



Università degli Studi di Verona
Dipartimento di Biotecnologie

RELAZIONE SCIENTIFICA FINALE

Assegno di Ricerca (AdRI594/11)

<i>Nome e Cognome del Beneficiario</i>	Michela Segà
<i>Titolo del Programma di Ricerca</i>	Produzione di anticorpi monoclonali diretti contro proteine di interesse alimentare
<i>Settore Scientifico Disciplinare di riferimento</i>	MED/O4 PATOLOGIA GENERALE
<i>Nome e Cognome del Responsabile Scientifico</i>	Roberto Chignola
<i>Durata dell'Assegno di Ricerca (da...a...)</i>	1 Maggio 2011 - 30 Aprile 2012
<i>Periodo di riferimento della relazione (da...a...)</i>	1 Maggio 2011 - 30 Aprile 2012
<i>Note</i> (es.: eventuali periodi di sospensione dell'Assegno, etc.)	



Università degli Studi di Verona Dipartimento di Biotecnologie

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA (*presupposti/obiettivi, metodologie applicate, risultati intermedi e conclusivi, discussione*)

Introduzione

Gli enzimi microbici sono ampiamente utilizzati dall'industria alimentare in quanto in grado di influenzare profondamente numerose caratteristiche nutrizionali, tecnologiche e commerciali degli alimenti. Al fine di migliorare la qualità degli impasti e la conservabilità dei prodotti, l'industria dei prodotti da forno ha iniziato ad aggiungere enzimi esogeni agli impasti fin dagli anni Settanta e questa pratica ha continuato a diffondersi ed intensificarsi negli ultimi quarant'anni.

La maggior parte degli enzimi utilizzati proviene da batteri, lieviti e funghi. In particolare *Aspergillus* fornisce alcuni tra gli enzimi più impiegati, come α -amilasi, cellulasi ed emicellulasi (specialmente xilanasi). L' α -amilasi (1,4- α -D-glucano idrolasi) viene aggiunta alla farina di cereali in modo da compensare il basso contenuto naturale dell'enzima nei chicchi di grano o segale, soprattutto negli anni caratterizzati da un clima caldo e secco al momento della raccolta. Nei panifici la farina di grano viene arricchita con miglioratori contenenti α -amilasi, in modo da incrementare il volume e l'elasticità degli impasti. Recentemente è stato introdotto un altro enzima, la xilanasi (endo-1,4- β -xilanasi) in grado di aumentare la lavorabilità dell'impasto e di favorire la lievitazione ed il volume finale del pane. Questo enzima sembra inoltre capace di ritardare il raffermamento ed aumentare la *shelf life* del pane (Hilhorst et al., 1999). Come altre emicellulasi, la xilanasi è in grado di tagliare l'emicellulosa nella farina di grano, favorendo la redistribuzione dell'acqua e lasciando l'impasto più soffice e facile da lavorare (Polizeli et al., 2005).

Con sempre maggior frequenza sono descritti casi di sensibilizzazione verso enzimi nei lavoratori addetti al settore della panificazione. Tra questi infatti si ha il maggior numero di casi di allergie inalatorie (i.e. asma del panificatore) e da contatto (Baur et al., 1986; Quirce et al., 1992; Morren et al., 1993; Smith et al., 1997; Sander et al., 1998; Quirce et al., 2002; Spök, 2006). Mediante l'utilizzo di un saggio ELISA basato su anticorpi policlonali prodotti in coniglio, Houba et al. (1996, 1997) hanno dimostrato l'esistenza di una relazione dose-risposta tra l' α -amilasi fungina e i fenomeni di sensibilizzazione descritti. Altri studi hanno inoltre riportato un'associazione tra i sintomi allergici dei panificatori e la sensibilizzazione ad enzimi xilanolitici (Baur et al., 1998; Sander et al., 1998; Merget et al., 2001; Elms et al., 2003), indicando che questi enzimi costituiscono degli allergeni occupazionali.

