

PRZEWODNIK DO ZAJĘĆ LABORATORYJNYCH

ALERGENY POKARMOWE/ ŻYWNOSĆ JAKO ŹRÓDŁO ALERGENÓW



**UNIwersYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE**

WYDZIAŁ NAUKI O ŻYWNOSCI

Katedra Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych



**DR INŻ. IWONA KONOPKA, PROF. UWM
DR HAB. INŻ. MAŁGORZATA TAŃSKA
MGR. INŻ. Alicja Faron**

SPIS TREŚCI

| | |
|---|----|
| Sylabus | 3 |
| Zagadnienia na zaliczenie ćwiczeń..... | 5 |
| Wzór karty ćwiczeń | 6 |
| Instrukcja BHP | 7 |
| Wskazówki pierwszej pomocy w niektórych wypadkach | 8 |
| Wzór oświadczenia studentów | 10 |
| Wzór sprawozdania | 11 |
| Wprowadzenie teoretyczne do ćwiczeń..... | 12 |
| Ćwiczenie 1 | 28 |
| Ćwiczenie 2..... | 37 |
| Ćwiczenie 3..... | 49 |



UNIwersytet WArmińsko-MAzurski w Olsztynie

Wydział Nauki o Żywności Sylabus przedmiotu/modułu - część A

01303-20-B

ECTS: 2

TREŚCI MERYTORYCZNE

WYKŁAD

Podstawowe pojęcia związane z budową antygenów i pracą układu immunologicznego. Typy reakcji nadwrażliwości pokarmowej. charakterystyka głównych alergenów w żywności. cechy białek alergennych. Metody inaktywacji/usuwania alergenów z żywności. Podstawowe techniki detekcji alergenów i przeciwciał - techniki ELISA. Znakowanie żywności zawierającej alergeny. celiakia - białka glutenowe jako główny czynnik rozwoju nietolerancji i alergii pokarmowej.

ĆWICZENIA

Oznaczanie wybranych alergenów w próbkach żywności. Produkcji pieczywa bezglutenowego. Charakterystyka wybranych alergenów pokarmowych - wykorzystanie baz internetowych i informacji naukowych do analizy wybranych białek alergennych.

CEL KSZTAŁCENIA

Przekazanie wiedzy nt.: rozpoznawania białek i haptenu w żywności przez układ immunologiczny oraz typów reakcji niepożądanych na pokarm; cech typowych dla białek alergennych, zasad znakowania żywności zawierającej najczęstsze alergeny; metod detekcji alergenów i technologicznych możliwości inaktywacji/usuwania alergenów z żywności. Rozwijanie postaw służących samokształceniu. Rozwijanie świadomości odpowiedzialności za produkcję żywności hypoalergicznego i jej odpowiednie znakowanie.

OPIS EFEKTÓW KSZTAŁCENIA PRZEDMIOTU W ODNIESIENIU DO OBSZAROWYCH I KIERUNKOWYCH EFEKTÓW KSZTAŁCENIA

Symbole efektów obszarowych R2A_W04+, R2A_W05+, R2A_W06+, R2A_U01++, R2A_U06+, R2A_U07+, R2A_K05+, R2A_K06+, InzA_U05++, InzA_U08++, InzA_K01+

Symbole efektów kierunkowych K2_W12+, K2_W19+, K2_U01+, K2_U02+, K2_U12+, K2_U13+, K2_K09+

EFEKTY KSZTAŁCENIA

Wiedza

W1 - Definiuje fizjologiczne i molekularne czynniki nadwrażliwości pokarmowej (K2_W12)

W2 - Opisuje podstawowe grupy żywności alergennej i hypoalergicznego oraz zasady jej znakowania (K2_W19)

Umiejętności

U1 - Sporządza sprawozdanie lub prezentację multimedialną z informacjami nt. wybranych białek alergennych (K2_U01, K2_U02)

U2 - Przygotowuje sprawozdanie dotyczące analizy wpływu wybranych procesów technologicznych na alergenność (testy ELISA) i ekstrakcyjność białek z żywności (K2_U12)

U3 - Produkuje pieczywo bezglutenowe i ocenia jego jakość w stosunku do wyrobu standardowego (K2_U13)

Kompetencje społeczne

K1 - Ma świadomość znaczenia społecznej, zawodowej i etycznej odpowiedzialności za produkcję i właściwe znakowanie żywności zawierającej alergeny i hypoalergicznego (K2_K09)

LITERATURA PODSTAWOWA

1) J. Dziuba, Ł. Fornal (red), 2009r., "Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności", wyd. WNT Warszawa, s.1-471, 2) Ł. Fornal (red), 2007r., "Wybrane zagadnienia z zakresu alergenów nasion zbóż i roślin strączkowych", wyd. Wydawnictwo Naukowe PTTŻ, s.1-110.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

1) C. Mills, H. Wichers, K. Hoffmann-Sommergruber, 2007r., "Managing allergens in food", wyd. CRC Press, s.1-315, 2) autorzy krajowi i zagraniczni - wybór studenta, "publikacje naukowe".

Przedmiot/moduł:

ALERGENY POKARMOWE

Obszar kształcenia: nauki rolnicze, leśne i weterynaryjne

Status przedmiotu: Obligatoryjny

Grupa przedmiotów: B-przedmiot kierunkowy

Kod ECTS: 01303-20-B

Kierunek studiów: Technologia żywności i żywienie człowieka

Specjalność: Wszystkie specjalności

Profil kształcenia: Ogólnoakademicki

Forma studiów: Stacjonarne

Poziom studiów/Forma kształcenia:

Studia drugiego stopnia

Rok/semestr: I/1

Rodzaje zajęć: ćwiczenia praktyczne, wykład

Liczba godzin w semestrze/tygodniu:

Wykład: 15/2

Ćwiczenia: 15/5

Formy i metody dydaktyczne

Wykład

Wykład - Wykład informacyjny z prezentacją multimedialną (W1, W2, K1)

Ćwiczenia

Ćwiczenia praktyczne - zajęcia laboratoryjne z elementami projektowania oraz pracy z bazą internetową i seminarium (U1, U2, U3)

Forma i warunki zaliczenia

Kolokwium pisemne 1 - Kolokwium zaliczeniowe z treści wykładów (W1, W2, K1)

Sprawozdanie 1 - Ze wszystkich ćwiczeń student przygotowuje sprawozdania oceniane w skali 2-5; za sprawozdanie z ćwiczenia 3 (bazy alergenów) ocenę 5.0 można otrzymać za przygotowanie prezentacji multimedialnej (U1, U2, U3)

Liczba punktów ECTS: 2

Język wykładowy: polski

Przedmioty wprowadzające: biochemia, ogólna technologia żywności, moduły specjalnościowe

Wymagania wstępne: znajomość działania układu pokarmowego człowieka

Nazwa jednostki organizacyjnej realizującej przedmiot:

Katedra Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych

adres: pl. Cieszyński 1, pok. 223, 10-957 Olsztyn

tel./fax 523-34-66

Osoba odpowiedzialna za realizację przedmiotu:

dr hab. inż. Iwona Zofia Konopka, prof. UWM

e-mail: iwona.konopka@uwm.edu.pl

Osoby prowadzące przedmiot:

dr hab. inż. Iwona Zofia Konopka, prof. UWM, dr inż. Małgorzata Tańska

Uwagi dodatkowe:

zajęcia realizowane w grupach do 24 osób

Szczegółowy opis przyznanej punktacji ECTS - część B

ALERGENY POKARMOWE FOOD ALLERGENS

ECTS: 2

Na przyznaną liczbę punktów ECTS składają się :

1. Godziny kontaktowe z nauczycielem akademickim:

| | |
|------------------------|------------|
| - udział w wykładach | 15,0 godz. |
| - udział w ćwiczeniach | 15,0 godz. |
| | 30,0 godz. |

2. Samodzielna praca studenta:

| | |
|---|------------|
| - Przygotowanie się do dyskusji nt. znaczenia i możliwości produkcji żywności hypoalergicznej | 6,0 godz. |
| - Przygotowanie się do pisemnego sprawdzianu zaliczającego wiedzę z wykładów | 10,0 godz. |
| - Przygotowanie sprawozdania dotyczącego cech białek alergennych | 4,0 godz. |
| | 20,0 godz. |

godziny kontaktowe + samodzielna praca studenta OGÓŁEM: 50,0 godz.

liczba punktów ECTS = 50,00 godz.: 27,50 godz./ECTS = **1,82 ECTS**

w zaokrągleniu: **2 ECTS**

- w tym liczba punktów ECTS za godziny kontaktowe z bezpośrednim udziałem nauczyciela akademickiego - **1,20** punktów ECTS,

- w tym liczba punktów ECTS za godziny realizowane w formie samodzielnej pracy studenta - **0,80** punktów ECTS.

ZAGADNIENIA NA ZALICZENIE ĆWICZEŃ

1. Wyjaśnij pojęcia antygen białkowy, hapten, alergen, przeciwciało, limfocyty.
2. Wyjaśnij pojęcie nadwrażliwości pokarmowej i podaj przykłady.
3. Jakie są różnice między alergią i pseudoalergią?
4. Co to są nietolerancje pokarmowe?
5. Jakie bariery ochronne chronią jelito przed wnikaniem antygenów?
6. Co to jest alergja atopowa i tolerancja pokarmowa?
7. Jakie są drogi wnikania alergenów?
8. Czy różnorodność żywności i obecność probiotyków może wpływać na reakcje alergiczne?
9. Dlaczego małe dzieci są bardziej podatne na alergię?
10. Co to jest tzw. teoria higieniczna?
11. Co to są kompletne alergeny pokarmowe?
12. Co to są alergeny krzyżowe?
13. Czym różni się epitop liniowy od konformacyjnego?
14. Co to jest epitop funkcjonalny i jaki jest mechanizm jego wiązania z przeciwciałem?
15. Wymień podstawowe rodziny roślinnych białek alergennych.
16. Wymień podstawowe rodziny zwierzęcych białek alergennych.
17. Wymień główne metody produkcji żywności hipoalergicznej.
18. Zaproponuj schemat produkcji wybranego produktu żywnościowego, z którego należy usunąć białka z epitopami liniowymi.
19. Zaproponuj schemat produkcji wybranego produktu żywnościowego, z którego należy usunąć białka z epitopami konformacyjnymi.
20. Które enzymy są najczęściej wykorzystywane do eliminacji/ograniczania alergenów w żywności?
21. Co to są neoalergeny i panalergeny?
22. Które cechy białek zwiększają ich potencjał alergenny i dlaczego?
23. Co różni alergeny termolabilne od reomorficznych, podaj ich przykłady.
24. Jakie są zalety stosowania przeciwciał poli- lub monoklonalnych do wykrywania alergenów?
25. Jak produkuje się przeciwciała i do czego są one wykorzystywane w zakładach przemysłu żywnościowego?
26. Przedstaw schemat i zasadę wybranego testu ELISA.
27. Jakie mogą być modyfikacje testów służących do wykrycia alergenów w żywności?
28. Przedstaw zasadę i podaj 2 przykłady skrótu białka alergennego (zastosowanie naukowe).
29. Wymień składniki żywności, które należy w Polsce deklarować na opakowaniach żywności w odniesieniu do jej alergenicności (wskaż tzw. wielką 8).
30. Podaj aktualne zasady znakowania żywności alergennej i powodującej nietolerancje pokarmowe oraz konsekwencje nieprawidłowego oznakowania.

