradiation. *Food chemistry*, 136(3-4), 1141-1147.
- Maleki, S. J., Chung, S. Y., Champagne, E. T., Raufman, J. P. (2000). The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(4), 763-768.
- Maleki, S. J., Kopper, R. A., Shin, D. S., Park, C. W., Compadre, C. M., Sampson, H., Burks, A. W., Bannon, G. A. (2000). Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *The journal of Immunology*, 164(11), 5844-5849.
- Marzano, V., Tilocca, B., Fiocchi, A. G., Vernocchi, P., Mortera, S. L., Urbani, A., Roncada, P., Putignani, L. (2020). Perusal of food allergens analysis by mass spectrometry-based proteomics. *Journal of Proteomics*, 103636.
- Mastrorilli, C., Arasi, S., Barni, S., Caimmi, D., Comberiat, P., Diaferio, L., Pelosi, U., Paravati, F. (2017). Allergia alle arachidi: approccio diagnostico. *Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica*, 2, 19-22.
- Maurer, S., Waschatko, G., Schach, D., Zielbauer, B. I., Dahl, J., Weidner, T., Bonn, M., Vilgis, T. A. (2013). The role of intact oleosin for stabilization and function of oleosomes. *The journal of physical chemistry B*, 117(44), 13872-13883.

Meng, S., Tan, Y., Chang, S., Li, J., Maleki, S., Puppala, N. (2020). Peanut allergen reduction and functional property improvement by means of enzymatic hydrolysis and transglutaminase crosslinking. *Food chemistry*, 302, 125186.

Miyazaki, A., Watanabe, S., Ogata, K., Nagatomi, Y., Kokutani, R., Minegishi, Y., Tamehiro, N., Sakai, S., Adachi, R., Hirao, T. (2019). Real-time PCR Detection Methods for Food Allergens (Wheat, Buckwheat, and Peanuts) Using Reference Plasmids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(19), 5680-5686.

Obando, L., Booksh, K. (1999). Tuning Dynamic Range and Sensitivity of White-Light, Multimode, Fiber-Optic Surface Plasmon Resonance Sensors. *Analytical Chemistry*, 71(22), 5116-5122.

Ozias-Akins, P., Breiteneder, H. (2019). The functional biology of peanut allergens and possible links to their allergenicity. *Allergy*, 74(5), 888-898.

Palladino, C., Breiteneder, H. (2018). Peanut allergens. *Molecular Immunology*, 100, 58-70.

Pan, D., Tang, B., Liu, H., Li, Z., Ma, R., Peng, Y., Wu, X., Che, L., He, N., Ling, X., Wang, Y. (2020). Effect of High Hydrostatic Pressure (HHP) Processing on Immunoreactivity and Spatial Structure of Peanut Major Allergen Ara h 1. *Food and Bioprocess Technology*, 13(1), 132-144.

Pecoraro, S. (2019). Digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) - General Aspects and Applications. In: M. Burns, L. Foster & M. Walker, eds. *DNA Techniques to Verify Food Authenticity: Applications in Food Fraud*. s.l.:Royal Society of Chemistry, 63 - 69.

Petersen, A., Kull, S., Rennert, S., Becker, W. M., Krause, S., Ernst, M., Gutschmann, T., Bauer, J., Lindner, B., Jappe, U. (2015). Peanut defensins: Novel allergens isolated from lipophilic peanut extract. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(5), 1295-1301.