Nonostante tali enzimi siano fortemente implicati nell'insorgenza di allergie respiratorie, molte preparazioni enzimatiche utilizzate sotto forma di polvere vengono aggiunte all'impasto senza particolari precauzioni (Baur et al., 1998). A tutto questo va aggiunto il fatto che spesso i produttori dei miglioratori tecnologici non specificano in etichetta né da quale specie derivi l'enzima, né la quantità dello stesso, e a volte non ne dichiarano nemmeno la presenza.

Il crescente utilizzo di enzimi nell'industria alimentare ha catturato negli ultimi anni l'attenzione dei legislatori nei paesi industrializzati. In mancanza di una specifica regolamentazione nell'uso degli stessi, il 16 Dicembre 2008 l'Unione Europea ha adottato il Regolamento (EC) No. 1331/2008, che stabilisce un procedimento di autorizzazione comune per l'impiego di additivi, enzimi ed aromi nell'industria alimentare. Prima di questa data in Europa quest'area era



Università degli Studi di Verona Dipartimento di Biotecnologie

disciplinata dalle leggi nazionali (ove esistenti). Il testo si propone di chiarire ed aggiornare la legislazione corrente e di creare una comune e semplificata procedura di approvazione basata sui pareri scientifici dell'EFSA (European Food Safety Authority). Il Parlamento Europeo nel Regolamento (EC) No. 1332/2008, dà una definizione di enzima alimentare e fornisce una lista di enzimi approvati per l'industria alimentare; indica inoltre l'etichettatura necessaria per gli enzimi e le preparazioni enzimatiche. Gli additivi alimentari possono essere autorizzati solo se dietro al loro utilizzo c'è un bisogno tecnologico, se non sono ingannevoli per il consumatore e se non rappresentano un rischio per la salute.

Il confronto dei dati epidemiologici provenienti da diversi paesi, così come la definizione di una soglia limite europea per il livello di esposizione all' α -amilasi fungina e agli altri enzimi impiegati nell'industria alimentare, dipende dalla reperibilità di metodi di valutazione riproducibili (Sander et al. 1997). Si rende quindi necessaria la messa a punto di saggi affidabili e standardizzati. Un saggio basato su anticorpi monoclonali può rappresentare una buona soluzione in questo senso in quanto sensibile e ad alta affinità per l'allergene.

Lo scopo di questo progetto è lo sviluppo di anticorpi monoclonali e la messa a punto di saggi enzimatici ELISA (Monoclonal antibodies-based enzyme-linked immunoassay) in grado di riconoscere selettivamente gli enzimi usati come additivi nella farina e nei prodotti da forno.

Risultati

E' noto che i frammenti di molecole anticorpali hanno una capacità di legame ridotta rispetto alle molecole integre. Al fine di sviluppare saggi quantitativi sensibili ed altamente specifici, sono necessarie molecole complete e le moderne procedure di produzione di anticorpi che coinvolgono la biologia molecolare non sono in grado di garantire questa caratteristica. Seguendo la procedura sperimentale di Köhler and Milstein (1975) ed apportandone alcune modifiche, all'interno di questo progetto di ricerca sono stati sviluppati anticorpi monoclonali contro l' α -amilasi da *Aspergillus oryzae* (Sigma) e contro la xilanasi da *Aspergillus niger* (Megazyme).

Utilizzando topi BALB/C (f) di due mesi, sono state eseguite 4 iniezioni successive (100 μ g di antigene unito all'adiuvante di Freund) intervallate tra loro di una settimana. Le prime tre iniezioni sono state effettuate sottocute mentre l'ultima intra-vena. In corso d'opera è stato prelevato il siero dei topi immunizzati e dei topi di controllo e sono stati effettuati dei saggi ELISA per verificare il titolo di anticorpo prodotto. A 3 giorni di distanza dall'ultima immunizzazione, gli animali sono stati sacrificati per dislocazione cervicale ed è stata loro prelevata la milza in ambiente sterile. Mediante trattamento con PEG a 37 °C, le cellule della milza sono state quindi fuse con cellule di mieloma di topo compatibile (Ag-8). Le fusioni così ottenute sono state seminate in piastre da 24 pozzetti utilizzando un mezzo di coltura selettivo (RPMI-HAT medium) e dopo circa due settimane i surnatanti sono stati raccolti e saggiati per la produzione di anticorpo mediante saggio ELISA. Gli ibridomi provenienti dai pozzetti positivi sono stati infine sottoposti a clonaggio e seminati in piastre da 96 pozzetti (0,3 cellule/pozzetto). Dopo 2-3 settimane, i cloni in grado di produrre anticorpi contro le proteine di interesse sono stati inseriti in mini-bioreattori per la produzione estensiva (Cell Line 350, Sartorius).