ALERGENY POKARMOWE

I rok studiów II°

WNoŻ

rok akademicki:

Wykładowca: dr hab. inż. Iwona Konopka, prof. UWM

Ćwiczenia: dr inż. Małgorzata Tańska,

Ocena końcowa: 70% z oceny zaliczenia wykładów, 20 % ocena umiejętności praktycznych (sprawozdania), 10 % ocena kompetencji

| Nazwisko i Imię | KOMPETENCJE SPOŁECZNE OBECNOŚĆ I AKTYWNOŚĆ NA ZAJĘCIACH K01 | | | | | | | UMIEJĘTNOŚCI U01+U02+U03 | | | | | WIEDZA W01+W02 | ZALICZENIE KOŃCOWE |
|------------------------|---|---|---|---------|---|---|---|-----------------------------|--------|--------------------------------|-----------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| | Ćwiczenia | | | Wykłady | | | | Sprawozdania | | Seminarium (bioinformatyka) | Inne | | Zaliczenie wykładów | |
| | W | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | metody analizy | wypiek | | Aktywność | Produkt bezglutenowy | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |

Kompetencje – 4 plusy (dost), 5 plusów (dost. plus), 6 plusów (dobry), 7 plusów (dobry +), 8 plusów (bardzo dobry), Umiejętności – ocena za każdy element składowy

INSTRUKCJA BHP

Ogólne zasady organizacji pracy laboratoryjnej oraz bezpieczne i higieniczne jej wykonanie

1. Zabrania się przebywania w laboratorium bez osobistej odzieży ochronnej. Fartuch powinien być wymiarowy i zapięty na guziki.
2. Zabrania się przechowywania w laboratorium zewnętrznej odzieży osobistej.
3. W laboratorium zabrania się spożywania jakichkolwiek posiłków i palenia tytoniu.
4. Nie tarasować dróg komunikacyjnych i przejść w laboratorium.
5. Zachowywać daleko idącą ostrożność przy korzystaniu ze źródeł prądu elektrycznego – otoczenie źródła prądu powinno być utrzymane w stanie suchym. Nie wolno włączać źródeł prądu mokrymi rękoma.
6. Przy opuszczaniu stanowiska pracy sprawdzić stan urządzeń instalacji elektrycznej, wodnej i gazowej. Zauważone usterki zgłosić laborantowi względnie asystentowi prowadzącemu zajęcia dydaktyczne.
7. Osobę pracującą w laboratorium zobowiązuje się do znajomości umiejętnego posługiwania się sprzętem przeciwpożarowym i udzielania właściwej pomocy w nagłych wypadkach.
8. Dbać o odpowiednie zabezpieczenie butli gazowych oraz instalacji doprowadzającej dany gaz. Butle gazowe mogą być magazynowane wyłącznie w miejscach specjalnie do tego celu przystosowanych.
9. Zabrania się zdejmowania osłon z części wirujących maszyn i urządzeń w czasie ich pracy.
10. Osoba prowadząca reakcję chemiczną ma obowiązek dokładnego zapoznania się ze wszystkimi teoretycznymi możliwościami jej przebiegu. Należy przedsięwziąć wszystkie środki ostrożności na wypadek niepożądanego przebiegu procesu. Jeżeli w wyniku reakcji mogą wywiązać się szkodliwe dla zdrowia pary lub gazy aparatura powinna znajdować się pod dygestorium ze sprawnie działającym wyciągiem. Należy pamiętać o obowiązku neutralizacji szkodliwych par i gazów. Ponadto należy zapoznać się z toksykologią substancji występujących w procesie i sposobach zabezpieczania przed ich działaniem – karty charakterystyki.
11. Stałe substancje chemiczne i płyny powinny być przechowywane we właściwych naczyniach (szczelne korki i właściwe oznakowanie na naczyniu) .
12. Wymaga się przestrzegania ładunku i czystości na stanowisku pracy.
13. Nie pozostawiać rozlanych, względnie rozsypanych substancji chemicznych.
14. Do prac eksperymentalnych wymagających wysokiej temperatury należy bezwzględnie używać grubościennych, okrągłodennych kolb, nie wolno używać naczyń o niejednakowej grubości ścian, naczyń ze szkła lanego oraz naczyń posiadających kanty i załamania.
15. W miarę możliwości należy unikać stosowania stężonych kwasów względnie alkaliów, a jeżeli zachodzi konieczność ich używania należy bezwzględnie stosować okulary ochronne.
16. Roztworów **nie wolno** wciągać do pipety ustami (szczególnie trujących lub żrących).
17. Pobieranie gazów z butli może odbywać się wyłącznie za pomocą przewodu specjalnie przystosowanego do danego gazu.

Wskazówki pierwszej pomocy w niektórych wypadkach

Telefony alarmowe
Pogotowie ratunkowe - 999
Straż Pożarna - 998

1. Urazy oczu

W razie prysnięcia do oka kwasów, ługów itp. wskazania pierwszej pomocy są następujące:

- rozdzielić kciukiem i palcem wskazującym kurczowo zaciśnięte powieki,
- przepłukać oko dużą ilością czystej letniej wody (strumień wody w kierunku od nosa do skroni),
- nałożyć opatrunek ochronny na oczy (również na zdrowe oko, jeżeli zapryskane jest tylko jedno oko),
- natychmiast skierować chorego do lekarza okulisty.

W razie zranienia gałki ocznej odłamkami szkła

- założyć na oko wyjałowiony opatrunek osobisty,
- natychmiast skierować chorego do lekarza okulisty.

Uwaga!

Gdy obce ciało tkwi w oku pod powieką górną lub dolną można je przed założeniem opatrunku ostrożnie wyjąć brzeżkiem zwilżonej czystej chustki lub zwilżonym wacikiem.

2. Skaleczenia

W przypadku skaleczeń wskazania pierwszej pomocy są następujące:

- rany nie dotykać palcami,
- nie oczyszczać rany, nie myć jej wodą ani żadnym płynem odkażającym,
- nie usuwać z rany skrzepów krwi ani ciał obcych,
- nie kłaść na ranę bezpośrednio waty, ligniny ani używanej chusteczki higienicznej,
- założyć suchy, jałowy opatrunek (apteczka znajduje się na sali ćwiczeń)
- skierować chorego do szpitala pełniącego dyżur.

Uwaga!

W przypadku drobnych zranień wystarczy przemyć rany 3% wodą utlenioną i przyklejenie „Prestoplastu”. Nigdy nie nakładać na zranione miejsce samego przylepca bez gazy.

3. Oparzenia termiczne

W przypadku oparzeń termicznych należy:

- rozebrać poparzonego w celu odsłonięcia części oparzonych. Z poparzonych palców należy koniecznie zdjąć obrączki lub pierścionki,
- poparzone miejsca schładzać przez 15 min. strumieniem zimnej wody,
- w razie rozległych oparzeń lub zerwania pęcherzy, natychmiast wezwać lekarza względnie odstawić chorego do szpitala,
- osobę płonąca w razie braku natrysku przewrócić i zdusić na nim ogień kocem – nie wolno pozwolić płonącemu biegać – natychmiast wezwać lekarza,
- przy silnych bólach podać środki przeciwbólowe.

4. Oparzenia chemiczne

Przy oparzeniach substancjami żrącymi miejsce oblane należy niezwłocznie obficie splukiwać niezbyt silnym strumieniem wody. Następnie założyć jałowy opatrunek i skierować chorego do lekarza.

5. Zatrucia

W przypadku zatrucia należy:

- *usunąć zatrutego ze strefy skażonej,*
- *w przypadku obłania zatrutego trucizną (fenol, anilina itp.) należy natychmiast zdjąć odzież zalaną trucizną i splukać truciznę z powierzchni ciała,*
- *jeżeli to konieczne stosować sztuczne oddychania lub podawać tlen,*
- *wezwać lekarza,*
- *przy zatruciach substancjami powodującymi objawy z tzw. okresem utajenia (tlenki azotu, siarczan dimetylu, anilina, nitrobenzen itp.) nie wolno dopuścić do żadnego wysiłku fizycznego u chorego, nawet jeżeli pozornie czuje się dobrze.*

6. Porażenie prądem elektrycznym

W przypadku porażenia prądem elektrycznym należy:

- *odciąć porażonego od źródła napięcia (obowiązuje izolacja rąk osoby niosącej pomoc),*
- *w razie stwierdzenia, że poszkodowany nie oddycha, zastosować sztuczne oddychanie i nie przerywać go dopóty, dopóki nie wystąpią oznaki samodzielnego oddychania lub wyraźne oznaki śmierci (plamy pośmiertne),*
- *natychmiast wezwać lekarza.*

wzór oświadczenia

Olsztyn, dn.

Oświadczenia studentów

| Lp. | Imię i nazwisko, grupa | Poznane metody | Umiejętność obsługi | Odpowiedzialność za | Podpis |
|------------|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------|
| 1. | | | | | |
| 2. | | | | | |
| 3. | | | | | |
| 4. | | | | | |
| 5. | | | | | |
| 6. | | | | | |

| L.p. | Osoby wykonujące ćwiczenie | | | | | Data |
|------|----------------------------|----------|--------------------------|-----|-------|------|
| | Imię i Nazwisko | Kierunek | Rodzaj studiów - Stopień | Rok | Grupa | |
| 1. | | | | | | |
| 2. | | | | | | |
| 3. | | | | | | |
| 4. | | | | | | |

SPRAWOZDANIE Z ĆWICZENIA NR

1. Temat ćwiczenia:

2. Cel ćwiczenia:

3. Materiał do badań:

4. Zadania do wykonania:

a)

b)

.....

5. Obliczenia:

Przykładowe obliczenia

6. Zestawienie wyników:

| Wyróżnik | Jednostka | Wyniki | | | |
|----------|-----------|--------|----|-----------|-----------|
| | | X1 | X2 | \bar{x} | \hat{s} |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

7. Wnioski:

Przedmiot omawia rodzaje nadwrażliwości pokarmowej, zapoznaje z różnicami pomiędzy alergią i nietolerancją pokarmową, podaje dane statystyczne na temat częstotliwości tych chorób oraz wiedzę na temat ich przyczyn (podłoże genetyczne) i skutków fizjologicznych. Pozwala na poznanie grup i/lub produktów żywnościowych, które są uznawane za potencjalnie najbardziej alergenne. Opisuje typy reakcji alergicznych, rodzaje przeciwciał i mechanizm ich wiązania z antygenami. Omawia również budowę epitopów i możliwości technologiczne zmierzające do zmian ich sekwencji i/lub konformacji. Prezentuje również aspekty metodologii badań alergenów oraz detekcji uczuleń. Treści wykładów oraz ćwiczeń oparte są głównie na wiedzy dotyczącej białek roślinnych, głównie glutenowych.

