

BARTOSZ BRZOZOWSKI, WŁODZIMIERZ BEDNARSKI,
MAREK ADAMCZAK

BIOTECHNOLOGICZNA MODYFIKACJA BIOLOGICZNYCH WŁAŚCIWOŚCI BIAŁEK ZBÓŻ

Streszczenie

Przedstawiono właściwości biologiczne peptydów otrzymywanych z białek zapasowych ziarniaków zbóż. Wskazano na sekwencje aminokwasów w peptydach uwalnianych z białek m.in. zbóż wykazujących aktywność biologiczną. Przedstawiono udział peptydów w reakcjach alergicznych prowadzących do takich chorób, jak celiakia czy astma. Scharakteryzowano funkcje epitopów peptydów izolowanych z białek zbóż odpowiedzialnych za reakcje alergiczne. Omówiono funkcje transglutaminazy w przemianach białek w blaszkach właściwych jelita. Wskazano na potencjalne zastosowanie enzymów (transglutaminazy, peptydaz prolinowych) i mikroorganizmów (bakterii fermentacji mlekowej zakwasu chlebowego) w redukcji alergenicności peptydów pochodzenia roślinnego. Scharakteryzowano biotechnologiczne metody zmniejszania alergenicności białek ziarniaków zbóż.

Słowa kluczowe: białka, zboża, alergeny, transglutaminaza, peptydazy prolinowe

Wprowadzenie

W analizie przyczyn alergenicności niektórych białek zbóż zwraca się m.in. uwagę na produkty ich hydrolizy w surowcach oraz technologii ich przetwarzania. Niezbędna jest wiedza o aktywności proteaz na każdym z wymienionych etapów oraz o właściwościach biologicznych produktów enzymatycznej degradacji białek. W opracowaniu przedstawiono obecny stan wiedzy o biologicznie aktywnych peptydach pochodzenia roślinnego oraz sposobach ich enzymatycznej modyfikacji w celu eliminacji cech niepożądanych, w tym także immunoreaktywności.

Białka są podstawową i integralną częścią żywności. Są źródłem energii i aminokwasów niezbędnych do wzrostu żywego organizmu. Ponadto dzięki swoim właściwościom fizykochemicznym mogą pełnić różne funkcje w żywności.

*Dr inż. B. Brzozowski, prof. dr hab. W. Bednarski, dr inż. M. Adamczak, Katedra Biotechnologii Żywności, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. J. Heweliusza 1, 10-719, Olsztyn,
e-mail: Bartosz.Brzozowski@uwm.edu.pl*

Dodatkowo wiele białek ma specyficzne właściwości biologiczne. Właściwości te nieobecne w spożywanej żywności mogą się uaktywniać w czasie procesów trawiennych zachodzących w przewodzie pokarmowym. Peptydy uwalniane z białek przez enzymy proteolityczne mogą wykazywać właściwości regulatorowe podobne do tych, jakie wykazują hormony [20] lub właściwości alergizujące [34].

Z charakterystyki enzymów proteolitycznych zbóż wynika, że proteazy są obecne w ziarnach w stanie spoczynku, uaktywniając się podczas kiełkowania. Ponadto, część enzymów jest syntetyzowana w czasie kiełkowania [26]. Proteazy hydrolizują białka zapasowe uwalniając peptydy i aminokwasy wykorzystywane przez zarodek do wzrostu. Modyfikują one skład i właściwości uwalnianych peptydów mogących stać się potencjalnym źródłem bioaktywnych związków regulatorowych. Ponadto udowodniono, że białka zbóż obecne w żywności i trawione w przewodzie pokarmowym mogą być źródłem alergicznych peptydów [24].

Bioaktywne peptydy

Najpowszechniejszym źródłem bioaktywnych peptydów są białka mleka [20], ale występują one także w białkach jaj, ryb czy białkach ziaren takich roślin, jak: soja, kukurydza, ryż, pszenica [3]. Poznano fizjologiczną aktywność peptydów otrzymywanych podczas hydrolizy *in vivo* i *in vitro* białek zapasowych zbóż [13].