Una serie di problemi biologici e tecnici hanno ostacolato questa prima parte del lavoro.



Università degli Studi di Verona Dipartimento di Biotecnologie

Innanzitutto, l'efficienza di crescita degli ibridomi e di produzione di anticorpi si è dimostrata decisamente inferiore rispetto ai livelli attesi, soprattutto per quanto riguarda la xilanasi. Inoltre l' α -amilasi utilizzata per gli esperimenti ha mostrato problemi di stabilità che hanno reso i saggi ELISA e Western Blot non riproducibili, rallentando così il processo di caratterizzazione degli anticorpi. Nonostante sia stata adottata una procedura di iper-immunizzazione, infine, gli anticorpi monoclonali ottenuti sono risultati di classe M (μ/κ) ed hanno presentato bassa affinità per l'antigene.

I problemi sopra descritti sono stati almeno in parte risolti durante la seconda parte del lavoro. È stato effettuato un nuovo ciclo di immunizzazione, modificando il protocollo adottato in precedenza. Il numero di animali utilizzati è stato aumentato e, a parte la prima, le immunizzazioni sono state eseguite a livello intra-peritoneale invece che sottocute.

In questo modo, l'efficienza di crescita degli ibridomi, così come la produzione di anticorpi, si è rivelata decisamente superiore e sono stati ottenuti mAbs di classe IgG ad alta affinità, come atteso per una normale risposta immunologica secondaria. Nonostante questi primi risultati incoraggianti, i successivi esperimenti sono stati ostacolati da un'apparente perdita della capacità di produzione di anticorpi da parte degli ibridomi selezionati, in particolare per quanto riguarda le cellule che producevano anticorpi contro l' α -amilasi.

Ad oggi disponiamo di un clone in grado di produrre anticorpi monoclonali di classe IgG contro l' α -amilasi da *Aspergillus oryzae* e di 5 cloni che producono mAbs, sempre di classe IgG, contro la xilanasi da *Aspergillus niger* (ANX). Sono stati inoltre selezionati 26 cloni che producono mAbs contro la xilanasi, di classe IgM.

I 5 cloni che producono mAbs di classe IgG contro la xilanasi, denominati P5B8, P2C2, P5D5 e P1D2, sono stati stabilizzati e gli anticorpi secreti da tali cloni sono risultati di isotipo IgG_{1,k} (IsoStrip, Roche Applied Science). Per ogni clone è stata misurata la concentrazione di anticorpo secreto nel mezzo di coltura ed è stato messo a punto un metodo che ha permesso di stimare l'affinità di legame con l'antigene (K_d).

Con lo scopo di caratterizzare la regione dell'antigene riconosciuta da tali anticorpi, ANX è stata sottoposta a digestione enzimatica da parte di vari enzimi proteolitici quali pepsina, papaina, tripsina e chimotripsina. Tuttavia, anche a rapporti proteasi:xilanasi molto alti (oltre 300:1 molare), l'enzima ha mostrato una forte resistenza all'attacco proteolitico. La digestione completa è avvenuta solamente dopo denaturazione e riduzione, seguiti da alchilazione con IAA per impedire la riformazione spontanea del ponte disolfuro della proteina da parte dei residui di Cisteina liberi. I saggi Western Blot realizzati sul prodotto digerito hanno mostrato che nessuno dei 5 mAbs è in grado di legarsi ai prodotti di digestione così ottenuti.

