

AGATA SZYMKIEWICZ, LUCJAN JĘDRYCHOWSKI, ANETA WAGNER

## WPLYW OBRÓBKI TERMICZNEJ I HYDROLIZY ENZYMATYCZNEJ NA ALERGENNOŚĆ BIAŁEK GROCHU

### Streszczenie

Nasiona roślin strączkowych należą do produktów, które najczęściej są przyczyną alergii pokarmowych. Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu procesu gotowania i modyfikacji enzymatycznej na alergenne właściwości białek grochu.

Stwierdzono stosunkowo wysoką odporność białek grochu na termiczną obróbkę. Proces gotowania zmniejszył ich alergenicność o ok. 25-50% w stosunku do alergenicności produktu niemodyfikowanego. Hydroliza enzymatyczna okazała się bardziej efektywna i powodowała zmniejszenie alergennych właściwości białek grochu o ok. 47-70%. Wykazano, że proces hydrolizy z wykorzystaniem trypsyny z większą skutecznością redukuje alergenicność białek grochu niż proces prowadzony przy użyciu Alkalazy.

W otrzymanych hydrolizatach oceniano również immunoreaktywność poszczególnych białek grochu (albuminy, leguminy i wicyliny), wykorzystując królicze przeciwciała klasy G, uzyskane w stosunku do wyizolowanych i oczyszczonych frakcji. Stwierdzono, że po hydrolizie enzymatycznej immunoreaktywność wicyliny pozostawała ciągle na wysokim poziomie, zwłaszcza po procesie prowadzonym przy udziale Alkalazy. Można zatem wnioskować, że mniejsza alergenicność hydrolizatów białek grochu uzyskanych przy udziale trypsyny wynika z istotnego zmniejszenia alergenicności wicyliny w toku proteolizy.

**Słowa kluczowe:** alergenicność białek grochu, hydroliza enzymatyczna, obróbka termiczna, ELISA

### Wprowadzenie

Oprócz wartościowego białka, nasiona roślin strączkowych zawierają frakcje błonnika pokarmowego, istotne podczas trawienia, jak i związki mogące odgrywać rolę czynnika profilaktycznego w odniesieniu m.in. do chorób nowotworowych [10, 12]. W nasionach tych występują również substancje niepożądane żywieniowo, pogarszające strawność pokarmu (inhibitory enzymów, fitohemaglutyniny) [22] czy alergeny [5]. Orzeszki ziemne i soja należą do produktów, będących najczęściej przyczyną alergii pokarmowej na świecie. Wyizolowane z ich nasion alergeny są zdolne do wywołania

---

*Dr inż. A. Szymkiewicz, prof. dr hab. L. Jędrzychowski, Oddział Nauki o Żywności, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn, dr A. Wagner, NZOZ Centrum Alergologii, ul. Tuwima 22/26, 90-002 Łódź*

ogólnoustrojowej reakcji anafilaktycznej [26, 28]. Zjawisko reakcji krzyżowych pomiędzy alergenami zwiększa ryzyko uwrażliwienia się organizmu na białka innych nasion z rodziny roślin strączkowych, m.in. grochu [11, 17, 19]. Pod koniec 2004 r. opublikowano wyniki badań dotyczących alergenów wyizolowanych z frakcji wicylinowej grochu [23]. Opisano je jako Pis s 1 i Pis s 2 i umieszczono na liście bazy danych o alergenach ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)).

Procesy technologiczne, jakim poddawana jest żywność, mogą wpływać na jej potencjał alergenny [3, 4, 13, 27]. Podjęto badania, których celem było określenie wpływu procesu gotowania i modyfikacji enzymatycznej na alergenne właściwości białek grochu.

### **Material i metody badań**

Material badawczy stanowiły nasiona grochu (*Pisum sativum* L.) odmiany Kwestor (zbiór z roku 2000) uzyskane z Poznańskiej Hodowli Roślin, Spółka z o.o. w Tulcach k. Poznania. Ziarna po obłuskaniu mielono, a otrzymaną mąkę przesiewano przez sito ( $\varnothing$  0,25 mm). Białka wydzielano z mąki na podstawie metodyki zaproponowanej przez Barnett i wsp. [2]. Ekstrakcję prowadzono przez 2 godz. 50 mM buforem Tris-HCl o pH 8, zawierającym 0,2 M NaCl. Stosunek mąki do buforu wynosił 1:10 (m/v). Uzyskaną zawiesinę wirowano 30 min (15000 g). Supernatant dializowano wobec 50 mM roztworu węglanu amonu, zamrażano, liofilizowano i przechowywano do analiz w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### *Metody modyfikacji białek grochu*

Nasiona grochu po namoczeniu gotowano do miękkości. Następnie nasiona (wraz z zalewą) zamrażano i liofilizowano. Białka ekstrahowano metodą stosowaną do nasion surowych.