W sekwencjach białek mogą występować fragmenty o aktywności przeciwnadciśnieniowej, opioidowej, antagonistycznej w stosunku do opioidowej, immunomodulacyjnej, antybakteryjnej i antywirusowej, przeciwtleniającej, wiążącej i transportującej metale, antyamnezycznej, powodującej skurcze mięśni gładkich i przeciwwkrzepliwej [20, 23]. Aktywność biologiczna uwalnianych peptydów wynika z ich specyficznej sekwencji aminokwasów.

Miyoshi i wsp. [25] wyizolowali z kukurydzy poddanej działaniu termolizyny inhibitor enzymu konwertującego angiotensynę (inhibitor ACE), wpływający na regulację ciśnienia krwi w organizmach ludzi. Inhibitor ACE był izolowany także z białek zapasowych ryżu (glutenin i prolamin) i soi (11S glicynina, 7S konglycynina) [27]. Z białek ryżu, glutenin i prolamin, wyizolowano peptydy o działaniu przeciwnadciśnieniowym [20].

Źródłem bioaktywnych peptydów mogą też być białka pszenicy. Fukudome i wsp. [12] wyizolowali z białek glutenu, w wyniku trawienia enzymatycznego, peptydy o aktywności opioidowej zwane egzorfinami. Wśród tych peptydów egzorfina GE-B5, o sekwencji aminokwasowej YGGWL, wykazywała największą aktywność *in vitro* i antagonizm do μ i δ receptorów opioidowych. W porównaniu z L-enkefaliną o sekwencji YGGFL, różniącej się jedną resztą aminokwasową, egzorfina GE-B5 wykazywała aktywność opioidową niższą 1,2- i 4,2-krotnie w stosunku do receptorów μ i δ oraz niższe powinowactwo odpowiednio 1,2- i 1,7-krotnie [12].

Peptydy o aktywności morfinowej uwalniane z glutenu przez hydrolizę *in vivo* przez żołądkową proteinazę i pepsynę wykazywały odporność na działanie trypsyny i chymotrypsyny [36]. Sugeruje się, że peptydy te nie są dalej trawione i w niezmienionej postaci przenikają barierę jelita. Niektóre peptydy mogą być absorbowane bez degradacji z przewodu pokarmowego do krwi. Zioudrou i wsp. [36] udowodnili, że peptydy te mają zdolność do przenikania bariery krew-mózg i łączenia się z receptorami opioidowymi w mózgu, jak i innych organach wewnętrznych.

Alergeny zbóż

Mills i wsp. [24] wskazują na następujące grupy roślinnych alergenów, które mogą uczulać poprzez układ pokarmowy: prolaminy, 2S albuminy, niespecyficzne białka enzymatyczne transferujące lipidy (nsLTP), kupiny, proteazy cysteinowe i serynowe oraz inhibitory α -amylazy i trypsyny.

Białka alergenne wykryto w pszenicy, jęczmieniu, życie, owsie, a także w kukurydzy, sorgo i gryce [24]. Jednym z najczęściej znanych objawów alergienności białek zbożowych jest zespół chorób określonych nazwą celiakii. Nietolerancja określonych frakcji białek zapasowych zbóż może prowadzić także do astmy, zmian dermatologicznych i wywołanego ćwiczeniami fizycznymi szoku anafilaktycznego [34].

Badania przyczyn celiakii wykazały, że jest ona wywoływana między innymi spożyciem produktów zawierających białka pszenicy, a przede wszystkim glutenu [28]. To jedna z najczęstszych i podstawowych chorób genetycznych. Jej dokładny mechanizm nie jest znany, jednak wiadomo, że to właśnie gluten inicjuje łańcuch nie w pełni poznanych reakcji, wywołując aktywację układu immunologicznego u predysponowanych genetycznie osób [14].

Gluten zawiera dwie grupy białek: monomerowe gliadyny i polimerowe gluteniny, ale tylko te pierwsze uważa się za odpowiedzialne za reakcje uczuleniowe [21]. Białka glutenu mają nietypowy skład chemiczny. Zawierają one duże ilości prolaminy (P) i glutaminy (Q), odpowiednio ok. 15 i 35% reszt aminokwasowych [7]. Budowa chemiczna proliny i glutaminy powoduje, że wiązania peptydowe utworzone przy udziale tych aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym są odporne na działania enzymów proteolitycznych przewodu pokarmowego człowieka.