Abbiamo quindi condotto una serie di esperimenti per capire come il processo di riduzione-alchilazione dell'antigene potesse influire sul riconoscimento anticorpale. Dalle analisi Western blot, gli anticorpi sono risultati in grado di legarsi alla xilanasi in tutti i casi analizzati (xilanasi denaturata; denaturata e ridotta; denaturata e alchilata) tranne nel caso in cui l'enzima, dopo denaturazione, sia stato ridotto e poi alchilato. Nell'insieme questi risultati suggeriscono che l'epitopo riconosciuto sia lineare e coinvolga la sequenza amminoacidica che comprende una delle due Cisteine impegnate nella formazione del ponte disolfuro.

Dal momento che tutti gli anticorpi hanno mostrato lo stesso pattern di legame, è stato allestito un saggio ELISA a competizione per capire se gli epitopi riconosciuti dagli mAbs fossero



Università degli Studi di Verona Dipartimento di Biotecnologie

sovrapponibili (i.e. lo stesso epitopo o epitopi parzialmente sovrapposti). A questo scopo uno degli anticorpi (P5B8) è stato marcato con biotina e fatto reagire a concentrazione fissa con la xilanasi, in presenza degli altri mAbs non marcati e diluiti in modo seriale. I risultati hanno mostrato che tutti gli mAbs sono in grado di inibire il legame di P5B8 biotinilato alla xilanasi, indicando che gli epitopi riconosciuti dagli mAbs comprendono sequenze amminoacidiche sovrapponibili.

L'idea iniziale era quella di mettere a punto un saggio ELISA sandwich che permettesse di riconoscere la xilanasi presente anche a basse concentrazioni in matrici complesse, ma per fare questo servivano due anticorpi in grado di riconoscere epitopi diversi. I risultati ottenuti ci hanno quindi spinto a cercare soluzioni alternative ed i nostri studi si sono focalizzati su uno degli mAbs, ovvero P3F10, scelto per la sua alta resa in termini di anticorpo per ml di terreno di coltura e affinità di legame. Prima di tutto è stata studiata la specificità di P3F10 verso ANX, impiegando altri enzimi e preparati enzimatici ampiamente utilizzati da parte dell'industria dei prodotti da forno e xilanasi provenienti da altre specie. Dalle analisi Western blot si è visto che P3F10 riconosce solamente la xilanasi di *A. niger*. Alcuni tra i campioni analizzati hanno mostrato bande con attività xilanolitica caratterizzate da diversa mobilità rispetto ad ANX e che non vengono riconosciute da P3F10, indicando una possibile contaminazione da parte di xilanasi di diversa origine o la presenza di altri enzimi ad attività xilanolitica.

Al fine di riconoscere ANX in matrici complesse, abbiamo messo a punto un saggio ELISA ad inibizione. Questa tecnica è di particolare utilità quando si dispone di un unico anticorpo specifico per l'antigene e/o quando quest'ultimo è presente in matrici complesse o modificate, che competono per il *coating* diretto dell'antigene alla piastra. Brevemente, il saggio prevede l'adsorbimento dell'antigene su supporto solido e successivamente l'incubazione dell'anticorpo con estratti contenenti l'antigene di interesse (inibitore). In questo modo gli anticorpi che si legano all'antigene in soluzione non si legheranno a quello adsorbito alla piastra, provocando quindi un abbassamento del segnale (inibizione). Una volta identificato un preciso intervallo di linearità del saggio (curva di inibizione) sarà quindi possibile andare a quantificare ANX in campioni incogniti. Per costruire la curva P3F10 è stato pre-incubato con quantità note di ANX, diluite in estratto (in PBS) di farina di frumento. Il limite di rilevabilità del metodo è risultato circa 1 ng ml^{-1} . Dal momento che il protocollo di estrazione prevede il rapporto 1:10 w/v (farina/PBS), il limite di rilevabilità del saggio corrisponde a circa $10 \text{ } \mu\text{g}$ di xilanasi per Kg di farina.