Hydrolizę enzymatyczną prowadzono przy użyciu Alkalazy 2.4 L FG (Subtilisina Carlsberg) z firmy Novo Nordisk i trypsyny (EC 3.4.21.4) (T-7409, Sigma), w ciągu 180 min, w temp.  $50^{\circ}\text{C}$ , utrzymując pH na poziomie 8,0. Enzymy dodawano w postaci wodnych roztworów w ilości 30 mAU/g białka. W celu inaktywacji enzymów hydrolizaty ogrzewano przez 10 min w temp.  $90^{\circ}\text{C}$ . Po schłodzeniu preparaty zobojętniano do pH 7,0, zamrażano i suszono metodą liofilizacji.

Immunoreaktywne właściwości modyfikowanych białek grochu oznaczano metodą ELISA, stosując poliklonalne przeciwciała wyprodukowane wobec poszczególnych antygenów grochu (albuminy, leguminy i wicyliny).

*Izolacja antygenów z nasion grochu i produkcja przeciwciał poliklonalnych*

Frację albuminową izolowano metodą opisaną przez Lu i wsp. [16], a następnie oczyszczano metodą chromatografii żelowej z wykorzystaniem złoża Sephadex G-75. Białka globulinowe izolowano metodą zaproponowaną przez Melo i wsp. [18], a frakcjonowano według procedury Lamberta i wsp. [15]. Frakcje leguminową i wicylinową oczyszczano stosując chromatografię jonowymienną na złożu DEAE-Sepharose Fast Flow.

Do oczyszczonych antygenów wyprodukowano poliklonalne przeciwciała w wyniku parokrotnej immunizacji królików.

Doświadczenia na zwierzętach przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach Laboratoryjnych, zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej i wymogami prawnymi.

*Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących z solą sodową siarczanu dodecydylu (SDS-PAGE)*

Rozdziały elektroforetyczne prowadzono w 12,5% żelu poliakrylamidowym o grubości 1 mm, w buforze Tris-glicyna o pH 8,3 (192 mmol/l glicyna, 25 mmol/l Tris i 0,1% SDS). Próby przygotowywano przez zmieszanie 100  $\mu$ l roztworu zawierającego 2 mg/ml białka, ze 100  $\mu$ l buforu lizującego o składzie: 125 mM Tris-HCl o pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerolu; 5%  $\beta$ -merkaptoetanolu oraz 0,002% błękitu bromofenolowego. Próby przed naniesieniem na żel poddawano denaturacji przez gotowanie w temp. 100°C przez 5 min. Po elektroforezie żele wybarwiano 30 min w 0,1% roztworze Coomassie Brilliant Blue R-250 (SERVA) w układzie: metanol - woda - kwas octowy (5:5:2). Do odbarwiania używano roztworu: metanol - woda - kwas octowy (1:8:1). Jako wzorca mas cząsteczkowych używano Low Molecular Markers (M-3913, Sigma) o zakresie mas od  $6,5 \cdot 10^3$  do  $66 \cdot 10^3$  Da.

*Oznaczanie immunoreaktywności testem ELISA typu konkurencyjnego*

Mikroplótkę opłaszczano roztworem antygeny o stężeniu 5  $\mu$ g/ml w 0,05 M buforze węglanowym o pH 9,6 w ilości 100  $\mu$ l/studzienkę i inkubowano 12 godz. w temp. 4°C. Następnie przemywano trzykrotnie mikroplótki buforem PBS-T i blokowano puste miejsca na powierzchni adsorpcji w studzienkach 1,5% roztworem żelatyny. Po przepłukaniu mikroplótek do studzienek наносzono jednocześnie (po 50  $\mu$ l) badanych roztworów (modyfikowanych białek grochu) w odpowiednich rozcieńczeniach (lub roztworów standardów – antygeny) oraz po 50  $\mu$ l roztworów odpowiednich króliczych przeciwciał IgG, specyficznych wobec antygeny użytego do opłaszczania mikroplótki. Po godzinnej inkubacji w temp. 37°C dodawano kozią immunoglobulinę G, znakowaną peroksydazą chrzanową, skierowaną przeciw króliczej immunoglobulinie G (A-6154, Sigma) w rozcieńczeniu 1:15000. Po kolejnej godzinie inkubacji zastosowano substrat

- 10% roztwór TMB. Reakcję zatrzymywano po 30 min 2M roztworem kwasu siarkowego. Absorbancję odczytywano przy długości fali 450 nm, stosując czytnik automatyczny „Sunrise”, firmy Tecan.