Procesy trawienia białek glutenu uwalniają wiele peptydów i polipeptydów. Shan i wsp. [30] prowadzili enzymatyczną hydrolizę *in vitro* rekombinowanej α 2-gliadyny (będącej odpowiednikiem α -gliadyny) uzyskując m.in. 33-merowy peptyd bogaty w prolinę i glutaminę. Peptyd ten był odporny na działanie proteaz. Analiza sekwencji aminokwasów tego peptydu wykazała obecność epitopów: PFPQPQLPY, PQQPQLPYPQ, PYPQPQLPY oraz WQIPEQSR odpowiedzialnych za reakcje z

komórkami CD4⁺ T i białkami HLA-DQ2 lub HLA-DQ8, będącymi mediatorami w reakcjach immunologicznych u pacjentów chorych na celiakię. Wymienione epitopy w swej sekwencji zawierają co najmniej jedną resztę glutaminy, będącej substratem w reakcji z transglutaminazą. Proces deaminacji tych reszt jest istotny w stymulowaniu komórek T. Odłączenie grupy amonowej od glutaminy powoduje wytworzenie ujemnego ładunku odpowiedzialnego za łączenie się z białkami HLA-DQ2 [1]. Stąd sugestie, że trawienie enzymatyczne białek glutenu w przewodzie pokarmowym, a następnie modyfikacja uwolnionych peptydów przez transglutaminazę odgrywa krytyczną rolę w patogenezie celiakii [22].

Mcl Mowat [22] zaproponował hipotetyczny schemat interakcji między glutenem a systemem immunologicznym u chorych na celiakię. Z glutenu poddanego trawieniu enzymami proteolitycznymi uwalniane są peptydy o określonej sekwencji, bogate w prolinę i glutaminę. Peptydy te przenikają barierę jelita i są poddane działaniu transglutaminazy w blaszkach właściwych, w wyniku czego od reszt glutaminy po deaminacji zostają odłączone grupy amonowe. Tak zmodyfikowany peptyd rozpoznawany jest przez komórki T i białka HLA-DQ2 lub HLA-DQ8, wywołując reakcje immunologiczne, powodujące aktywację γ -interferonu i mechanizmów odpowiedzialnych za zanik kosmków jelitowych i hyperplazję uchyłków jelita.

U osób chorych na celiakię obecność frakcji gliadynowych w organizmie wywołuje reakcje immunologiczne objawiające się m.in. wysokim poziomem przeciwciał IgA i IgG w surowicy krwi [28]. Alergenność prolamin zbóż zależy od zawartości i sekwencji aminokwasów. Tanabe i wsp. [32] badali właściwości struktury pierwszorzędowej glutenu i wykazali, że najkrótszym peptydem zdolnym do reakcji z przeciwciałami IgE jest peptyd o sekwencji QQQPP. Ensari i wsp. [10] podają, że tetrapeptydy o sekwencji PSQQ, PQQP lub QQQP są charakterystyczne dla peptydów alergicznych w celiakii. Badania *in vivo* 12 i 13-merowych oligopeptydów uzyskanych z N-końca łańcucha α -gliadyny (reszty aminokwasowe 3-96) wykazały aktywność oligopeptydów tylko w przypadku wystąpienia sekwencji PQQP.

Badania proteomiczne białek zbóż wykazały obecność w ω -gliadynie pszenicy, ω -sekalinie żyta i C hordeinie jęczmienia oktapeptydu PQQPFPQQ odpowiedzialnego za reakcje alergiczne [10]. Wyznaczona sekwencja aminokwasów zawiera motyw PQQP charakterystyczny dla α -gliadyny. Ponadto Cornel i Mothes [5] sugerują, że obecny we frakcjach ω motyw QQPY wywołuje celiakię. Arentz-Hansen i wsp. [1] wykazali immunoreaktywność epitopu peptydów w 57-75 regionie α -gliadyny. Kolejne badania tych autorów [2] dowiodły, że T-komórki CD4⁺ rozpoznają trzy peptydy bogate w prolinę i glutaminę o sekwencjach: PFPQPQLPY, PQPQLPYPQ i PYPQPQLPY otrzymane z regionu α -gliadyny. Region ten reaguje z przeciwciałami u pacjentów chorych na celiakię.