Tramite ELISA ad inibizione, è stata quindi realizzata la quantificazione della xilanasi da *Aspergillus niger* in estratti in PBS di farine, miglioratori e di due prodotti cotti prelevati da diversi panifici veronesi. Tutti i 5 miglioratori analizzati hanno portato ad un'inibizione del segnale sopra l'80%. La xilanasi risulta presente nel 50% degli estratti di farina analizzati, in maniera molto variabile (dall'8 al 63% di inibizione). Le analisi hanno inoltre permesso di rilevare la presenza di xilanasi anche in un prodotto cotto. Utilizzando le assorbanze ottenute nel saggio ad inibizione, le quantità di xilanasi presenti nei vari campioni sono state quindi estrapolate dalla curva di inibizione.

Discussione

E' ormai noto che l'esposizione alle polveri ambientali da farina può portare all'insorgenza di allergie tra i lavoratori dei panifici, in particolare asma (detta appunto asma del panificatore)



Università degli Studi di Verona Dipartimento di Biotecnologie

(Walsh et al. 1985; Baur et al. 1988; Gomez et al. 1990; Baur and Posch 1998). Dati presenti in letteratura indicano che i soggetti affetti da questa patologia sono sensibilizzati verso enzimi microbici presenti nei miglioratori tecnologici usati per arricchire le farine, tra cui preparazioni a base di α -amilasi e xilanasi (Baur et al., 1986 e 1998; Houba et al., 1996; Quirce et al., 1992; Morren et al., 1993; Sander et al., 1998; Merget et al., 2001; Elms et al., 2003). Un altro problema è l'etichettatura poco chiara dei miglioratori: i produttori infatti spesso non forniscono informazioni attendibili sul contenuto enzimatico delle preparazioni o addirittura non ne forniscono nessuna, e questo nonostante la Commissione Europea abbia recentemente adottato un regolamento che introduce leggi armonizzate sull'utilizzo degli enzimi nell'industria alimentare (Regolamento N. 1332/2008). Ciò significa che attualmente gli enzimi esogeni rappresentano potenziali allergeni nascosti per i lavoratori di questo settore. Conoscere la reale concentrazione di tali allergeni negli ambienti di lavoro è essenziale per determinare il rischio occupazionale per i lavoratori, specialmente quando gli enzimi non vengono indicati in etichetta. Metodi di rilevamento e quantificazione basati su mAbs sono quindi utili per stabilire limiti espositivi per i lavoratori.

Gli insuccessi ottenuti ci hanno spinto a desistere per il momento nel tentativo di produrre anticorpi monoclonali specifici per l' α -amilasi da *Aspergillus oryzae*. Ci risulta oscuro, al momento, come mai le cellule selezionate smettano di produrre o non crescano affatto durante la successiva fase di espansione proliferativa. Ad oggi disponiamo di un solo clone in grado di produrre anticorpi monoclonali di classe IgG contro l' α -amilasi da *A. oryzae*. In futuro, tuttavia, proveremo nuovamente ad ottenere anticorpi monoclonali ottimizzando le tecniche di fusione e di coltura cellulare.

Anche l'enzima xilanasi da *Aspergillus niger* è risultato un antigene difficile: la proteina è molto resistente all'attacco proteolitico - cosa che ne fa un ottimo allergene alimentare - e gli anticorpi ottenuti sono diretti contro epitopi sovrapponibili che comprendono l'unico ponte disolfuro della proteina. I dati presenti nelle banche dati proteiche possono aiutarci a comprendere per quali ragioni la xilanasi abbia queste caratteristiche. La proteina infatti ha una struttura molto compatta e quasi sferica, e pertanto non offre molti siti di taglio agli enzimi proteolitici. Il ponte disolfuro collega un *beta-sheet* ad una sequenza *random-coil* che forma un piccolo *loop*. Probabilmente, in maniera analoga a quanto avviene per altri antigeni, gli anticorpi sono diretti principalmente contro questo *loop*, che pertanto rappresenta un epitopo dominante della proteina.