Immunoreaktywność prób obliczano na podstawie krzywych standardowych, używając komputerowego programu EIA/ERIA.

#### *Oznaczanie poziomu IgE w surowicy osób z alergią pokarmową*

Surowice wykorzystane w badaniach *in vitro* otrzymano od 24 pacjentów z NZO Centrum Alergologii w Łodzi. Diagnoza w kierunku alergii pokarmowej została potwierdzona na podstawie oznaczenia w surowicy poziomu specyficznych przeciwciał klasy E (sIgE).

Oznaczenia sIgE wykonywano za pomocą gotowych zestawów odczynnikowych (produkcji Allergopharma) oraz alergenów (osadzonych na krążkach celulozowych). Oznaczenie wykonywano metodą ELISA. Substratem fosfatazy alkalicznej był p-nitrofenylofosforan. Po otrzymaniu zabarwienia odczytywano ekstynkcję przy długości fali 405/620 nm.

Oznaczanie poziomu specyficznych przeciwciał klasy E wobec białek nasion roślin strączkowych i frakcji grochu, w surowicy osób ze stwierdzoną alergią pokarmową prowadzono według poniższej procedury.

Mikropłytkę opłaszczano roztworem antygeny o stężeniu 10 µg/ml (ekstrakt białek nasion roślin strączkowych, frakcje białek grochu lub modyfikowane białka grochu) w 0,05 M buforze węglanowym o pH 9,6 w ilości 100 µl/studzienkę i inkubowano 12 godz. w temp. 4°C. Następnie blokowano puste miejsca na powierzchni adsorpcji w studzienkach 1,5% roztworem żelatyny. Po inkubacji trzykrotnym przepłukaniu do studzienek wprowadzano roztwory surowic ludzkich w rozcieńczeniu 1:5. Mikropłytki inkubowano 2 godz. w temp. 37°C. Po wypłukaniu do studzienek wprowadzano roztwór biotynylowanej koziej immunoglobuliny skierowanej wobec ludzkiej immunoglobuliny E (5069, Nordic) w rozcieńczeniu 1:1000. Inkubację prowadzono ponownie 2 godz. w temp. 37°C i po trzykrotnym przemyciu dodawano roztwór peroksydazy chrzanowej skoniugowanej z ekstrawidyną (E 2886, Sigma). Jako substrat stosowano roztwór tetrametylobenzydyny (TMB). Poziom specyficznych IgE w surowicy pacjentów wyrażano jako średnią absorbancję z trzech oznaczeń.

#### *Oznaczanie stopnia redukcji alergenicności modyfikowanych białek grochu*

Stopień redukcji alergenicności modyfikowanych białek grochu określano na podstawie oznaczenia specyficznych przeciwciał w surowicy pacjentów.

Procent utraty aktywności antygenowej białek grochu wyliczano z równania [7]:

$$A [\%] = (1 - A_M / A_N) \times 100$$

gdzie:

$A_M$  – wartość absorbancji próby modyfikowanej,

$A_N$  – wartość absorbancji próby natywnej.

### Wyniki i dyskusja

Soja i orzeszki ziemne, ze względu na wysokie spożycie, są przyczyną większości alergicznych reakcji powodowanych przez żywność w Stanach Zjednoczonych, Wielkiej Brytanii czy Japonii [6]. Z kolei soczewica, ciecierzycyca i groch są najczęściej konsumowane w krajach basenu Morza Śródziemnego i niektórych krajach Azji (Indie) [20, 21]. Z pewnością jest to główna przyczyna tego, że w Hiszpanii 10% pacjentów cierpiących z powodu alergii pokarmowych wykazuje kliniczne symptomy chorobowe po spożyciu nasion soczewicy [8]. I o ile uważa się, że kliniczna reaktywność krzyżowa pomiędzy białkami nasion strączkowych jest dość rzadka [25] (badania te dotyczą głównie nasion soi i orzeszków ziemnych), to ponad 70% osób z alergią na groch, soczewicę czy ciecierzycę reaguje pozytywnie w testach otwartej prowokacji na białka wszystkich tych nasion [14]. W Polsce przypadki alergii na białka nasion roślin strączkowych innych niż soja czy orzeszki ziemne nie są jak dotychczas zbyt częste. Być może wynika to ze słabych ich właściwości alergizujących, ale może być spowodowane również nie uwzględnianiem ich w diagnostycznych testach alergicznych.