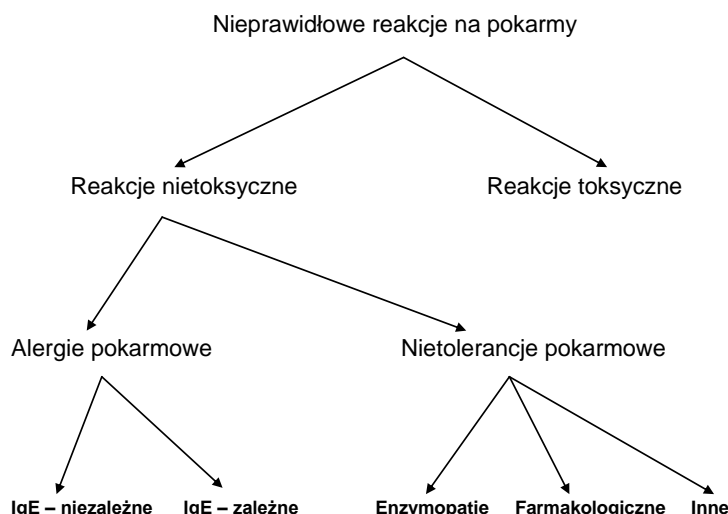
Wstęp

Alergia to patologiczna, odmienna reakcja tkanek na alergen, polegająca na reakcji immunologicznej związanej z powstaniem przeciwciał, które po związaniu z antygenem doprowadzają do uwolnienia różnych substancji - mediatorów stanu zapalnego (Brostoff i Gamlin, 1994). Może mieć zarówno postać łagodną, jak w przypadku kataru czy łzawienia, jak również bardzo niebezpieczną zagrażającą życiu (wstrząs anafilaktyczny), której niektóre przypadki kończą się nawet śmiercią (Gajewska 2002).

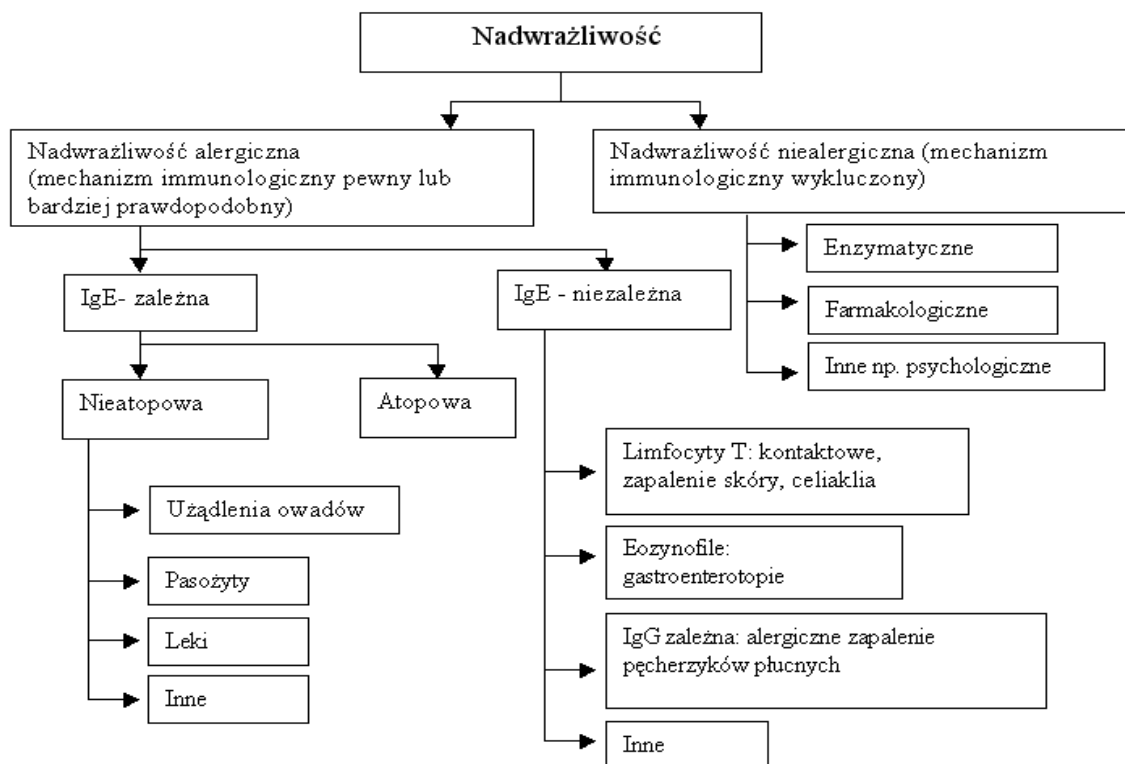
W alergii pokarmowej organizm mylnie wytwarza przeciwciała IgE odpowiadając na niewinny antygen w rodzaju cząsteczki pokarmu. Przeciwciała IgE znajdują się zazwyczaj na powierzchni specjalnych komórek odpornościowych zwanych komórkami tucznyymi, które występują w tkankach całego organizmu (Brostoff i Gamlin, 1994). Jeżeli cząsteczki IgE na powierzchni komórki tucznej złączą się ze specyficznym antygenem, pobudzają one komórkę tuczną do uwolnienia chemicznych mediatorów reakcji alergicznej. W normalnych warunkach te związki chemiczne organizują bardziej efektywną reakcję odpornościową, ale przy zbyt dużej ilości mogą wywołać szkodliwe objawy alergii. Istnieje pięć podstawowych typów przeciwciał, określanych jako izotypy. Ich nazwy to: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. We wszystkich przypadkach Ig oznacza immunoglobinę (przeciwciało) (Brostoff i

Gamlin, 1994). Wytwarzane przez organizm przeciwciała to cząsteczka białka, które pomagają w walce z chorobami spowodowanymi przez bakterie i wirusy. Przeciwciała to wiążą się ze specyficznym ciałem, jego antygenem. Jest to zwykle substancja chemiczna ulokowana na wirusie lub bakterii, w taki sposób, że w ostateczności przeciwciała wiążą się z „najeźdźcą”. Związane przeciwciała pobudzają komórki obronne organizmu (komórki odpornościowe) do zaatakowania mikroorganizmów (Brostoff i Gamlin, 1994). Immunoglobulina E lub inne przeciwciała występują więc w roli negatywnego bohatera (Jędrychowski, 2001).

Alergie pokarmową klasyfikuje się do grupy nieprawidłowych reakcji na pokarm. Jednolita klasyfikacja nieprawidłowych reakcji na pokarm została wprowadzona w 1995 r. przez Europejską Akademię Alergologii i Immunologii Klinicznej (EAACI) (rys. 1).



Rys. 1. Schemat podziału nieprawidłowych reakcji na pokarm (Czernecki i Targoński, 2002) (Jędrychowski, 2001), (Gajewska, 2002).



Rys. 2. Schemat klasyfikacji nadwrażliwości pokarmowych

Nowszy system klasyfikacji nadwrażliwości pokarmowej został wprowadzony przez Europejską Akademię Alergologii i Immunologii Klinicznej w 2002 r. (rys.2) (Wróblewska, 2008).

Pojęcie **nadwrażliwości pokarmowej** jest używane wymiennie z alergią pokarmową, nietolerancją pokarmową i innymi niepożądanymi reakcjami na pokarm, poza wypadkami, gdy ich przyczynami są zaburzenia czysto psychologiczne (Czernecki i Targoński, 2002). Jeżeli okaże się, że trudno jest czasami odróżnić alergię od nietolerancji, należy wtedy posługiwać się terminem obejmującym oba wymienione poprzednio.

Nietolerancja pokarmowa jest niepożądaną reakcją organizmu na spożyty pokarm, w której włączenie systemu immunologicznego nie jest udowodnione, ponieważ test skórny i inne testy wypadają negatywnie. Nie wyklucza to możliwości jakiegoś udziału reakcji immunologicznych, ale raczej nie stanowią one głównej przyczyny wywoływanych objawów.

Odróżnienie nietolerancji pokarmowej od alergii na podstawie objawów klinicznych może być trudne ponieważ mogą występować podobne objawy kliniczne

po spożyciu pokarmu (Czernecki i Targoński, 2002). Należy również zwrócić uwagę, iż ten sam pokarm może równocześnie zawierać np. związki farmakoaktywne i alergeny. Podstawowe czynniki wywołujące nietolerancje pokarmowe to głównie enzymopatie, czynniki farmakologiczne oraz inne czynniki takie jak nietolerancja pokarmowa na tle psychicznym. Przykładem enzymopatii jest brak lub niedobór laktazy (5-galaktozydazy), co w konsekwencji prowadzi do nietolerancji mleka (Czernecki i Targoński, 2002) oraz brak lub niedobór specyficznych proteinaz prolinowych w chorobie zwanej celiakią (Konopka i in., 2008). Czynnikiem farmakologicznym powodującym nietolerancję pokarmu może być np. tyramina, która jest obecna w serze pleśniowym, histamina w rybach i kofeina w kawie. Nietolerancję pokarmową na tle psychicznym powodują najczęściej nerwice, psychozy, wstręt, odraza (Jędrychowski, 2001).

Pozorna alergia pokarmowa oznacza specyficzny typ reakcji nieimmunologicznej, która ma miejsce w przypadku określonych pokarmów, kiedy znajdująca się w nich substancja atakuje **bezpośrednio** komórki tuczne. Reakcja ta nie jest charakterystyczna dla alergii, ponieważ system odpornościowy nie zawodzi, a organizm nie wytwarza IgE w nadmiarze. Jednak końcowy efekt (komórki tuczne uwalniają mediatory chemiczne) jest taki sam, a zatem objawy są takie, jak w alergii pokarmowej (Brostoff i Gamlin, 1994).

Awersja pokarmowa oznacza wstręt i unikanie pewnych pokarmów z przyczyn czysto psychologicznych (Brostoff i Gamlin, 1994).

Alergeny pokarmowe są to białka normalnie występujące w żywności. Są dobrze rozpuszczalne w wodzie, kwaso- i termostabilne (Czernecki i Targoński, 2002). Nie poddają się procesom trawienia w przewodzie pokarmowym, a także w małym stopniu ulegają działaniu procesów termicznych stosowanych w przetwórstwie żywności (Pełczyńska, 1995).

Alergeny pokarmowe nie mają określonej rodzajowo budowy chemicznej i strukturalnej, która mogłaby jednoznacznie wskazywać na ich właściwości alergenne. Większość alergenów pokarmowych ma masę cząsteczkową od 10 do 40 kDa. Spotykane są także reakcje alergiczne wywoływane przez cząsteczki o masie mniejszej tj. 3 kDa i większej (do 100 kDa). Wielkość cząsteczek alergenu wiąże się ściśle ze zdolnością przenikania przez błonę śluzową i jego immunogennością (Czernecki i Targoński, 2002). Środek spożywczy może zawierać kilka alergenów, z czego jeden lub dwa to alergeny silniejsze, a pozostałe to alergeny słabsze (Pełczyńska, 1995).