Nel corso degli esperimenti sono stati isolati 26 cloni che producono mAbs di classe IgM (μ/κ) e 5 cloni che producono mAbs di classe IgG1, κ ad alta affinità contro ANX. Tra questi è stato selezionato P3F10 per la realizzazione di un saggio ELISA ad inibizione che permette di raggiungere un limite di rilevabilità di 10 μ g di xilanasi per Kg di farina. Secondo dati riportati in letteratura, nei panifici la quantità di adiuvante tecnologico impiegata è circa l'1-5% del prodotto finale (Merget et al., 2001). Tuttavia le case produttrici dei miglioratori spesso suggeriscono dosaggi inferiori (circa 1-10 g per 100 Kg di farina). Ad esempio, una ditta di Ravenna consiglia per il suo prodotto 'XA', l'utilizzo di 3-5 g per 100 Kg di farina. Questo miglioratore, come normalmente accade, non contiene solo l'enzima di interesse (in questo caso ANX), ma è una miscela complessa. Tramite il saggio ELISA ad inibizione sviluppato in questo lavoro, è stato stimato il contenuto di ANX all'interno del prodotto 'XA', che è risultato essere pari a circa lo 0,9%. In accordo con le dosi di impiego suggerite dal produttore, in base a questa stima il



Università degli Studi di Verona Dipartimento di Biotecnologie

contenuto finale di ANX in farina risulterebbe quindi essere circa $270-450 \mu\text{g Kg}^{-1}$, quindi almeno 27 volte sopra il limite di rilevabilità del saggio.

La xilanasi è presente in tutti e 5 i miglioratori fin'ora analizzati e in un numero significativo di farine usate per la panificazione. I nostri esperimenti hanno inoltre permesso di rilevare la presenza di xilanasi anche nel prodotto cotto, indicando che l'enzima arriva in forma immunologicamente attiva nei prodotti finiti. Sono tutt'ora in corso esperimenti su altre farine e miglioratori diffusamente usati nei panifici. In collaborazione con i clinici sono inoltre in fase di realizzazione esperimenti di screening tra i lavoratori del settore volti alla individuazione di soggetti sensibilizzati agli enzimi descritti. Confidiamo di poter allestire in futuro saggi sufficientemente sensibili per la determinazione di questo allergene anche negli ambienti di lavoro. L'applicazione, inoltre, potrebbe poi essere estesa anche ad altri settori in cui l'enzima è largamente usato, quali l'industria tessile, dei mangimi per animali e alimentare (succhi di frutta, vino).

Referenze

- Baur X, Fruhmann G, Haug B, et al. Role of *Aspergillus* amylase in baker's asthma. *Lancet* 1986;1:43.
- Baur X, Sauer W, Weiss W. (1988). Baking additives as new allergens in baker's asthma. *Respiration*. 54(1): 70-72.
- Baur X, Posch A. (1998). Characterized allergens causing bakers' asthma. *Allergy*. 53(6): 562-566.
- Baur X, Sander I, Posch A, Raulf-Heimsoth M. Baker's asthma due to the enzyme xylanase – a new occupational allergen. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:1591–1593.
- Elms J, Fishwick D, Walker J, Rawbone R, Jeffrey P, Griffin P, Gibson M, Curran AD. (2003). Prevalence of sensitisation to cellulase and xylanase in bakery workers. *Occup Environ Med*. 60(10): 802-804.
- Gomez L, Martin E, Hernandez D, Sanchez-Monge R, Barber D, del P, V, de AB, Armentia A, Lahoz C, Salcedo G. (1990). Members of the alpha-amylase inhibitors family from wheat endosperm are major allergens associated with baker's asthma. *FEBS Lett*. 261(1): 85-88.
- Hilhorst R., Dunnewind B., Orsel R., Stegeman P., Vliet T., Gruppen H and Schols H.A. (1999). Baking Performance, Rheology, and Chemical Composition of Wheat Dough and Gluten Affected by Xylanase and Oxidative Enzymes. *Journal of Food Science* 64, 808-813.
- Houba R., Heederik D.J., Doekes G. and Van Run P. E. (1996). Exposure-sensitization relationship for alpha-amylase allergens in baking industry. *American Journal of Respiratory Critical Care Medical* 154 (1), 130-136.
- Houba R., Van Run P.E., Doekes G., Heederik D.J. and Spithoven J. (1997). Airborne levels of alpha-amylase allergens in bakeries. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99 (3), 286-292.
- Köhler G. and Milstein C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Merget R, Sander I, Raulf-Heimsoth M, Baur X. (2001). Baker's asthma due to xylanase and cellulase without sensitization to alpha-amylase and only weak sensitization to flour. *Int Arch Allergy Immunol*. 124(4): 502-505.
- Morren MA, Janssens V, Doooms-Gossens A, Van Hoeyveld E, Cornelis A, De Wolf-Peeters C, Heremans A. alpha-Amylase, a flour additive: an important cause of protein contact dermatitis in bakers. *J Am Acad Dermatol*. 1993; 29(5)