- Pierboni, E., Rondini, C., Torricelli, M., Ciccone, L., Tovo, G. R., Mercuri, M. L., Altissimi, S., Haouet, N. (2018). Digital PCR for analysis of peanut and soybean allergens in foods. *Food Control*, 92, 128-136.
- Pi, X., Wan, Y., Yang, Y., Li, R., Wu, X., Xie, M., Li, X., Fu, G. (2019). Research progress in peanut allergens and their allergenicity reduction. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 212-220.
- Planque, M., Arnould, T., Dieu, M., Delahaut, P., Renard, P., Gillard, N. (2017). Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for detecting ten allergens in complex and incurred foodstuffs. *Journal of Chromatography A*, 1530, 138-151.
- Pollet, J., Delport, F., Janssen, K. P. F., Tran, D. T., Wouters, J., Verbiest, T., Lammertyn, J. (2011). Fast and accurate peanut allergen detection with nanobead enhanced optical fiber SPR biosensor. *Talanta*, 83(5), 1436-1441.
- Pomés, A., Davies, J. M., Gadermaier, G., Hilger, C., Holzhauser, T., Lidholm, J., Lopata, A. L., Mueller, G. A., Nandy, A., Radauer, C., Chan, S. K., Jappe, U., Kleine-Tebbe, J., Thomas, W. R., Chapman, M. D., van Hage, M., van Ree, R., Vieths, S., Raulf, M., Goodman, R. E. (2018). WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language. *Molecular immunology*, 100, 3-13.
- Poms, R., Klein, C., Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants*, 21(1), 1-31.
- Pucci, N., Asero, R., Calvani, M., Indirli, G. C., La Grutta, S. (2011). La diagnosi di allergia alle profiline. *Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica*, 3, 15.
- Romano, A., Scala, E., Rumi, G., Gaeta, F., Caruso, C., Alonzi, C., Maggioletti, M., Ferrara, R., Palazzo, P., Palmieri, V., Zeppilli, P., Mari, A. (2012). Lipid transfer proteins: the most frequent sensitizer in Italian subjects with food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clinical & Experimental Allergy*, 42(11), 1643-1653.

Scaravelli, E., Brohée, M., Marchelli, R., van Hengel, A. J. (2008). Development of three real-time PCR assays to detect peanut allergen residue in processed food products. *European Food Research and Technology*, 227(3), 857-869.

Schubert-Ullrich, P., Rudolf, J., Ansari, P., Galler, B., Führer, M., Molinelli, A., Baumgartner, S. (2009). Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(1), 69-81.

Schwager, C., Kull, S., Behrends, J., Röckendorf, N., Schocker, F., Frey, A., Homann, A., Becker, W. M., Jappe, U. (2017). Peanut oleosins associated with severe peanut allergy—Importance of lipophilic allergens for comprehensive allergy diagnostics. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(5), 1331-1338.

Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M., Cammue, B. P., De Bolle, M. F. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(11), 941-950.

Settaluri, V., Kandala, C., Puppala, N., Sundaram, J. (2012). Peanuts and their nutritional aspects - a review. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 1644-1650.

Shah, F., Shi, A., Ashley, J., Kronfel, C., Wang, Q., Maleki, S. J., Adhikari, B., Zhang, J. (2019). Peanut Allergy: Characteristics and Approaches for Mitigation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1361-1387.

Shefcheck, K. J., Musser, S. M. (2004). Confirmation of the allergenic peanut protein, Ara h 1, in a model food matrix using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(10), 2785-2790.

Stephan, O., Vieths, S. (2004). Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3754-3760.

Thomma, B. P., Cammue, B. P., Thevissen, K. (2002). Plant defensins. *Planta*, 216(2), 193-202.

Toomer, O. T. (2020). A comprehensive review of the value-added uses of peanut (*Arachis hypogaea*) skins and by-products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(2), 341-350.

Vanga, S. K., Singh, A., Kalkan, F., Gariepy, Y., Orsat, V., Raghavan, V. (2016). Effect of thermal and high electric fields on secondary structure of peanut protein. *International Journal of Food Properties*, 19(6), 1259-1271.

Vissers, Y. M., Blanc, F., Skov, P. S., Johnson, P. E., Rigby, N. M., Przybylski-Nicaise, L., Bernard, H., Wal, J. M., Ballmer-Weber, B., Zuidmeer-Jongejan, L., Szepfalusi, Z., Ruinemans-Koerts, J., Jansen, A. P. H., Savelkoul, H. F. J., Wichers, H. J., Mackie, A. R., Mills, E. N. C., Adel-Patient, K. (2011). Effect of heating and glycation on the allergenicity of 2S albumins (Ara h 2/6) from peanut. *PLoS One*, 6(8).