Niektóre spośród alergenów uczulają organizm, jednak nie wywołują żadnych symptomów alergii, inne natomiast pomimo zdolności wiązania IgE nie powodują degranulacji komórek tucznych. Czasem alergeny pokarmowe mogą wywoływać objawy alergii w specyficznych warunkach, np. gdy uczulający pokarm spożywany jest: z innym pokarmem, w okresie pylenia roślin, w obecności dodatkowych bodźców, jak: ciepło, zimno, podczas wysiłku fizycznego, stresu (Brostoff i Gamlin, 1994). Większość alergenów, które znajdują się w produktach spożywczych występuje w dużych ilościach tj. od kilku do 80%. Obecnie zidentyfikowano ponad 170 produktów spożywczych powodujących alergię pokarmową ze skutkiem natychmiastowym (Czernecki i Targoński, 2002).

EPITOP to region cząsteczki ściśle określony przestrzennie, bezpośrednio kompleksujący z paratopem - miejscem wiążącym antygen, obecnym na cząsteczce przeciwciała [Lisowska, 1992]. W obrębie pojedynczego antygeny – tzw. antygeny poliwalentnego lub wielowartościowego, może występować wiele epitopów, które są identyczne lub różne. Antygeny białkowe mają epitopy o budowie (Brett i in., 1999; Czernecki i Targoński, 2002; <http://www.zgapa.pl/zgapedia/Epitop.html>):

- liniowej - sekwencja aminokwasów,
- nakładającej się - aminokwasy jednego epitopu są częścią składową innych epitopów,
- przestrzennej - konformacyjnej (aminokwasy epitopu sąsiadują ze sobą w strukturze przestrzennej, należą do różnych łańcuchów polipeptydowych lub tego samego łańcucha, lecz nie są ułożone liniowo).

U większości naturalnych alergenów najczęściej występują epitopy konformacyjne [Brett i in., 1999; Lisowska, 1992]. Dużą niedogodnością jest podobieństwo strukturalne i konformacyjne epitopów w białkach pochodzących z różnych źródeł, a co za tym idzie reakcje krzyżowe pomiędzy produktami spożywczymi oraz pomiędzy alergenami powietrzno-pochodnymi i pokarmowymi czy kontaktowymi [Jędrychowski, 2005]. Wśród epitopów znajdujących się w cząsteczce alergenu występują takie, które nie mają identycznej zdolności do indukowania odpowiedzi immunologicznej. Można wyróżnić spośród nich epitopy immunodominacyjne – to właśnie przeciw nim w znacznym stopniu skierowana jest powstająca odpowiedź immunologiczna [Czernecki i Targoński, 2002].

KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA BUDOWY BIAŁEK

przygotowano na podstawie artykułu M. Cieplak i A. Sienkiewicz pt. „**Białka**” [Encyklopedia Fizyki Współczesnej, Wydawnictwo PWN SA, Warszawa 2004] <http://www.pwn.pl> lub <http://aneksy.pwn.pl/efw/>

Z chemicznego punktu widzenia białka są cząsteczkami o różnorodnej i skomplikowanej budowie, lecz o podobnym składzie chemicznym. Składają się przede wszystkim z węgla (50-55%), tlenu (20-30%), azotu (14-18%), wodoru (6-7%) i siarki (do 2%). Niektóre białka zawierają również bardzo małe ilości innych pierwiastków, takich jak fosfor, wapń, żelazo, miedź, cynk, mangan, molibden i magnez.

Aminokwasy, podstawowe elementy struktur białkowych, są pochodnymi kwasów karboksylowych, w których atom wodoru w łańcuchu alifatycznym kwasu został zastąpiony przez grupę aminową. Aminokwasy są białymi krystalicznymi ciałami rozpuszczalnymi w wodzie, ale nierozpuszczalnymi w alkoholu. Wszystkie aminokwasy występujące w białkach ludzkich i zwierzęcych zawierają przynajmniej jedną grupę aminową (-NH₂) i jedną grupę karboksylową (-COOH). Obie grupy dołączone są do tego samego atomu węgla zwanego atomem węgla α i oznaczanym jako węgiel Cα. Dlatego też aminokwasy te noszą nazwę α-aminokwasów. W pozostałych dwóch wiązaniach węgla Cα uczestniczą atom wodoru (H) i łańcuch boczny R, który jest inny dla każdego α-aminokwasu i decyduje o jego właściwościach. Wszystkie wiązania tworzone przez węgiel Cα mają charakter wiązań kowalencyjnych. W organizmach żywych aminokwasy występują w tzw. konfiguracji L, w której grupy karboksylowa, łańcuch boczny i grupa aminowa rozmieszczone są zgodnie z ruchem wskazówek zegara.

W środowisku obojętnym (pH = 7) aminokwasy występują w formie jonów obojnaczych, tzn. posiadają biegun dodatni i ujemny. W tej formie grupa aminowa przyłącza dodatkowy jon wodoru tworząc grupę - NH₃⁺, zaś grupa karboksylowa oddysocjowuje jon wodoru tworząc grupę - COO⁻. W środowisku kwaśnym tworzy się jon dodatni aminokwasu: grupa karboksylowa pozostaje niezjonizowana, zaś grupa aminowa występuje w postaci zjonizowanej - NH₃⁺. Natomiast w środowisku o charakterze zasadowym powstaje jon ujemny: (grupa aminowa pozostaje niezjonizowana, zaś grupa karboksylowa występuje w postaci zjonizowanej - COO⁻). Punkt izoelektryczny odpowiada takiej wartości pH, przy której wypadkowy ładunek aminokwasu jest równy zero.

Każdy aminokwas pełni w białku jakąś rolę. Dwa aminokwasy: glicyna i prolina często określają charakter struktury natywnej białka. Glicyna jest bowiem

najmniejszym aminokwasem (jej łańcuch boczny to po prostu atom wodoru) i znaleźć ją można w elementach łączących typowe podstruktury białka (tzw. struktury drugorzędowe). Prolina jest w istocie nie aminokwasem, a cyklicznym iminokwasem (jedyne taki wyjątek wśród „aminokwasów”), gdyż zawiera niearomatyczny sztywny pierścień, do którego należy węgiel Ca. Pierścień ten trudno upakować i dlatego prolina często kończy lub zakrzywia struktury drugorzędowe. Największy aminokwas to tryptofan, który jest jednym z trzech aminokwasów zawierających pierścień aromatyczny. Pozostałe dwa to fenyloalanina i tyrozyna, ale tylko tryptofan w znaczący sposób absorbuje światło, o długości fali 280 nm, co z kolei prowadzi do fluorescencji. Badanie fluorescencji tryptofanu jest jedną z podstawowych metod pozwalających wnioskować o konformacji białka, gdyż fluorescencja jest silna, gdy tryptofan jest eksponowany (znajduje się na powierzchni cząsteczki białka), a słaba, gdy jest ściśle otoczony przez inne aminokwasy, a więc w stanie zwiniętym.

Najważniejszą cechą charakterystyczną białka globularnego jest to, że w typowym dla komórki środowisku roztworu wodnego o odczynie niemal obojętnym (pH ~ 7) i w zakresie temperatur pokojowych (od 20 do 40°C) zwijają się one do jednej zwartej konformacji – stanu natywnego. W warunkach nefizjologicznych, takich jak roztwory wodne o odczynie zasadowym (pH > 7) lub kwaśnym (pH < 7), w roztworach niewodnych, czy w podwyższonej temperaturze, białka rozwijają się do konformacji otwartych (zdenaturowanych). Jednak w warunkach fizjologicznych stan natywny jest bardziej stabilny niż jakakolwiek konformacja zdenaturowana.

Oddziaływania między aminokwasami w białku

Fizyczną przyczyną zwijania się białek do postaci globularnej jest istnienie wzajemnych oddziaływań między aminokwasami oraz oddziaływań aminokwasowych łańcuchów bocznych z cząsteczkami rozpuszczalnika (wody). W wypadku białek są to złożone oddziaływania, w których dominuje charakter przyciągający. Najsilniejsze wiązania w białku to wiązania kowalencyjne. Są to przede wszystkim wiązania peptydowe, które cementują aminokwasy ze sobą, ale nie ustalają struktur drugorzędowej i trzeciorzędowej białka. Wiązania kowalencyjne mogą się jednak pojawiać także w innych miejscach niż łańcuch polipeptydowy – w tzw. kontaktach. Mówimy, że aminokwasy tworzą ze sobą kontakt, jeśli są blisko siebie w przestrzeni, ale nie są swymi sąsiadami wzdłuż łańcucha. Oddziaływania kowalencyjne mogą się w kontakcie pojawić, ale tylko wtedy, gdy kontakt tworzą

dwie cysteiny. Łańcuch boczny cysteiny kończy się grupą tiolową –SH. Dwie grupy tiolowe mogą łączyć się ze sobą tworząc tzw. mostek dwusiarczkowy. Jednak cysteina jest jednym z najrzadziej występujących aminokwasów i stąd obecność mostków dwusiarczkowych może co najwyżej tylko wspomagać zwijanie się białek. Oddziaływania elektrostatyczne między naładowanymi aminokwasami są o rząd wielkości słabsze od wiązań kowalencyjnych. Mają one charakter zarówno przyciągający jak i odpychający w zależności od rodzaju aminokwasów. Oddziaływania tego typu nie mogą więc być samodzielnie odpowiedzialne za zwijanie, tym bardziej, że dotyczą one, w warunkach fizjologicznych, tylko pięciu polarnych aminokwasów. Oddziaływania te wnoszą jednak swój wkład do zmian konformacji cząsteczki białka przy zmienianiu wartości pH. Są one bowiem długozasięgowe, a efektywny potencjał oddziaływania elektrostatycznego zależy od pH.

Jedną z kluczowych sił odpowiedzialną za zwijanie się białek są wiązania wodorowe, dla których energia wiązań jest średnio 20 razy mniejsza od energii wiązań peptydowych. Istnieją dwa składniki oddziaływań wodorowych. Pierwszy to przesuwanie się gęstości chmury elektronowej z atomu o mniejszym ładunku jądra atomowego, np. wodoru, w stronę cięższego atomu, o większym ładunku jądra, np. tlenu. Prowadzi to do zaistnienia wypadkowego efektywnego ułamkowego ładunku (dodatniego na atomie wodoru). Drugi składnik to oddziaływanie elektrostatyczne pomiędzy takimi efektywnymi ładunkami.

Aminokwasy hydrofobowe to takie, które wody unikają. Fragmenty hydrofobowe nie tworzą wiązań wodorowych z cząsteczkami wody, ale w pobliżu takiego segmentu/obszaru same cząsteczki wody wykazują tendencję do porządkowania swych orientacji poprzez wzajemne oddziaływania wodorowe. Zjawisko to redukuje entropię układu. Fragmenty hydrofobowe mają tendencję do unikania cząsteczek wody, gdyż w ten sposób maksymalizowana jest objętość obszaru o skorelowanych orientacjach cząsteczek wody. Można to opisać jako wystąpienie efektywnego wzajemnego przyciągania między aminokwasami hydrofobowymi. Przyciąganie to nosi nazwę oddziaływania hydrofobowego i stanowi najsilniejszy mechanizm odpowiedzialny za konformację białka.

Istnieją jednak i inne oddziaływania, na przykład polaryzacyjne typu van der Waalsa (100 razy słabsze od wiązań peptydowych). W poniższej tabeli przedstawiono typowe wartości energii wiązań międzyatomowych występujących w białkach począwszy od najsilniejszych, jakimi są wiązania kowalencyjne, przez jonowe i wodorowe, aż do najsłabszych – wiązań van der Waalsa.