Università degli Studi di Verona Dipartimento di Biotecnologie

Pt 1):723-8.

Polizeli M. L. T. M., Rizzatti A. C. S., Monti R., Terenzi H. F., Jorge J. A. and Amorim D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 577-591.

Quirce S, Cuevas M, Díez-Goómez ML, et al. Respiratory allergy to *Aspergillus*-derived enzymes in baker's asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90:970-978.

Quirce S, Fernandez-Nieto M, Bartolome B, Bombin C, Cuevas M, Sastre J. Glucoamylase: another fungal enzyme associated with baker's asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2002; 89(2):197-202.

Sander I., Neuhaus-Schröder C., Borowitzki G., Bauer X. and Raulf-Heimsoth M. (1997). Development of a two-site enzyme-linked immunosorbent assay for α -amylase from *Aspergillus oryzae* based on monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods* 210, 93-101.

Sander I, Raulf-Heimsoth M, Siethoff C, et al. Allergy to *Aspergillus*-derived enzymes in the baking industry: identification of beta-xylosidase from *Aspergillus niger* as a new allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:256-264.

Smith TA, Lumley KP, Hui EH. Allergy to flour and fungal amylase in bakery workers. *Occup Med (Lond).* 1997; 47(1):21-4.

Spök A. (2006). Safety Regulations of Food Enzymes. *Food Technology and Biotechnology* 44 (2), 197-209.

Walsh BJ, Wrigley CW, Musk AW, Baldo BA. (1985). A comparison of the binding of IgE in the sera of patients with bakers' asthma to soluble and insoluble wheat-grain proteins. *J Allergy Clin Immunol.* 76(1): 23-28.



Università degli Studi di Verona
Dipartimento di Biotecnologie

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTA ALL'ESTERO *(eventuale)*

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NELL'AMBITO DEL DOTTORATO DI RICERCA *(eventuale)*

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DIDATTICA COLLEGATA *(eventuale)*



Università degli Studi di Verona
Dipartimento di Biotecnologie

SEMINARI/CONFERENZE TENUTI

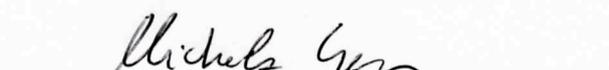
RISULTATI DELLA RICERCA (*pubblicazioni, rapporti, brevetti, etc.*)

- M. Sega, C. Zanetti, C. Rizzi, M. Olivieri, R. Chignola, G. Zoccatelli. (in press). Production and characterization of monoclonal antibodies for the quantification of potentially allergenic xylanase from *Aspergillus niger*. *Food Additives & Contaminants, Part A*.
- M. Consolini, M. Sega, C. Zanetti, M. Fusi, R. Chignola, M. De Carli, C. Rizzi, G. Zoccatelli (2012). Emulsification of simulated gastric fluids protects wheat α -amylase inhibitor 0.19 epitopes from digestion. *Food Analytical Methods*, 5 (2), 234-243.

Il Responsabile Scientifico


(Firma)

L'Assegnista di Ricerca


(Firma)