Vissers, Y. M., Iwan, M., Adel-Patient, K., Stahl Skov, P., Rigby, N. M., Johnson, P. E., Müller, P. M., Przybylski-Nicaise, L., Schaap, M., Ruinemans-Koerts, J., Jansen, A. P., Mills, E. N. C., Savelkoul, H. F. J., Wichers, H. J. (2011). Effect of roasting on the allergenicity of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2/6: the necessity of degranulation assays. *Clinical & Experimental Allergy*, 41(11), 1631-1642.

Wang, Y., Fu, T. J., Howard, A., Kothary, M. H., McHugh, T. H., Zhang, Y. (2013). Crystal structure of peanut (*Arachis hypogaea*) allergen Ara h 5. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(7), 1573-1578.

Wen, H. W., Borejsza-Wysocki, W., DeCory, T. R., Durst, R. A. (2007). Peanut allergy, peanut allergens, and methods for the detection of peanut contamination in food products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 6(2), 47-58.

- Yang, W. W., Mwakatage, N. R., Goodrich-Schneider, R., Krishnamurthy, K., Rababah, T. M. (2012). Mitigation of major peanut allergens by pulsed ultraviolet light. *Food and Bioprocess Technology*, 5(7), 2728-2738.
- Yu, J., Ahmedna, M., Goktepe, I., Cheng, H., Maleki, S. (2011). Enzymatic treatment of peanut kernels to reduce allergen levels. *Food chemistry*, 127(3), 1014-1022.
- Yu, J., Hernandez, M., Li, H., Goktepe, I., Robinette, C., Auerbach, A., Peden, D., Ahmedna, M. (2015). Allergenicity of roasted peanuts treated with a non-human digestive protease. *Food Research International*, 69, 341-347.
- Yu, J., Mikiashvili, N. (2020). Effectiveness of different proteases in reducing allergen content and IgE-binding of raw peanuts. *Food chemistry*, 307, 125565.
- Zhang, T., Shi, Y., Zhao, Y., Wang, J., Wang, M., Niu, B., Chen, Q. (2019). Different thermal processing effects on peanut allergenicity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2321-2328.
- Zhou, J., Qi, Q., Wang, C., Qian, Y., Liu, G., Wang, Y., Fu, L. (2019). Surface plasmon resonance (SPR) biosensors for food allergen detection in food matrices. *Biosensors and Bioelectronics*, 111449.

SITOGRAFIA E REGOLAMENTI

Allergen Peptide Browser.

<https://www.allergenpeptidebrowser.org/>

Direzione generale dell'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione (2018). *OGM in generale*.

http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=1180&area=sicurezzaAlimentare&menu=ogm

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2014). *Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes*.

www.efsa.europa.eu/efsajournal

FAOSTAT (2018). *Data*.

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

Ministero della Salute (2018). *Allergie alimentari e sicurezza del consumatore*.

http://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_2_1.jsp?lingua=italiano&id=2788

WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. *Allergen nomenclature*.

<http://allergen.org/>

Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee on the Technical Basis for Legislation on Irradiated Food, World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations & International Atomic Energy Agency. (1981). *Wholesomeness of irradiated food: report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee (meeting held in Geneva from 27 October to 3 November 1980)*.

Direttiva 1999/2/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 febbraio 1999 relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti gli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti.

Direttiva 1999/3/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 febbraio 1999 che stabilisce un elenco comunitario di alimenti e loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti.

Regolamento (UE) n. 1169/2011 del Parlamento europeo e del Consiglio del 25 ottobre 2011 relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori.

Regolamento (CE) n. 1829/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati.

Regolamento (CE) n. 1830/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, concernente la tracciabilità e l'etichettatura di organismi geneticamente modificati e la tracciabilità di alimenti e mangimi ottenuti da organismi geneticamente modificati, nonché recante modifica della direttiva 2001/18/CE.