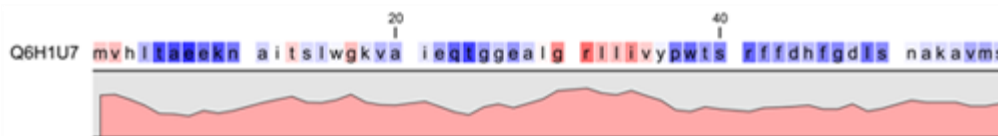
Typowe energie wiązań międzyatomowych w białkach

| Rodzaj wiązania | Energia [kcal/mol] |
|-----------------|--------------------|
| Kowalencyjne | 70 - 100 |
| Jonowe | 10 |
| Wodorowe | 4 - 5 |
| Van der Waalsa | 1 - 2 |

Współzawodnictwo pomiędzy energią oddziaływania wiązań wodorowych we wnętrzu białka i entropią faworyzującą stan rozwinięty prowadzi do delikatnej równowagi, w której lekko przeważa energia stanu zwiniętego (o około 40 kJ/mol). Ten niewielki margines stabilności jest także warunkiem spełniania funkcji biologicznych przez białka, gdyż ich własności katalityczne wiążą się często ze zmianami konformacyjnymi. Ponadto mała stabilność termodynamiczna białek (podatność na denaturację) ułatwia ich rozkład i wymianę w procesach metabolicznych zachodzących w komórkach.

HYDROFOBOWOŚĆ BIAŁKA

Hydrofobowość białka warunkuje wiele ich właściwości: np. rozpuszczalność, obecność obszarów antygenowych, powinowactwo do membran, itp. Przykładowe regiony o zróżnicowanej hydrofobowości przedstawiono na poniższym rysunku.



Rys. 3. Zmiany hydrofobowości białka wzdłuż jego sekwencji.

Czerwony kolor wskazuje na wysoką hydrofobowość, niebieski na niską.

Skale hydrofobowości

Kyte-Doolittle \szeroko używana\ - w jej opisie regiony białek o wartości dodatniej są hydrofobowe. Może być wykorzystywana do identyfikacji powierzchniowych regionów hydrofobowych, jak i tzw. „transmembrane regions” w zależności od analizowanej wielkości „okien”. Tzw. „window size” jest ilością reszt aminokwasowych, która będzie analizowana. Krótkie okna (5-7 reszt aminokwasowych) pozwalają na obliczenie hydrofobowości powierzchniowej, dłuższe (19-21 reszt) na identyfikację domen o powinowactwie do membran. Każdy aminokwas ma przypisaną hydrofobowość od 4.6 (najbardziej hydrofobowy) do -4.6 (najbardziej hydrofilowy).

Tzw. „GRAVY score” jest uśrednioną hydropatią całego białka (Kyte, Doolittle 1982). Białka transmembranowe zwykle mają wyższy wynik „GRAVY score” niż globularne.

Inne skale m.in. Engelman’a (znana jako skala GES), Cornette’a, Rose’a, Janin’a (mówi o dostępnych, bądź ukrytych resztach aminokwasów w białkach globularnych), Eisenberga i Hopp-Woods’a (służy do identyfikacji regionów potencjalnie antygenowych. Ta skala pokazuje w zasadzie indeks hydrofilowości, gdzie niepolarnym resztom przypisano ładunki ujemne).

Tabela 1. Hydrofobowości aminokwasów wg różnych skal.

| aa | Aa | Kyte-Doolittle | Hopp-Woods | Cornette | Eisenberg | Rose | Janin | Engelman (GES) |
|----|---------------|----------------|------------|----------|-----------|------|-------|----------------|
| A | Alanine | 1.80 | -0.50 | 0.20 | 0.62 | 0.74 | 0.30 | 1.60 |
| C | Cysteine | 2.50 | -1.00 | 4.10 | 0.29 | 0.91 | 0.90 | 2.00 |
| D | Aspartic acid | -3.50 | 3.00 | -3.10 | -0.90 | 0.62 | -0.60 | -9.20 |
| E | Glutamic acid | -3.50 | 3.00 | -1.80 | -0.74 | 0.62 | -0.70 | -8.20 |
| F | Phenylalanine | 2.80 | -2.50 | 4.40 | 1.19 | 0.88 | 0.50 | 3.70 |
| G | Glycine | -0.40 | 0.00 | 0.00 | 0.48 | 0.72 | 0.30 | 1.00 |
| H | Histidine | -3.20 | -0.50 | 0.50 | -0.40 | 0.78 | -0.10 | -3.00 |
| I | Isoleucine | 4.50 | -1.80 | 4.80 | 1.38 | 0.88 | 0.70 | 3.10 |
| K | Lysine | -3.90 | 3.00 | -3.10 | -1.50 | 0.52 | -1.80 | -8.80 |
| L | Leucine | 3.80 | -1.80 | 5.70 | 1.06 | 0.85 | 0.50 | 2.80 |
| M | Methionine | 1.90 | -1.30 | 4.20 | 0.64 | 0.85 | 0.40 | 3.40 |
| N | Asparagine | -3.50 | 0.20 | -0.50 | -0.78 | 0.63 | -0.50 | -4.80 |
| P | Proline | -1.60 | 0.00 | -2.20 | 0.12 | 0.64 | -0.30 | -0.20 |
| Q | Glutamine | -3.50 | 0.20 | -2.80 | -0.85 | 0.62 | -0.70 | -4.10 |
| R | Arginine | -4.50 | 3.00 | 1.40 | -2.53 | 0.64 | -1.40 | -12.3 |
| S | Serine | -0.80 | 0.30 | -0.50 | -0.18 | 0.66 | -0.10 | 0.60 |
| T | Threonine | -0.70 | -0.40 | -1.90 | -0.05 | 0.70 | -0.20 | 1.20 |
| V | Valine | 4.20 | -1.50 | 4.70 | 1.08 | 0.86 | 0.60 | 2.60 |
| W | Tryptophan | -0.90 | -3.40 | 1.00 | 0.81 | 0.85 | 0.30 | 1.90 |
| Y | Tyrosine | -1.30 | -2.30 | 3.20 | 0.26 | 0.76 | -0.40 | -0.70 |

Bazy danych o białkach

Znajomość trójwymiarowej struktury trzeciorzędowej białka jest kluczowa dla zrozumienia jego funkcji biologicznej. Określenie sekwencji w białku jest obecnie zadaniem rutynowym, natomiast określenie struktury jest dużo trudniejsze. W 1992 roku znano strukturę atomową około 400 białek, a 10 lat później – ponad 14500.

Struktury białek deponowane są w komputerowych bazach danych. Istnieją niepubliczne i publicznie dostępne bazy danych. Te pierwsze prowadzone są na ogół przez firmy farmaceutyczne. Przykłady tych drugich to internetowe bazy danych o nazwie Protein Data Bank (PDB), Swiss-Prot/TrEMBL oraz BIOPEP (osiągnięcie zespołu p. prof. J. Dziuby).

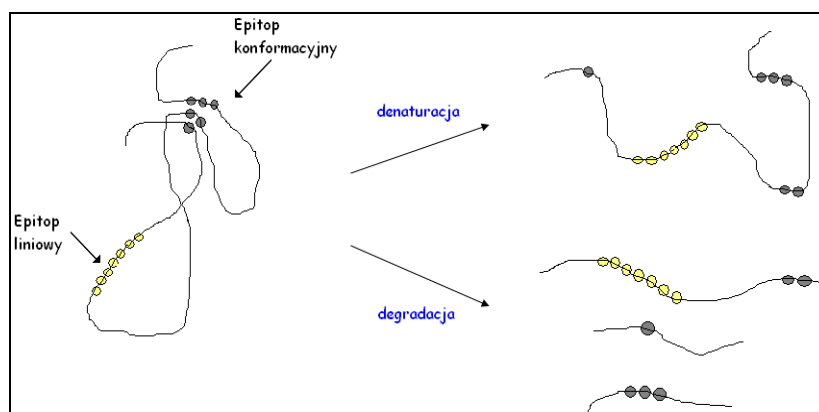
Przewidywanie struktury białka

Zrozumienie i przewidzenie sposobu zwinienia się białka na podstawie sekwencji aminokwasów stanowi jeden z najtrudniejszych i najważniejszych problemów współczesnej obliczeniowej biologii molekularnej. Istniejące metody przewidywania struktury można podzielić na dwie klasy. Pierwsza to metody oparte na porównywaniu sekwencji o nieznaną strukturę z biblioteką wzorców zbudowanych na podstawie struktur znanych. Druga to metody *ab initio*, których celem jest określenie struktury natywnej poprzez szukanie globalnego minimum energetycznego w przestrzeni konformacyjnej. Metody *ab initio* są szczególnie pożądane w sytuacji, gdy badana sekwencja ma niski stopień podobieństwa z sekwencjami o poznanych strukturach. Wbrew swej nazwie, większość metod *ab initio* korzysta z informacji uzyskanych z białkowych baz danych. Skuteczność metod przewidywania struktury testuje się co dwa lata w konkursie zwanym CASP (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction; adres: www.predictioncenter.llnl.gov), zorganizowanym po raz pierwszy w 1994 r. w University of Maryland. Konkurs ten polega na porównaniu wyników niezależnie prowadzonych prac doświadczalnych i teoretycznych nad tym samym zbiorem sekwencji (np. nad około 100-aminokwasowymi fragmentami białek).

TECHNOLOGICZNE METODY ELIMINOWANIA ALERGENÓW

Analiza epitopów białkowych daje możliwość ustalenia zależności między immunogennością i strukturą, a także na podstawie znajomości pierwszorzędowej i przestrzennej budowy antygeny białkowego umożliwia przewidywanie immunogenności jego określonych obszarów [Lisowska, 1992].

Zniszczenie przestrzennych epitopów lub tworzenie się nowych, uwidacznianie się ukrytych determinant, przejawiające się w zmianach właściwości immunogennych alergenów, spowodowane jest odkształceniem lub zniszczeniem (np. ogrzewanie, denaturacja, przyłączanie haptenu) struktury przestrzennej cząsteczki alergenu białkowego. Epitopy liniowe również mogą ulegać zmianom w wyniku fragmentacji łańcucha polipeptydowego [Czernecki i Targoński, 2002; <http://pl.wikipedia.org/wiki/Epitop>]



Rys. 4. Epitopy liniowe i konformacyjne [Lisowska, 1992; http://www.alergia.org.pl/lekarze/archiwum/03_02/2003_020902.gif]

Większość silnych alergenów jest odporna na czynniki niszczące, zmieniające budowę epitopów, takie jak: niskie pH soku żołądkowego, enzymy trawienne, temperatura. Podczas procesów technologicznych otrzymywania produktów spożywczych, składniki żywności ulegają różnorodnym przemianom. Deformacje immunoreaktywnych epitopów mogą wpływać na właściwości alergenne białek. Procesy technologiczne mogą zniszczyć występujące w białku epitopy, mogą utworzyć nowe struktury alergogenne, ale także mogą nie powodować żadnych reakcji. Przetwarzanie umożliwia maskowanie lub odkrywanie zamaskowanych epitopów alergennych, co w rezultacie może odpowiednio zmniejszać lub zwiększać możliwość rozpoznania alergenów, a więc potencjalnie może zmieniać zdolność do wywoływania alergii przez szkodliwą żywność [Sathe i in., 2005; Czernecki i Targoński, 2002].