W badaniach własnych uzyskano pozytywne wyniki dotyczące obecności specyficznych przeciwciał IgE wobec wszystkich badanych białek nasion roślin strączkowych (soi, soczewicy, grochu i fasoli) w surowicy pacjentów z objawami potwierdzonej alergii pokarmowej. Poziomy specyficznych reakcji były zróżnicowane (tab. 1). Potwierdziły również istnienie zjawiska tzw. IgE-zależnej krzyżowej reaktywności. W surowicy sześciu osób stwierdzono bowiem obecność przeciwciał specyficznych wobec wszystkich badanych białek.

Obecność specyficznych przeciwciał IgE wobec białek grochu stwierdzono w surowicy 12 osób spośród 24 przebadanych. Poziom tych przeciwciał był zróżnicowany. W dalszej części oznaczono poziom specyficznych IgE wobec oczyszczonych białek grochu. Stwierdzono, że w surowicy większości osób z podwyższonym mianem IgE wobec białek całego ekstraktu grochu, wykazano obecność specyficznych przeciwciał do wicyliny (tab. 1). Większość z tych pacjentów cierpiała z powodu alergii na orzechy ziemne (surowice nr 18, 19, 22, 23, 24). Specyficzne przeciwciała wobec białek grochu wykryto również w surowicy osób reagujących alergicznie na kakao, gluten, owoce czy białka mleka. Jest to wynikiem prawdopodobnie podwyższonego miana ogólnego IgE u wszystkich tych osób. Znacznie mniej badanych osób wykazało obecność w surowicy przeciwciał specyficznych wobec pozostałych białek grochu – leguminy, a zwłaszcza albuminy. W dwu przypadkach z podwyższonym mianem IgE wobec białek całego ekstraktu grochu nie stwierdzono specyficznych immunoglobulin do anali-

zowanych poszczególnych frakcji. Dowodzi to możliwości istnienia innych alergen-nych składników grochu (tab. 1).

Tabela 1

Obecność specyficznych przeciwciał wobec białek nasion strączkowych w surowicy pacjentów ze zdiagnozowaną alergią pokarmową.

The level of specific antibodies against proteins from legumes in the sera of patients with food allergy.

Nr pacjenta Patient Nb	Zdiagnozowana przyczyna alergii pokarmowej Diagnosed cause of food allergy	Poziom specyficznej IgE w surowicy / Level of specific IgE in serum						
		białek soi antypea soybean proteins	białek soczewicy anty-lentil lentil proteins	białek fasoli antyfabo bean proteins	białek grochu antypea pea proteins	albumin-grochu antypea albumin	legumin-grochu antypea legumin	wicyliny grochu pea vicilin
1	Pomidor / Tomato	-	-	-	-	-	-	-
2	$\alpha$ -laktoalbumina, $\beta$ -laktoglobulina $\alpha$ -laktoalbumin, $\beta$ -laktoglobulin	-	*	-	*	-	-	-
3	Żółtko jaja, seler, mąka pszena, kurczę Yolk, celery, wheat flour, chicken	+	-	*	-	-	-	-
4	Kakao / Cocoa	+++	*	*	+	-	-	+
5	Gluten / Gluten	+	++	+	+	-	-	+
6	$\alpha$ -laktoalbumina, $\beta$ -laktoglobulina, kazeina $\alpha$ -laktoalbumin, $\beta$ -laktoglobulin, casein	-	-	-	-	-	-	-
7	mleko, $\beta$ -laktoglobulina milk, $\beta$ -laktoglobulin	-	*	-	-	-	-	-
8	$\beta$ -laktoglobulina $\beta$ -laktoglobulin	-	-	-	-	-	-	-
9	Soja, kakao / Soya, cocoa	-	-	-	-	-	-	-
10	$\beta$ -laktoglobulina $\beta$ -laktoglobulin	+	-	-	-	-	-	-
11	$\alpha$ -laktoalbumina $\alpha$ -laktoalbumin,	+	+	-	-	-	-	-
12	Owoce / Fruits	+++	++	++	+	-	+	++
13	Owoce, wieprzowina, gluten, kurczak, indyk / Fruits, pork, gluten, chicken, turkey	-	-	-	-	-	-	-
14	Pomidor / Tomato	-	-	-	-	-	-	-