Inną postacią alergii wywołanej kontaktem z białkami zbóż jest astma. Gomez i wsp. [16] wyizolowali i oczyścili różne antygeny związane z uczuleniami na mąkę pszenną i jęczmienną, reagujące z przeciwciałami IgE. Alergeny o masach cząsteczkowych od $12 \cdot 10^3$ do $15 \cdot 10^3$ Da należały do grupy inhibitorów α -amylazy i trypsyny. Z kolei Armentia i wsp. [4] scharakteryzowali dwa dominujące alergeny w jęczmieniu i pszenicy. Były to glikozydowe pochodne tetramerowych inhibitorów α -amylazy: CM16 z pszenicy i CMb z jęczmienia oraz monomerowy inhibitor BMAI-1 z jęczmienia. Inhibitory α -amylazy uwalniane podczas procesów trawienia w przewodzie pokarmowym także wykazują działanie alergizujące. James i wsp. [17] wydzielili z ziaren pszenicy frakcję białkową o masie cząsteczkowej $15 \cdot 10^3$ Da wywołującą reakcje uczuleniowe. Tsuji i wsp. [34] także wyizolowali z białek pszenicy inhibitory α -amylazy CM16 i CM17 o masach cząsteczkowych $17 \cdot 10^3$ Da będące glikoproteinami. Sugerują oni, że kluczową rolę w reakcjach alergicznych może odgrywać reszta glikozydowa. Kimoto i wsp. [19] badali serum 65 pacjentów wrażliwych na białka mąki pszennej i wykryli 15 antygenów rozpoznawanych przez przeciwciała IgE. Alergeny o masach cząsteczkowych $(27, 31 \text{ i } 47) \cdot 10^3$ Da były głównymi alergenami w pszenicy.

Źródłem alergenów mogą być także inhibitory α -amylazy i trypsyny oraz białka jęczmienia. Alergeny zawarte w jęczmieniu mogą przechodzić do produktów wytworzonych przy jego udziale, np. do piwa. Figueredo i wsp. [11] wyizolowali z piwa polipeptyd o masie cząsteczkowej $38 \cdot 10^3$ Da rozpoznawany przez przeciwciała IgE. Podobnie Curioni i wsp. [6] wyizolowali polipeptyd o masie cząsteczkowej $16 \cdot 10^3$ Da będący alergenem w jęczmieniu i obecny w piwie.

Możliwości redukcji alergenicności białek zbóż

Zmniejszeniu immunoreaktywności białek zbóż sprzyja stosowanie enzymów lub mikroorganizmów zdolnych do degradacji alergennych peptydów. Wiadomo, że za alergenicność białek zbóż odpowiadają uwalniane z nich peptydy przeważnie bogate w prolinę i glutaminę. Ich eliminacja powinna polegać na dalszej degradacji lub wytworzeniu dodatkowych izo-wiązań poprzez łączenie reszt aminokwasowych blokujących glutaminę. W rozwiązaniu tego problemu pomocne są dwie grupy enzymów: transglutaminazy oraz peptydazy prolinowe.

Transglutaminaza (EC.2.3.2.13) to ogólna nazwa enzymu R-glutaminy-peptyd- γ -glutamyltransferazy. Enzym ten bierze udział w reakcjach katalitycznych m.in. przenosi reszty aminokwasowe (ϵ -aminoacylowe) w specyficzne miejsce γ -amidowe, tworząc wiązanie peptydowe z glutaminą, katalizuje reakcje: deaminacji w miejscu γ -amidowym, nitrozylację i denitrozylację grup $-SH$ cysteiny, przyłączania aminy lub

aminokwasu do łańcucha peptydowego i tworzenia lub hydrolizy wiązania izopeptydowego [18].