Eliminowanie immunoreaktywności w żywności może być rozpatrywane w aspekcie ilościowym – obniżenie zawartości lub eliminacja białek wykazujących właściwości alergenne lub jakościowym – zmiana konformacji określonych białek pomagająca w ich trawieniu [Konopka i in., 2008]. Epitopy liniowe są bardziej podatne na zniszczenia spowodowane procesami przetwarzania, niż epitopy konformacyjne tego samego alergenu. Epitopy konformacyjne mogą ulec deformacji po hydrolizie. W innym wypadku mogą być modyfikowane chemicznie podczas przetwarzania lub celowo zmieniane przez wprowadzanie mutacji przy pomocy inżynierii genetycznej [Lisowska, 1992].

Obniżenie lub usunięcie alergenicności białek zawartych w surowcach spożywczych można osiągnąć stosując różne metody [Czernecki i Targoński, 2002; Konopka i in., 2008]:

- *chemiczne* (np. hydroliza, polimeryzacja, estryfikacja),
- *fizyczne* (np. procesy termiczne, wysokie ciśnienie, mikrofałe, ultradźwięki),
- *biotechnologiczne*,
- *metody inżynierii genetycznej*.

Według Sathe i in. [2005] procesy technologiczne zmierzające do redukcji czy też wyeliminowania alergenicności żywności można generalnie podzielić na procesy termiczne i nietermiczne.

Procesy termiczne

Pod wpływem wysokiej temperatury możliwa jest zmiana konformacji bądź całkowity rozkład alergenu. Niestety duża ilość alergenów jest termostabilna i termolabilna [Mills i in., 2003]. Termostabilne są białka zapasowe ziarna – prolaminy i globuliny, a także LTP – białka transportujące lipidy, do ich rozkładu wymagana jest temperatura powyżej 75°C. Natomiast, do termolabilnych należą alergeny związane z zespołem pyłkowo-pokarmowym (owocowe/warzywne), np. rodzina alergenów Bet v 1. Denaturacja i pozbawienie właściwości uczulających tych alergenów uzyskuje się przez zastosowanie obróbki cieplnej [Mills i in., 2003 i 2006]. Procesy termiczne mogą być ponadto różnicowane przez obecność wody i wówczas można wyróżnić:

- Procesy wodne – gotowanie na parze wodnej, podciśnieniem, mikrofalowe gotowanie, wycłaczanie, blanszowanie,
- Procesy bezwodne – pieczenie, prażenie, suszenie w podczerwieni [Sathe i in., 2005; Mills i in., 2006].

Procesy nietermiczne

Obejmują szereg bardzo różnorodnych procesów takich jak: napromieniowanie, namaczanie, kiełkowanie, mielenie, fermentacja, obieranie, łuskanie, rozcieranie [Sathe i in., 2005, Mills i in., 2003].

- Proteoliza i sieciowanie

W wyniku rozkładu białek do peptydów alergenicność zostaje zmniejszona i zależy ona od stopnia zhydrolizowania białka. Wadą tego procesu jest powstanie produktu o nieprzyjemnym smaku i zapachu. Można temu zapobiec stosując odpowiednio dobrane enzymy [Konopka i in., 2008; Sathe i in., 2005; Czernecki i Targoński, 2002]. Najbardziej skutecznymi i bezpiecznymi sposobami usuwania alergii pokarmowych są metody oparte na enzymatycznej modyfikacji, gdyż większość alergenów to białka o masie cząsteczkowej 5 – 50 kDa, które wykazują pewne podobieństwo sekwencji aminokwasów. Metody te w większości wykorzystują proteolizę i reakcję sieciowania [Kołakowski, 2005; Mamone i in., 2007]. Reakcja sieciowania (dealergizacji) blokuje epitopy alergenu w nowo utworzonej strukturze białka, w ten sposób, aby nie wywoływały one odpowiedzi immunologicznej. Służą do tego wiązania kowalencyjne, które są indukowane przez enzymy nieproteolityczne takie jak: transglutaminaza i oksydaza tiolowa [Kołakowski, 2005].

- Kiełkowanie – podczas tego procesu, enzymy katalityczne (proteinyazy i amylazy) uaktywniają zgromadzone składniki odżywcze – białka i węglowodany, aby zapewnić wzrost kielka. Zatem kiełkowanie może pomóc w eliminacji niektórych epitopów z białek zapasowych ziarna. Jest to zależne od specyficzności enzymów w stosunku do epitopów [Sathe i in., 2005].
- Fermentacja – zdolność do wywoływania alergii przez białka, znajdujące się w składnikach żywności może zostać wyeliminowana lub osłabiona w czasie fermentacji w wyniku połączonego efektu proteolizy i denaturacji białek spowodowanej powstałymi kwasami [Sathe i in., 2005]. Proces ten wykorzystywany jest głównie w produkcji pieczywa [Konopka i in., 2008].
- Ultrafiltracja – to proces, dzięki któremu możliwe jest wyprodukowanie żywności hipoalergicznej, lecz niestety utracone zostają pożądane cechy sensoryczne danego produktu. Wykorzystywana jest np. w produkcji soków owocowych, warzywnych [Sathe i in., 2005].

- Magazynowanie – w trakcie przechowywania składników żywnościowych w określonych warunkach i przez określony czas, możliwy jest zanik alergenności tej żywności. Najczęściej proces ten obserwowany jest podczas przechowywania pszenicy, żyta, jęczmienia [Sathe i in., 2005].

Zmiany spowodowane procesami technologicznymi wpływają na ilość alergenów, które udaje się zidentyfikować i oznaczyć w żywności. Nie jest jeszcze do końca wyjaśnione, czy spadek zawartości składników alergennych jest rzeczywistym skutkiem rozpadu epitopów, czy tylko wynika z ograniczonej zdolności do ich detekcji. Procesy technologiczne oddziałują bowiem na wydajność ekstrakcji oraz zmniejszają czułość metod analitycznych [van Hengel, 2007]. Konieczne jest więc udoskonalanie metod detekcji alergenów oraz stworzenie szybkich metod analitycznych w związku z nieustannie wzrastającą liczbą zjawisk uczuleń na pokarmy bądź składniki żywnościowe [Jędrychowski, 2005].

ĆWICZENIE NR 1

1. Temat ćwiczenia

Procesy technologiczne a ekstraktywność i detekcja białek glutenowych

2. Cel ćwiczenia

- ◆ zapoznanie się z wybranymi metodami modyfikacji fizyko-chemicznych białek (obróbka termiczna, mikrofalowa i proteoliza),
- ◆ zapoznanie się ze metodami ekstrakcji różnych frakcji białek z przetworów zbożowych,
- ◆ oznaczenie zawartości białka w otrzymanych ekstraktach poprzez pomiar absorbancję,
- ◆ zapoznanie się ze sposobem wykrywania frakcji immureaktywnych przy użyciu techniki ELISA z wykorzystaniem gotowych zestawów diagnostycznych.
- ◆ zapoznanie się ze sposobem znakowania żywności zawierającej alergeny.

3. Materiał badań

- a) Materiałem badań są próbki handlowej mąki pszennej.
- b) Opakowania wybranych produktów spożywczych.

Przygotowanie próbek do badań:

- a) próbka mąki nie poddana obróbce,
- b) próbka mąki poddana działaniu mikrofal – 10 g mąki mikrofalowano przez 6 min przy wielkości mocy 900 W,
- c) próbka mąki poddana działaniu ciepła – 10 g mąki umieszczamy w suszarce nagrzejanej do temperatury 100°C i przetrzymujemy w tej temperaturze przez 10 min,
- d) próbka mąki poddana działaniu ciepła i wody – 10 g mąki zalewamy 20 ml wody destylowanej o temperaturze 100°C, szybko mieszamy i umieszczamy we wrzącej łaźni wodnej, próbkę przetrzymujemy w takich warunkach przez 10 min, a następnie suszymy w temperaturze pokojowej.

4. Zadania do wykonania

- (a) oznaczanie zawartości frakcji białek w próbkach mąki,
- (b) wykrywanie obecności glutenu w próbkach mąki,
- (c) analiza informacji podawanych na etykietach produktów spożywczych o alergenach.

5. Sposób wykonania ćwiczenia

a) oznaczenie zawartości frakcji białek spektrofotometrycznie z użyciem odczynnika Bradforda

1. Odważyć 100 mg próbki do probówki eppendorfa,
2. **Przeprowadzić ekstrakcję albumin i globulin**, w następujący sposób:
 - a) do probówki z mąką dodać 1 ml roztworu I ($0,4 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl} + 0,067 \text{ mol/dm}^3 \text{ HKNaPO}_4$ o pH 7,6),
 - b) zamknąć probówkę i energicznie wstrząsnąć do całkowitego wymieszania jej zawartości,
 - c) umieścić probówkę w termomikserze i nastawić warunki mieszania: czas 10 min, temperatura 20°C , prędkość 12000 obr/min,
 - d) homogenat odwirować w wirówce przez 5 min przy prędkości obrotowej 16000 obr/min,
 - e) zlać roztwór z nad osadu do drugiej probówki,
 - f) do osadu dodać ponownie 1 ml roztworu I, i powtórzyć ekstrakcję w sposób opisany powyżej,
 - g) oba ekstrakty połączono,
3. **Przeprowadzić ekstrakcję gliadyn**, w następujący sposób:
 - a) do probówki z osadem pozostałym po ekstrakcji frakcji albumin i globulin dodać 1 ml roztworu II (60% etanol),
 - b) zamknąć probówkę i energicznie wstrząsnąć do całkowitego wymieszania jej zawartości,
 - c) umieścić probówkę w termomikserze i nastawić warunki mieszania: czas 10 min, temperatura 20°C , prędkość 12000 obr/min,
 - d) homogenat odwirować w wirówce przez 5 min przy prędkości obrotowej 16000 obr/min,
 - e) zlać roztwór z nad osadu do drugiej probówki,
 - f) do osadu dodać ponownie 1 ml roztworu II, i ekstrakcję powtórzyć w sposób opisany powyżej,
 - g) oba ekstrakty połączono,