15	$\alpha$ -laktoalbumina, $\beta$ -laktoglobulina, kazeina $\alpha$ -laktoalbumin, $\beta$ -laktoglobulin, casein	++	-	++	+	-	-	-
16	Białko jaja, banan Egg white, banana	-	-	-	-	-	-	-
17	$\beta$ -laktoglobulina, kazeina, jaja $\beta$ -laktoglobulin, casein, eggs	-	-	-	+	-	-	+
18	Orzechy laskowe, orzechy ziemne, sezam, soja, białko jaja, ziemniaki Hazel nuts, peanuts, sesame, soya, egg white, potatoes	++	++	+	+++	+	+	++
19	Orzechy ziemne / Peanuts	+++	-	-	+	-	+	++
20	Orzechy ziemne / Peanuts	-	-	-	+	-	-	+
21	Mąka żytnia, mąka pszenna Rye flour, wheat flour	-	-	-	-	-	-	-
22	Orzechy ziemne, migdały, soja, sezam, seler, marchew, mąka żytnia / Peanuts, almonds, soya, sesame, celery, carrot, rye flour.	+	+	*	+	-	+	+
23	Orzechy ziemne, sezam, mąka żytnia i pszena, marchew Peanuts, sesame, rye flour, wheat flour	-	+	++	+	-	-	+
24	Orzechy ziemne, soja, pomidor Peanuts, soya, tomato	++	+	+	++	+	-	++

+++ - bardzo silna reakcja / very strong reaction; ++ - silna reakcja / strong reaction; + - słaba reakcja / weak reaction; \* - bardzo słaba reakcja / very weak reaction.

Nasiona grochu poddano procesowi gotowania i enzymatycznej modyfikacji za pomocą trypsyny lub Alkalazy. Stwierdzono stosunkowo wysoką odporność białek grochu na obróbkę termiczną. Proces gotowania nasion grochu tylko w nieznacznym stopniu przyczynił się do zmniejszenia alergenicności białek. Poza dwoma wyjątkami, aktywność antygenowa została zredukowana o 25-43% (tab. 2). W badaniach prowadzonych w naszym zespole stwierdzono również znaczne obniżenie immunoreaktywności białek grozdku zielonego na skutek zastosowanych procesów, takich jak: gotowanie, sterylizacja, konserwowanie czy mrożenie [27]. Z dostępnej literatury wynika, że termiczna obróbka często przyczynia się do obniżenia immunoreaktywności, ale nie

zawsze redukuje alergenicność produktu [9]. Termiczne procesy, takie jak gotowanie czy smażenie przyczyniły się na przykład do zredukowania potencjału alergizującego orzeszków ziemnych, ale zastosowanie wysokiej temperatury podczas prażenia zdecydowanie go podwyższyło [4]. Obniżenie immunogenicności wynika przede wszystkim z wpływu wysokiej temperatury na zmiany drugo- i trzeciorzędowej struktury oraz niszczenia struktury czwartorzędowej białek. Nie zawsze zmiany te zachodzą w obszarach odpowiedzialnych za reakcję ze specyficznymi przeciwciałami. Z gotowanych nasion soczewicy wyizolowano frakcje, które w dalszym ciągu były rozpoznawane przez specyficzne IgE pacjentów z objawami alergii na soczewicę [13, 24].