Transglutaminaza występuje w tkankach ssaków, jak również w komórkach mikroorganizmów. Była ona izolowana z komórek *Streptovercillium* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* czy *Physarum polycephalum* [31]. Enzym ten występuje także w tkankach takich roślin, jak: soja, topinambur, burak pastewny, jabłoń domowa [29, 31].

Transglutaminazy są obecnie stosowane w technologii piekarnictwa w celu wytworzenia połączeń między łańcuchami polipeptydowymi prolamin, a przez to polepszają właściwości reologiczne ciasta, zapewniają odpowiednie pory i elastyczność chleba po wypieku [33]. Transglutaminazy wykorzystywane są także we wzbogacaniu prolamin w lizynę lub inne aminokwasy egzogenne, czy fruktooligosacharydy [18].

Perspektywiczne wydaje się zastosowanie transglutaminaz do odtwarzania wiązań między łańcuchami polipeptydowymi prolamin. Wytworzenie izo-wiązań przy udziale glutaminy prawdopodobnie blokuje możliwość rozpoznawania takiego fragmentu peptydu przez T-komórki, a tym samym zostaje zahamowany mechanizm prowadzący do celiakii. Miejsce powstawania peptydów o sekwencjach rozpoznawanych, jako alergenów w wyniku działania transglutaminazy nie jest do końca wyjaśnione. Skovbjerg i wsp. [31] sugerują, że przyczyną alergenicności peptydów mogą być transglutaminazy syntetyzowane przez mikroorganizmy bytujące stale lub okresowo w przewodzie pokarmowym człowieka. Ponadto źródłem transglutaminaz mogą być mikroorganizmy i pokarm roślinny spożywany przez człowieka.

Drugą grupą enzymów mających znaczenie w eliminacji czy obniżaniu alergenicności białek zbóż są peptydazy prolinowe. Prowadzą one hydrolizę wiązań peptydowych utworzonych przy udziale proliny. Są produkowane przez niektóre szczepy bakterii fermentacji mlekowej zakwasu chlebowego: *Lactobacillus brevis*, *Lb. brevis* ssp. *linderi*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbruecki* ssp. *delbruecki*, *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. alimentarius*, czy *Lb. hilgardii* [8, 9, 15], a także przez *Flavobacterium meningosepticum* [30]. Hydroliza białek glutenowych, bogatych w prolinę, w czasie fermentacji zakwasu piekarniczego zależy od aparatu enzymatycznego mikroorganizmów. Degradacja wiązań peptydowych utworzonych przez prolinę pozytywnie wpływa na tolerancję glutenu przez organizm człowieka [8, 9]. Di Cagno i wsp. [9] zastosowali bakterie fermentacji mlekowej do hydrolizy alergennych peptydów wywołujących celiakię. Badania fragmentów syntetyzowanej chemicznie A-gliadyny wykazały, że krótkie sekwencje aminokwasów (PSQQ i QQQP) są alergenowe dla pacjentów chorych na celiakię. Fragmenty 31-43 A-gliadyny poddano 4-godzinnej hydrolizie przy zastosowaniu preparatów enzymatycznych uzyskanych z pałeczek mlekowych. W doświadczeniu wykorzystano dwie frakcje: enzymy związane ze ścianą

komórkową i z cytoplazmą. Wszystkie frakcje enzymów uzyskanych z następujących szczepów bakterii fermentacji mlekowej: *Lb. alimentarius* 15M, *Lb. brevis* 14G, *Lb. sanfranciscensis* 7A i *Lb. hilgardii* 51B hydrolizowały badany peptyd [9]. Wyższą aktywnością charakteryzowały się frakcje uzyskane z cytoplazmy. Autoliza komórek bakterii zachodząca podczas przygotowywania i fermentacji zakwasu piekarniczego wpływa korzystnie na uwalnianie enzymów wewnątrzkomórkowych. Di Cagno i wsp. [9] badali wpływ hydrolizy (trawionej wcześniej pepsyną i trypsyną) frakcji gliadyny pszenicznej przez bakterie fermentacji mlekowej na aglutynację komórek K 562 (S). Peptydazy biosyntetyzowane przez *Lb. alimentarius* 15M i *Lb. brevis* 14G całkowicie zapobiegały aglutynacji komórek K562 (S) przez polipeptydy przy ich stężeniu 0,875 g/l. Wyższe stężenia prolamin powodowały niższą procentowo inhibicję procesu aglutynacji.