4. **Przeprowadzić ekstrakcję glutenin**, w następujący sposób:
 - a) do probówki z osadem pozostałym po ekstrakcji frakcji gliadyn dodać 1 ml roztworu III (50 propanol-1 + 2 mol/dm³ mocznik + 0,05 mol/dm³ Tris-HCl o pH 7,5 + 1% DTE),
 - b) zamknąć probówkę i energicznie wstrząsnąć do całkowitego wymieszania jej zawartości,
 - c) umieścić probówkę w termomikserze i nastawić warunki mieszania: czas 10 min, temperatura 60°C, prędkość 12000 obr/min, ekstrakcję prowadzić w obecności gazu obojętnego, np. azotu, wprowadzając go do probówki po wymieszaniu zawartości probówki,
 - d) homogenat odwirować w wirówce przez 5 min przy prędkości obrotowej 16000 obr/min,
 - e) zlać roztwór z nad osadu do drugiej probówki,
 - f) do osadu dodać ponownie 1 ml roztworu III, i powtórzyć ekstrakcję w sposób opisany powyżej,
 - g) oba ekstrakty połączono,
5. **Przeprowadzić reakcję barwną z odczynnikiem Bradforda**, w następujący sposób:
 - a) do probówek szklanych pobrać po 100 µl ekstraktu frakcji białek i dodać 1,5 ml odczynnika Bradforda,
 - b) zawartość probówki wymieszać; w zależności od stężenia białka w próbce obserwuje się zabarwienie roztworu od szaroniebieskiego do intensywnie niebieskiego,
6. Zmierzyć absorbancję otrzymanych barwnych roztworów przy użyciu spektrofotometru, przy długości fali $\lambda=595$ nm wobec próby zerowej, sporządzonej w ten sam sposób, zastępując 100 µl próbki właściwej 100 µl wody dejonizowanej,
7. Odczytać z krzywej wzorcowej zawartość poszczególnych frakcji białek w roztworze (rys. 5),
8. Wyniki podać w g/100 g mąki.

b) wykrywanie obecności białek glutenowych testem paskowym

1. Odważyć 100 mg próbki do probówki eppendorfa (o pojemności 2 ml),
2. Dodać 1 ml 60% roztworu etanolu, zamknąć probówkę i energicznie wstrząsnąć, do całkowitego wymieszania, do momentu uzyskania homogennej mieszaniny,

3. Pozostawić próbkę na 30 min,
4. Sklarować próbkę w celu oddzielenia cząstek stałych poprzez wirowanie (przez 10 min, przy prędkości obrotowej 16 000 obr/min), dekantację lub sączenie, ponieważ cząstki stałe mogą zmieniać wyniki badań,
5. Przesącz (etanolowy roztwór bez cząstek stałych) rozcieńcz w buforze PBS (bufor fosforanowy) w stosunku 1:10, tj. do próbki pobierz 0,5 ml etanolowego roztworu i dodaj 4,5 ml buforu PBS,
6. Wprowadź pasek reakcyjny do próbki w taki sposób by nie przekroczyć granicy wskazanej przez strzałkę,
7. Odczekaj 5 min i odczytaj wynik testu.

Interpretacja wyników:

wynik negatywny: pojawił się niebieski pasek, ten pasek powinien pojawić się zawsze,

wynik pozytywny: dodatkowo, oprócz paska niebieskiego, pojawił się pasek koloru różowo-czerwonego, wskazuje to na obecność białek glutenowych w stężeniu ≥ 2 ppm, tj. $\geq 0,2$ mg/100 g próbki, dokładniejsze określenie stężenia białek glutenowych wymaga sporządzenia rozcieńczeń otrzymanych ekstraktów w buforze PBS i ponownym sprawdzeniu ich obecności przy użyciu paska reakcyjnego,

wynik nieważny: po 5 min nie pojawił się niebieski pasek, co oznacza, że test był nieprawidłowo przeprowadzony lub pasek reakcyjny był uszkodzony.

(c) analiza etykiet produktów pod względem sposobu znakowania oraz informacji podawanych o alergenach.

Dokonać analizy informacji zamieszczonych na opakowaniach 4 wybranych produktów spożywczych:

1. Prawidłowość znakowania produktów spożywczych – informacje obowiązkowe i dobrowolne.

W tabeli należy zaznaczyć znakiem „+” obecność informacji lub znakiem „-”, brak informacji. W przypadku oświadczeń zdrowotnych, znaków jakości, certyfikatów oraz alergenów należy podać dokładne informacje. W przypadku informacji o alergenach należy zwrócić uwagę na

2. Obecność / zawartość alergenów w produktach spożywczych.

Należy uzupełnić tabelę o inne składniki alergenne występujące w analizowanych produktach. Następnie w komórkach tabeli zaznaczyć znakiem „-” / „+” / „++” / „+++” nieobecność lub obecność składnika alergennego w produkcie zgodnie z opisem znaków umieszczonym pod tabelą 6.

Analiza wyników

Uzyskane wyniki zestawić w formie tabel. Wyznaczyć wartości średnie i odchylenia standardowe. Na podstawie otrzymanych wyników określić wpływ warunków obróbki termicznej na ilość frakcji białek w mące, w tym białek glutenowych. Ponadto ocenić sposób znakowania żywności zawierającej alergeny.

Wzory tabel do sprawozdania

Tabela 2. Zawartość frakcji białek w próbce mąki

| Frakcja | Absorbancja | | Zawartość (g/100 g mąki) | | Zawartość (g/100 g mąki) | |
|-----------------------|----------------|----------------|--------------------------|----------------|---------------------------|----------------------------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₁ | X ₂ | Wartość średnia \bar{x} | Odchylenie standardowe \hat{s} |
| albuminy+globuliny | | | | | | |
| prolaminy (gliadyny) | | | | | | |
| gluteliny (gluteniny) | | | | | | |

Tabela 3. Zbiorcza zestawienie wyników analiz zawartości frakcji białek oraz obecności białek glutenowych w próbkach mąk

| Wyróżnik | Jednostka | Mąka nr 1 | | Mąka nr 2 | | Mąka nr 3 | | Mąka nr 4 | |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | \bar{x} | \hat{s} | \bar{x} | \hat{s} | \bar{x} | \hat{s} | \bar{x} | \hat{s} |
| Zawartość albumin i globulin | g/100 g | | | | | | | | |
| Zawartość prolamin (gliadyn) | g/100 g | | | | | | | | |
| Zawartość glutelin (glutenin) | g/100 g | | | | | | | | |
| Obecność białek glutenowych | - | | | | | | | | |

MAKA NR 1 –

MAKA NR 2 –

MAKA NR 3 –

MAKA NR 4 –

Tabela 4. Prawidłowość znakowania produktów spożywczych – informacje obowiązkowe.

| Informacja | Nazwa produktu i firmy, gramatura | | | | |
|---|-----------------------------------|--|--|--|--|
| | Petitki z nadzieniem morelowym | | | | |
| | Lu Polska | | | | |
| | 32 g | | | | |
| Nazwa produktu | + | | | | |
| Nazwa i adres producenta | + | | | | |
| Lista składników | + | | | | |
| Masa netto produktu | + | | | | |
| Data minimalnej trwałości | + | | | | |
| Wartość odżywcza | + | | | | |
| Obecność dozwolonych substancji dodatkowych lub innych dodatków | + | | | | |
| Sposób użycia | + | | | | |
| Nazwa kraju pochodzenia dla produktów importowanych | + | | | | |
| Warunki przechowywania | + | | | | |
| Alergeny | Obecność | może zawierać śladowe ilości arachidów | | | |
| | Dostępność informacji | łatwo dostępna | | | |
| | Rodzaj czcionki | pogrubienie, inny kolor | | | |
| | Wielkość czcionki | odpowiednia (wysokość/ powierzchnia: 1,2 mm/80 cm ²) | | | |

Tabela 5. Prawidłowość znakowania produktów spożywczych – informacje dobrowolne.

| Informacja | Nazwa produktu i firmy, gramatura | | | |
|--|--|--|--|--|
| | Petitki z nadzieniem morelowym | | | |
| | Lu Polska | | | |
| | 32 g | | | |
| Zalecenia zdrowotne (np. 2 ciastka/kromki pokrywają zapotrzebowanie na wapń) | - | | | |
| Stopień pokrycia zalecanego dziennego spożycia składników odżywczych (%) | + | | | |
| Oświadczenia żywieniowe (np. <i>źródło ...</i> , <i>wysoka zawartość ...</i> , <i>..... obniża poziom cholesterolu</i> , itp.) | | | | |
| Oświadczenia zdrowotne (np. sugeruje korzystny wpływ na zdrowie) | | | | |
| Wskazane Dienne Spożycie (GDA) | | | | |
| Znaki jakości | Produkt Fair Trade | | | |
| Wdrożenia systemów jakości i certyfikaty | | | | |
| Inne informacje, np. opakowanie biodegradowalne | Produkt uzyskał pozytywną opinię Instytutu Matki i Dziecka | | | |

Tabela 6. Obecność składników alergennych w produktach spożywczych.

| Składnik alergenny | | Nazwa produktu i firmy, gramatura | | | |
|---------------------------|-----------------------|--|--|--|--|
| | | Petitki z nadzieniem morelowym | | | |
| | | Lu Polska | | | |
| | | 32 g | | | |
| Białka glutenowe | informacja producenta | +++ | | | |
| | opinia własna | | | | |
| Mleko krowie | informacja producenta | +++ | | | |
| | opinia własna | | | | |
| Jaja | informacja producenta | ++ | | | |
| | opinia własna | | | | |
| Orzechy arachidowe | informacja producenta | + | | | |
| | opinia własna | | | | |
| Soja | informacja producenta | + | | | |
| | opinia własna | | | | |
| Orzechy laskowe | informacja producenta | + | | | |
| | opinia własna | | | | |
| | informacja producenta | | | | |
| | opinia własna | ++ | | | |

Oznaczenia:

„-„ brak składnika

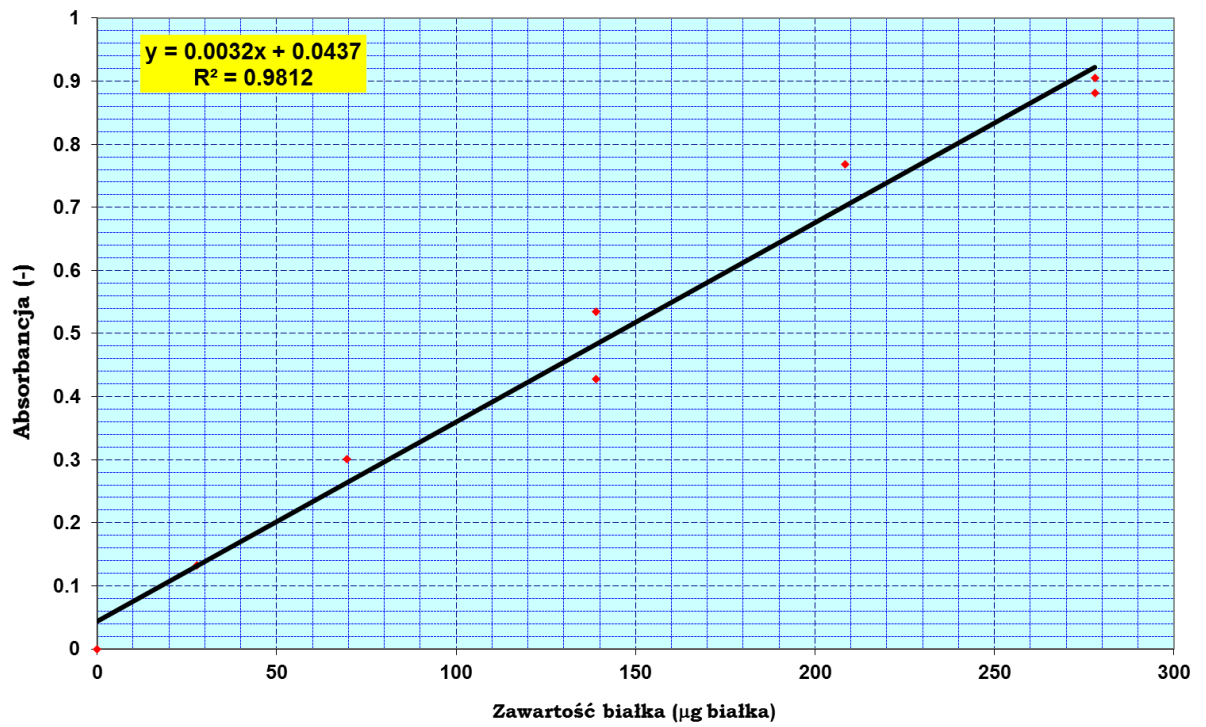
„+” niska zawartość składnika (ilości śladowe, udział poniżej 1%)

„++” wysoka zawartość składnika (udział 1-10% w składzie produktu)

„+++” wysoka zawartość składnika (udział powyżej 10% w składzie produktu)

„Informacja producenta” – producent podaje na opakowaniu, najczęściej pod składem produktu, że produkt zawiera (np. pszenicę) lub może zawierać ilości śladowe (np. arachidów) lub w zakładzie są używane (np. soja, jaja), itp.