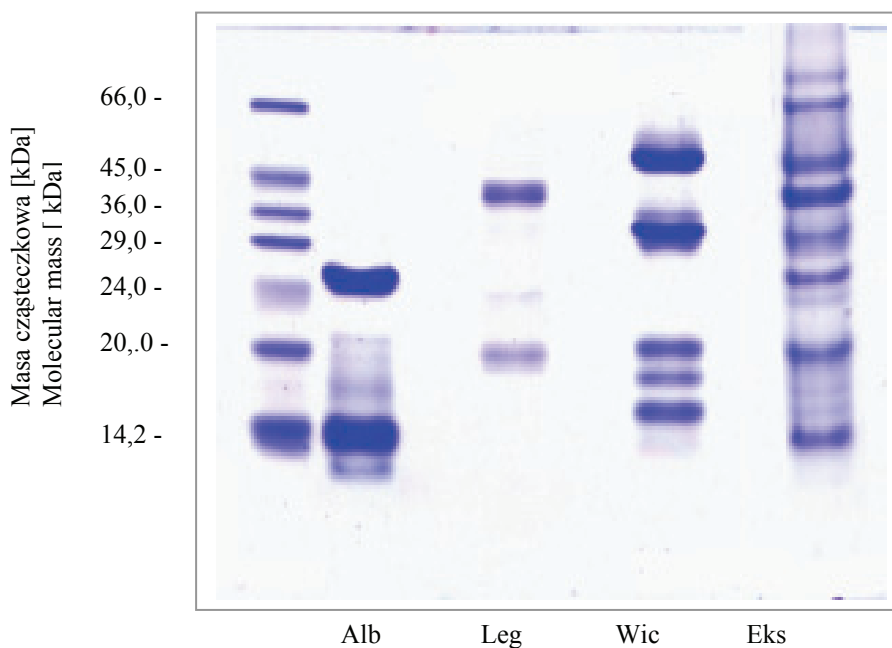
Tabela 2

Ocena wpływu wybranych procesów na zmiany właściwości alergicznych białek grochu.  
Influence of selected processes on allergenic properties of pea proteins.

Modyfikacja białek grochu Pea proteins modification	Utrata antygenowości modyfikowanych białek grochu [%] Antigenity loss of modified pea proteins [%]											
	Numer pacjenta / Patient Nb											
	2	4	5	12	15	17	18	19	20	22	23	24
Obróbka termiczna Thermal process	36,47	39,45	31,83	52,51	48,95	39,65	25,49	39,37	33,86	49,27	41,06	43,50
Hydroliza z użyciem trypsyny Trypsin hydrolysis	62,34	57,67	69,30	65,28	65,96	62,78	61,00	65,45	61,10	47,47	67,60	62,00
Hydroliza z użyciem Alkalazy Alcalasa hydrolysis	61,66	68,41	65,55	63,31	56,21	59,87	56,69	64,03	59,23	46,97	63,04	53,51

Przeprowadzona w pracy hydroliza enzymatyczna okazała się bardziej efektywnym procesem i spowodowała zmniejszenie alergicznych właściwości białek grochu o ok. 47-70% (tab. 2). Wykazano, że proces z wykorzystaniem trypsyny z większą skutecznością redukował alergenicność białek grochu niż proces prowadzony przy użyciu Alkalazy. W celu wyjaśnienia przyczyn tego zjawiska oceniano immunoreaktywność poszczególnych białek grochu (albuminy, leguminy i wicyliny), wykorzystując królicze przeciwciała klasy G, uzyskane w stosunku do wyizolowanych i oczyszczonych frakcji (rys. 1). Stwierdzono większą odporność poszczególnych białek grochu na trawienie Alkalazą niż trypsyną. Ich immunoreaktywność została obniżona o 78-99%





Alb – albuminy / albumins; Leg – legumina / legumin; Wic – wicylina / vicilin; Eks – ekstrakt białek grochu / extract of pea proteins.

Rys. 1. Elektroforegram oczyszczonych frakcji grochu użytych do pozyskania króliczych przeciwciał poliklonalnych.

Fig. 1. Electroforegram of purified pea fractions used for production of polyclonal rabbit antibodies.

Tabela 3

Pozostała immunoreaktywność głównych frakcji białek grochu podczas procesu hydrolizy przy użyciu Alkalazy.

Residual immunoreactivity of main pea protein fractions during Alcalase hydrolysis.

Frakcja białek grochu Pea protein fraction	Pozostała immunoreaktywność [%] / Residual immunoreactivity [%]						
	Czas hydrolizy [min] / Hydrolysis time						
	0	10	20	40	60	120	180
Albuminy / Albumins	100	50,96	24,29	9,76	5,1	2,03	0,8
Legumina / Legumin	100	75,34	46,01	17,2	10,03	7,11	5,05
Wicylina / Vicilin	100	52,96	54,09	27,83	23,42	21,99	21,64

(tab. 3 i 4). Najmniejsze zmiany następowały w obrębie frakcji wicylinowej, której immunoreaktywność, zwłaszcza po procesie prowadzonym przy udziale Alkalazy,

pozostawała ciągle na wysokim poziomie i stanowiła ok. 22% immunoreaktywności tej frakcji obliczonej w przypadku ekstraktu niepoddanego hydrolizie (tab. 3). Zastosowanie trypsyny doprowadziło do zdecydowanie większego obniżenia immunoreaktywności wicyliny w czasie proteolizy (o ok. 95%) (tab. 4). Astwood i wsp. [1] również uzyskali wysoką odporność wicylin (białek typu 7S) na trawienie i procesy technologicznej obróbki żywności.

Tabela 4

Pozostała immunoreaktywność głównych frakcji białek grochu podczas procesu hydrolizy przy użyciu trypsyny.