Przeprowadzone przez Shana i wsp. [30] doświadczenia wykazały, że 33-merowy polipeptyd bogaty w prolinę i glutaminę jest odporny na działanie pepsyny, trypsyny, chymotrypsyny i estalazy. Analiza struktury drugorzędowej tego peptydu wykazała helikalną budowę typu II stabilizowaną przez poliprolinę. Tego typu konformacja drugorzędowa jest typowa dla peptydów wiążących białka MHC klasy II. Liczebność i lokalizacja reszt proliny w peptydzie jest czynnikiem warunkującym odporność na działanie enzymów przewodu pokarmowego. Znając strukturę drugorzędową peptydu, Shan i wsp. [30] poddali go działaniu propyl-endopeptydazy biosyntetyzowanej przez *Flavobacterium meningosepticum*. Wstępne badania *in vitro* i *in vivo* wykazały obniżenie alergenicności badanego peptydu. Ponadto, zmodyfikowany peptyd wykazywał mniejszą stymulację komórek T. Di Cagno i wsp. [8] wykorzystali ten sam 33-merowy polipeptyd poddając go degradacji przez enzymy szczepów: *Lb. alimentarius* 15M, *Lb. brevis* 14G, *Lb. sanfranciscensis* 7A i *Lb. hilgardii* 51B. Szczepy te wykazywały aktywność enzymatyczną charakterystyczną dla: iminopeptydaz, dipeptydyl-peptydaz, prolyl-endopeptydaz, prolidaz, prolinaz i aminopeptydaz. Wyniki 12- i 24-godzinnej hydrolizy wykazały rozkład badanego peptydu, odpowiednio w 70 i 100%.

Alergenność prolamin pszenicy można także obniżyć stosując bromelainę, która hydrolizuje wiązania w pobliżu proliny w epitopie IgE: QQQPP lub stosując kolagenazę [24]. Uzyskana w ten sposób mąka nie traci właściwości funkcjonalnych i wykorzystywana jest do produkcji bułek drożdżowych. Innym przykładem zastosowania procesów enzymatycznych w obniżaniu alergenicności jest produkcja hipoalergicznego ryżu metodą dwu-etapową z wykorzystaniem aktinazy [35].

Podsumowanie

Przedstawiono złożoność procesu biodegradacji białek zapasowych ziarniaków zbóż. Żywność zawiera białka roślinne, które w czasie trawienia w przewodzie

pokarmowym ulegają modyfikacjom. Produkty przemian białek – peptydy i polipeptydy nie pozostają obojętne dla zdrowia człowieka. Immunologiczne reakcje z białkami żywności w tym także białkami zbóż, a niekiedy białkami enzymów są coraz powszechniejsze. Poznanie, a następnie wykorzystanie aparatu enzymatycznego bakterii fermentacji mlekowej zakwasów piekarniczych do zmniejszenia alergenicności białek i produktów ich przemian wskazuje kierunek dalszych badań w tym zakresie.

Literatura

- [1] Arentz-Hansen H., Körner R., Molberg Ø.: The intestinal T cell response to α gliadin in adult celiac disease is focused on single deaminated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J. Exp. Med.*, 2000, **191**, 603-612.
- [2] Arentz-Hansen H., McAdam S.N., Molberg Ø.: Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadin rich in proline residues. *Gastroenterology*, 2002, **123**, 803-809.
- [3] Ariyoshi Y.: Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci. Tech.*, 1993, **4**, 139-144.
- [4] Armentia A., Sánchez-Monge R., Gomez L., Barber D., Sálcedo G.: *In vivo* allergenic activities of eleven purified members of major allergen family from wheat and barley flour. *Clin. Exp. Allergy*, 1993, **23**, 410-415.
- [5] Cornell H.J., Mothes T.: Further studies of the *in vitro* activity of synthetic gliadin peptides in coeliac disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1270**, 168-172.
- [6] Curioni A., Santucci B., Cristaudo A., Canistraci C., Pietravalle M., Simonato B., Giannattasio M.: Urticaria from beer: An immediate hypersensitivity reaction due to a 10-kDa protein derived from barley. *Clin. Exp. Allergy*, 1999, **29**, 407-413.
- [7] Dewar D., Pereira S.P., Ciclitira P.J.: The pathogenesis of coeliac disease. *Int. J. Biochem. Cell B.*, 2004, **36**, 17-24.
- [8] Di Cagno R., De Angelis M., Auricchio S., Greco L., Clarke C., De Vincenzi M., Giovannini C., D'Archivio M., Landolfo F., Parrilli G., Minervini F., Arendt E., Gobbetti M.: Sourdough bread made from wheat and non-toxic flours and started with selected *Lactobacilli* is tolerated in celiac patients. *Appl. Environ. Microb.*, 2004, **70** (2), 1088-1096.
- [9] Di Cagno R., De Angelis M., Lavermicocca P., De Vincenzi M., Giovannini C., Faccia M., Gobbetti M.: Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: Effects on Wheat Flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl. Environ. Microb.*, 2002, **68** (2), 623-633.
- [10] Ensari A., Marsh M.N., Moriarty K.J., Moore C.M., Fido R.J., Tatham A.S.: Studies *in vivo* of ω gliadins in gluten sensitivity (coeliac sprue disease). *Clin. Sci.*, 1998, **95**, 419-424.
- [11] Figueredo E., Quirce S., del Amo A., Ceresta J., Arrieta I., Lahoz C., Sastre J.: Beer-induced anaphylaxis: Identification of allergens. *Allergy*, 1999, **54**, 630-634.
- [12] Fukudome S., Jinsmaa Y., Matsukawa T., Sasaki R., Yoshikawa M.: Release of opioid peptides, gluten exorphins by the action of pancreatic elastase. *FEBS Lett.*, 1997, **412** (3), 475-479.
- [13] Fukushima D.: Recent progress of soybean protein foods: chemistry, technology and nutrition. *Food Rev. Int.*, 1991, **7** (3), 323-351.