Residual immunoreactivity of main pea protein fractions during trypsin hydrolysis.

Frakcja białek grochu Pea protein fraction	Pozostała immunoreaktywność [%] / Residual immunoreactivity [%]						
	Czas hydrolizy [min] / Hydrolysis time [min]						
	0	10	20	40	60	120	180
Albuminy / Albumin	100	55,71	40,06	15,01	4,57	1,91	0,49
Legumina / Legumin	100	26,01	17,22	8,16	6,26	3,20	1,34
Wicylina / Vicilin	100	28,73	13,66	6,02	4,44	4,43	4,82

Przedstawione wcześniej wyniki dowodzą, że przeciwciała klasy E obecne w surowicy atopowych pacjentów reagują głównie z epitopami występującymi we frakcji wicylinowej (tab. 1). Można zatem wnioskować, że niższa alergenicność hydrolizatów białek grochu uzyskanych za pomocą trypsyny wynika z tego, że enzym ten powoduje największe zmiany w obszarze aktywnych epitopów wicyliny. W celu obniżenia alergenicności białek grochu należałoby stosować takie procesy, które będą prowadziły przede wszystkim do obniżania immunoreaktywności wicyliny. Białka typu 7S zaliczane są obecnie do silnych alergenów pokarmowych i jak dowodzą również przedstawione powyżej wyniki wymagają dalszej szczegółowej analizy.

## Wnioski

1. Bardziej efektywne obniżenie alergenicności białek grochu (o 47-70%) uzyskano w procesie enzymatycznej hydrolizy nasion aniżeli podczas gotowania.
2. Proces hydrolizy prowadzony przy użyciu trypsyny skuteczniej zredukował alergenicność białek grochu niż z wykorzystaniem Alkalazy.
3. Mniejsza alergenicność hydrolizatów białek grochu uzyskanych przy udziale trypsyny wynika z istotnego zmniejszenia alergenicności wicyliny w czasie proteolizy.

*Badania wykonano w ramach projektów badawczych 2 PO6T 078 26 oraz PBZ-KBN 097/P06/2003/4.2.*

Praca była prezentowana podczas XXXVII Ogólnopolskiej Sesji Komitetu Nauk o Żywności PAN, Gdynia, 26 – 27.IX.2006.

### Literatura

- [1] Astwood J.D., Silvanowich A., Bannon G.A.: Vicilins: A case study in allergen pedigrees. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, **110**, 26-27.
- [2] Barnett D., Bonham B., Howden M.E.H.: Allergenic cross-reactions among legume foods – An *in vitro* study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1987, **79** (3), 433-438.
- [3] Besler M., Steinhart H., Paschke A.: Stability of food allergenicity of processed foods-review. *J. Chromatography B*, 2001, **756**, 207-228.
- [4] Beyer K., Morrow E., Li X-M, Bardina L., Bannon G.A., Burks A.W., Sampson H.A.: Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001, **107**, 1077-1081.
- [5] Breiteneder H., Radauer C.H.: A classification of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004, **113**, 821-830.
- [6] Bruijnzel-Koomen C.: Adverse reactions to food. Position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Madrid 1995.
- [7] Clemente A., Vioque J., Sánchez-Vioque R., Pedroche J., Millán F.: Production of extensive chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates with reduced antigenic activity. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **4**, 3776 - 3781.
- [8] Crespo J.F., Rodriguez J., Vives R., James J.M., Reano M., Daroca P., Burbano C., Muzquiz M.: Occupational IgE-mediated allergy after exposure to lupine seed flour. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001, **108**, 295-297.
- [9] Demonte A., Carlos I.Z., Lourenco E.J., Dutra J.E., Dutra De Oliveira J.E.: Effect of pH and temperature on the immunogenicity of glycinin (*Glycine max* L.). *Plant Foods Human Nutr.*, 1997, **50**, 63-69.
- [10] Duranti M.: Grain legume proteins and nutraceutical properties – review. *Fitoterapia*, 2006, **77**, 67-82.
- [11] Eigenmann P.A., Burks A.W., Bannon G.A., Sampson H.A.: Identification of unique peanut and soy allergen in sera adsorbed with cross-reacting antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, **98**, 969-978.
- [12] Giovana Ermetice de Almeida Costa, Keila da Silva Queiroz-Monici, Soely Maria Pissini Machado Reis, Admar Costa de Oliveira: Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chem.*, 2006, **94**, 327-330.
- [13] Ibañez D., Martínez M., Marañón F, Fernández-Caldas E., Alonso E., Laso T.: Specific IgE determinations to crude and boiled lentil (*Lens culinaris*) extracts in lentil-sensitive children and controls. *Allergy*, 1999, **54**, 1209-1214.
- [14] Ibañez D., Martínez M., Sanchez J.J., Fernández-Caldas E.: Legume: cross-reactivity. *Allergol. Immunopathol.*, 2003, **31**, 151-161.
- [15] Lambert N., Chambers S.J., Phalp M., Wright D.J.: Protocol for purification of pea storage proteins and characterization of their aggregation state. *Biochem. Soc. Trans.*, 1986, **14**, 1186-1188.
- [16] Lu B.Y., Quillien L., Popineau Y.: Foaming and emulsifying properties of pea albumin fractions and partial characterisation of surface-active components. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**, 1964-1972.
- [17] Martínez S.I.M., Ibañez S., Fernández-Caldas E.: Hypersensitivity to members of the legume family. *J. Investig Allergy Clin. Immunol.*, 2000, **10** (4), 187-199.
- [18] Melo T.S., Ferreira R.B., Teixeira A.: The seed storage proteins from *Lupinus albus*. *Phytochemistry*, 1994, **37** (3), 641-647.