- [14] Gentile V., Violante V., D'Amico B., Illiano M., Luongo A.: Tissue transglutaminase and coeliac disease pathogenesis: potential molecular mechanisms for other human diseases. *Neurochem. Int.*, 2002, **40**, 79-83.
- [15] Gobbetti M.: The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeast. *Trends Food Sci. Tech.*, 1998, **9**, 267-274.
- [16] Gomez L., Martin E., Hernandez D., Sánchez-Monge R., Barber D., del Pozo V., de Andres B., Armentia A., Lahoz C., Sálcedo G., Palomino P.: Members of the α -amylase inhibitor family from wheat endosperm are major allergens associated with baker's asthma. *FEBS Lett.*, 1990, **261**, 85-88.
- [17] James J.M., Sixbey J.P., Helm R.M., Bannon G.A., Burks A.W.: Wheat α -amylase inhibitor: A second route of allergic sensitization. *J. Allergy Clin. Immun.*, 1997, **99**, 239-244.
- [18] Kączkowski J.: Transglutaminase – an enzyme group of extended metabolic and application possibilities. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2005, **14/55**, **1**, 3-12.
- [19] Kimoto M., Yoshikawa M., Takahashi K., Bando N., Okita M., Tsuji H.: Identification of allergen in cereals and their hypoallergenization. I. Screening of allergens in wheat and identification of an allergen, Tri a Bd 17K. *Ann Report Interdisipl. Res. Inst. Environ. Sci.*, 1998, **17**, 53-60.
- [20] Korhonen H., Pihlanto-Leppälä A., Rantamäki P., Tupasela T.: Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends Food Sci. Tech.*, 1998, **9**, 307-319.
- [21] Marsh M.N.: Gluten, major histocompatibility complex and the small intestine: a molecular and immuno-biological approach to the spectrum of gluten-sensitivity ("celiac sprue"). *Gastroenterology*, 1992, **102**, 330-354.
- [22] Mcl Mowat A.: Coeliac disease – a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry. *Lancet*, 2003, **361**, 1290-1292.
- [23] Meisel H., Schlimme E.: Bioactive peptides derived from milk proteins: ingredients for functional foods. *Kieler Milchw. Forsch.*, 1996, **48**, 343-357.
- [24] Mills E.N.C., Madsen C., Shewry P.R., Wichers H.J.: Food allergens of plant origin – their molecular and evolutionary relationships. *Trends Food Sci. Tech.*, 2003, **14**, 145-156.
- [25] Miyoshi S., Ishikawa H., Kaneko T., Fukui F., Tanaka H., Maruyama S.: Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an alpha-zein hydrolysate. *Agr. Biol. Chem. Tokyo*, 1991, **55**, 1313-1318.
- [26] Müntz K., Belozersky M.A., Dunaevsky Y.E., Schlereth A., Tiedemann J.: Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seed during germination and seedling growth. *J. Exp. Bot.*, 2001, **52** (362), 1741-1752.
- [27] Okamoto A., Hanagata H., Matsumoto E., Kawamura Y., Koizumi Y., Yanugida F.: Angiotensin I. Converting enzyme inhibitory activity of various fermented foods. *Biosci. Biotech. Bioch.*, 1995, **59** (6), 1147-1149.
- [28] Rocher A., Soriano F., Molina E., González-Limas G., Méndez E.: Characterization of distinct α - and γ -type gliadins and low molecular weight components from wheat endosperm as coeliac immunoreactive proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1247**, 143-148.
- [29] Serafini-Fracassini D., Dei Duca S., Beninati S.: Plant transglutaminases. *Phytochemistry*, 1995, **40** (2), 355-365.
- [30] Shan L., Molberg Ø., Parrot I., Haush F., Filiz F., Gray G.M., Sollid L.M., Khosla C.: Structural Basis for Gluten Intolerance in celiac sprue. *Science*, 2002, **297** (5590), 2275-2279.
- [31] Skovbjerg H., Norén O., Anthonsen D., Moller J., Sjöström H.: Gliadin is a good substrate of several transglutaminases: Possible implication in the pathogenesis of coeliac disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2002, **7**, 812-817.

- [32] Tanabe S., Arai S., Yanagihara Y., Mita H., Takahashi K., Watanabe M.: A major wheat allergen has a Gln-Gln-Gln-Pro-Pro motif identified as an IgE-binding epitope. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, **219**, 290-293.
- [33] Tatham A.S., Shewry P.R.: Elastomeric proteins; biological roles. Structure and mechanisms. *Trends Biochem. Sci.*, 2000, **25**, 567-571.
- [34] Tsuji H., Kimoto M., Natori Y.: Allergens in major crops. *Nutr. Res.*, 2001, **21**, 925-934.
- [35] Watanabe M., Yoshizawa T., Miyakawa J., Ikezawa Z., Abe K., Yanagisawa T., Arai S.: Quality improvement and evaluation of hypoallergenic rice grains. *J. Food Sci.*, 1990, **55**, 1105-1107.
- [36] Zioudrou C., Streaty R.A., Klee W.A.: Opioid peptides derived from food proteins (the exorphins). *J. Biol. Chem.*, 1979, **254** (4), 2446-2449.

BIOTECHNOLOGICAL MODIFICATION OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF PROTEINS IN CEREALS

S u m m a r y

In the paper, there were presented biological properties of peptides obtained from storage proteins of cereal grains. Aminoacid sequences were pointed out in the peptides released from the proteins contained in, among other things, cereals showing biological activity. It was also shown what role those peptides played in allergic reactions causing such diseases as coeliac disease or asthma. There were characterized those functions of the peptide epitops isolated from cereals proteins that were responsible for allergenic reactions. The functions of transglutaminase were discussed with regard to their role in the conversion of proteins in the lamina propria of colon. Potential applications of some enzymes (transglutaminase, proline, and peptidase) and microorganisms (sourdough lactic acid bacteria) were suggested with regard to the possibility of reducing the allergenicity of plant-originating peptides. Several biotechnological methods of reducing the allergenicity of cereals proteins were described.

Key words: proteins, cereals, allergens, transglutaminase, proline peptidase 