- [19] Moneret-Vautrin D.A., Guerin L., Kanny G., Flabbee J., Fremont S., Morisset M.: Cross-allergenicity of peanut and lupine: the risk of lupine allergy in patients allergic to peanuts. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999, **104**, **4(1)**, 883-887.
- [20] Pascual C.Y., Fernandez-Crespo J., Sanchez-Pastor S., Padiá A., Diaz-Pena J.M., Martin-Muñoz F., Martin-Esteban M.: Allergy to lentils in mediterranean pediatric patients. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999, **103**, 154-158.
- [21] Patil S.P., Niphadkar P.V., Bapat M.M.: Chickpea: a major food allergen in the indian subcontinent and its clinical and immunochemical correlation. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2001, **87**, 140-145.
- [22] Rehman Z., Shah W.H.: Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chem.*, 2005, **91**, 327-331.
- [23] Sánchez-Monge R., Lopez-Torrejón G., Pascual C.Y., Varela J., Martínez-Esteban M., Salcedo G.: Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea. *Clin. Exp. Allergy*, 2004, **34 (11)**, 1747-1753.
- [24] Sánchez-Monge R., Pascual C.Y., Diaz-Perales A., Fernández-Crespo J., Martínez-Esteban M., Salcedo G.: Isolation and characterization of relevant allergens from boiled lentils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000, **106**, 955-961.
- [25] Sicherer S.H., Sampson H.A., Burks A.W.: Peanut and soy allergy: a clinical and therapeutic dilemma – Review. *Allergy*, 2000, **55**, 515-521.
- [26] Sicherer S.H., Sampson H.A.: Food Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, **117**, 470-475.
- [27] Szymkiewicz A., Jędrychowski L.: Evaluation of immunoreactivity of selected legume seed proteins, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1998, **7(48)**, 539-544.
- [28] Van Putten M.C., Frewer L.J., Gilissen L.J.W.J., Gremmen B., Peijnenburg A.A.C.M., Wichers H.J.: Novel foods and food allergies: A review of the issues. *Trends Food Sci. Technol.*, 2006, **17**, 289-299.

#### INFLUENCE OF THERMAL TREATMENT AND ENZYMATIC MODIFICATION ON ALERGENICITY OF PEA PROTEINS

##### S u m m a r y

The most important position among products which very often may elicit allergy takes legumins. The aim of this study was to determine the influence of thermal and enzymatic modification on allergenic properties of pea proteins.

Allergenicity of pea proteins was decreased about 25-50% after thermal process like cooking. However, enzymatic hydrolysis decreased allergenicity about 47-70%. In majority cases trypsin hydrolysis caused more reduction of allergenicity of pea proteins than Alcalase hydrolysis.

Immunoreactivity of major pea proteins (albumins, legumins, vicilins) in obtained hydrolysates were determined using specific polyclonal rabbit antibodies produced against isolated and purified pea protein fractions. Pea globulins have more resistance to Alcalase hydrolysis than trypsin one. Particularly it concerns vicilin fraction. It can be the reason of lower allergenicity of pea protein hydrolysates obtained by trypsin. Especially, the highest level of antibodies in sera patients was against pea vicilins (non modified). It may provide the highest allergenicity of vicilins among pea proteins.

**Key words:** allergenicity of pea proteins, enzymatic hydrolysis, thermal modification, ELISA 