„Opinia własna” – producent nie zamieścił informacji o obecności/zawartości alergenów, ale nazwa produktu lub składu produktu sugeruje, że zawiera on składniki alergenne



Rys. 5. Krzywa wzorcowa sporządzona na podstawie roztworów albuminy o różnym stężeniu

ĆWICZENIE NR 2

1. Temat ćwiczenia

Produkcja pieczywa bezglutenowego i/lub bezgliadynowego

2. Cel ćwiczenia

- ♦ zapoznanie studentów z podstawowymi zasadami wypieku, technologicznymi możliwościami eliminacji wybranych frakcji białek glutenowych oraz ich funkcjami technologicznymi,

WSTĘP

Produkty bezglutenowe to takie, które zawierają poniżej 20 ppm **białek glutenowych** (20 mg w 1 kg). **Białka glutenowe** występują w zbożach chlebowych: pszenicy, orkisz, życie, pszenżycie i jęczmieniu (zdania nt. owsa są niejednoznaczne). Są zbudowane w ok. 35% z glutaminy i ok. 15% z proliny. Odpowiadają za unikalne właściwości funkcjonalne:

- **Tworzenie przestrzennej sieci zdolnej do powiększania objętości podczas fermentacji ciasta** (wynik polimeryzacji zewnątrz cząsteczkowej pomiędzy gliadynami i gluteninami oraz obecności domen elastomerowych w strukturze glutenin)
- **Żelowanie** (wynik wiązania wody siłami jon-dipol przez aminokwasy, głównie glutaminę)
- **Emulgowanie** (wynik równowagi pomiędzy aminokwasami hydrofobowymi i hydrofilowymi wchodzącymi w skład niskocząsteczkowych gliadyn zdolnych do dyfuzji do powierzchni międzyfazowych)

Wypadkowy efekt tych oddziaływań to nadanie **sprężystości i lepkości** ciastu oraz **sprężystości** gotowemu pieczywu.

Aby wyprodukować pieczywo bezglutenowe trzeba zatem zastosować naturalne mąki ze zbóż niechlebowych (m.in. gryka, amarantus, ryż), a cechy funkcjonalne nieobecnych w tych roślinach białek glutenowych zastąpić innymi składnikami, które je zrekompensują. Najczęściej są to surowce i składniki o właściwościach żelujących i emulgujących. Przy produkcji pieczywa bezglutenowego warto ponadto pamiętać, że sposób odżywiania z unikaniem produktów

zawierających gluten może spowodować niedobory niektórych składników odżywczych, takich jak:

- żelazo,
- wapń,
- magnez,
- witamina D,
- cynk,
- witaminy z grupy B (B₁, B₂, B₆,PP),
- błonnik.

Do produkowanego pieczywa można więc wprowadzać, zgodnie z zasadami GMP (dobrej praktyki produkcyjnej), składniki będące bogatym źródłem tych grup związków (źródłem błonnika mogą być np. owoce lub warzywa – ich susze).

Szczegółowy spis produktów **dozwolonych dla osób chorujących na celiakię [dr med. Edyta Santorek-Strumiłło,**

<http://gastrologia.mp.pl/choroby/jelitocienkie/show.html?id=54362>]

- **pieczywo i kasze:** pieczywo bezglutenowe, pieczywo ryżowe, makaron ryżowy, makaron sojowy, kasza gryczana, kasza jaglana, kasza kukurydziana, płatki ryżowe, płatki kukurydziane, chrupki kukurydziane, kukurydza prażona, kleik ryżowy, mąka ziemniaczana, skrobia kukurydziana, mąka kukurydziana, skrobia ryżowa, mąka ryżowa, ryż dmuchany, mąka gryczana, mąka z prosa, mąka sojowa, siemię lniane; należy zwracać uwagę, czy płatki ryżowe lub kukurydziane nie zawierają słodu jęczmiennego (zabronionego produktu)
- **mleko i produkty mleczne:** mleko, kefir, maślanka, ser biały, jaja, jogurt naturalny; produkty takie, jak: śmietana, serki topione, sery żółte, jogurty smakowe, serki homogenizowane mogą zawierać jako zagęstnik skrobię pszenną (zabroniony produkt)
- **olej i tłuszcze:** masło, margaryna, olej, oliwa z oliwek, tran i inne tłuszcze zwierzęce
- wszystkie **warzywa i owoce**, również przetwory owocowe i owoce suszone
- **mięso i wędliny:** wszystkie gatunki mięs, ryby, owoce morza, szlachetne wędliny, podroby
- **słodycze:** słodycze i ciasteczka bezglutenowe, miód, cukier, fruktoza, dekstroza, budynie i kisiele na bazie mąki ziemniaczanej, galaretki, różne rodzaje orzechów, mak, sezam, dżem, syrop glukozowy, czekolada bez nadzienia, kakao naturalne

- **napoje:** kawa naturalna, kawa rozpuszczalna, herbata czarna, herbata ziołowa, woda mineralna gazowana i niegazowana, napoje i soki owocowe
- **dodatki:** drożdże naturalne, zioła, przyprawy jednoskładnikowe, ocet winny, ocet z jabłek, żelatyna, proszek do pieczenia bezglutenowy, soda oczyszczona, niektóre musztardy, niektóre majonezy i przeciera pomidorowe
- **alkohol:** alkohole destylowane, wino, nalewki; należy zachować ostrożność w przypadku likierów, gdyż mogą zawierać niewielkie ilości glutenu

Spis produktów zabronionych dla osób chorujących na celiakię
[dr med. Edyta Santorek-Strumiło,

<http://gastrologia.mp.pl/choroby/jelitocienkie/show.html?id=54362>

- **pieczywo i kasze:** pieczywo tradycyjne, pieczywo cukiernicze, makarony, kasza manna, kasza kus-kus, kasza jęczmienna (mazurska, perłowa, pęczak), otręby, musli, bułka tarta
- **mleko i produkty mleczne:** jogurty z dodatkiem musli; należy zwrócić uwagę na dodatek skrobi i mąki pszennej jako zagęstnika, np. w jogurtach owocowych, śmietanie, serkach homogenizowanych
- **warzywa i owoce:** niekiedy suszone owoce mogą być posypane mąką, żeby się nie sklejały
- **mięso i wędliny:** konserwy mięsne i rybne, mięso i ryby panierowane, wysoko przetworzone produkty mięsne i rybne (parówki, pasztet, mielonka, kaszanki, salcesony, paluszki rybne itp.)
- **słodycze:** ciasta, ciasteczka, wafle, biszkopty, paluszki, chałwa, nadziewane czekolady, batony, produkty zawierające sód jęczmienny, budyń tradycyjny, żelki i galaretki (mogą być obtoczone mąką)
- **napoje:** kawa zbożowa, niektóre herbatki owocowe i kawy z dodatkiem słodu
- **dodatki:** sosy, majonezy, ketchupy i musztardy z dodatkiem mąki, sos sojowy, zupy w proszku, zupy typu instant (tzw. „gorące kubki”), kostki rosółowe, zupy takie, jak barszcz biały i żurek
- **alkohol:** piwo, whiskey, kwas chlebowy

3. Zadania do wykonania

- ◆ przygotowanie receptur oraz wypiek pieczywa bezglutenowego 1 (praca własna studentów – modyfikacja przepisu podstawowego),
- ◆ wypiek pieczywa bezglutenowego 2 (receptura podana przez prowadzącego ćwiczenia),
- ◆ wypiek pieczywa o obniżonej zawartości białek glutenowych (receptura podana przez prowadzącego ćwiczenia),
- ◆ wypiek pieczywa tradycyjnego (receptura podana przez prowadzącego ćwiczenia),
- ◆ ocena organoleptyczna gotowych wyrobów.

PIECZYWO BEZGLUTENOWE 1 – PRZEPIS PODSTAWOWY

Składniki:

220 g koncentratu mąki bezglutenowej

6 g drożdży

190 ml wody

1 g cukru

2 g soli

20 g oleju

tłuszcz do wysmarowania formy

Wykonanie:

Drożdże rozetrzeć z cukrem i odrobiną letniej wody. Pozostałą wodę wlać do naczynia, dodać rozczyń, olej, sól i mąkę. Wyrabiać łyżką albo mikserem przez 5 min, aby uzyskać konsystencję gęstej śmietany. Formę wysmarować tłuszczem. Przenieść ciasto do formy i odstawić w ciepłe miejsce na 15-20 min. Gdy ciasto zacznie rosnać, wstawić do nagrzanego piekarnika (230°C) i piec 20-30 min.

PIECZYWO BEZGLUTENOWE 2

1) CHLEB Z MAKI KU KURYDZIANEJ

Składniki:

50 g mąki kukurydzianej
1,5 g drożdży
1 jajko
40 ml mleka
1 łyżki cukru
szczypta soli
suszone owoce
tłuszcz do wysmarowania formy

Wykonanie:

Wymieszać ze sobą składniki na jednolitą masę. Ciasto przełożyć do foremki wysmarowanej tłuszczem i odstawić do wyrośnięcia w ciepłe miejsce na ok. 30 min. Piec 15-20 min w temp. 230°C w dobrze nagrzanym piecu.

2) CHLEB RYŻOWO-KUKURYDZIANY

Składniki:

50 g mąki kukurydzianej
30 g mąki ryżowej
1,5 łyżki cukru
1 jajko
5 g drożdży
35 ml mleka
suszona żurawina
cynamon
tłuszcz do wysmarowania formy

Wykonanie:

Drożdże z cukrem i mlekiem wymieszać, następnie dodać pozostałe składniki. Wymieszać ciasto na jednolitą masę, przełożyć do foremki wysmarowanej tłuszczem i odstawić do wyrośnięcia w ciepłe miejsce na ok. 30 min. Piec 15-20 min w temp. 230°C w dobrze nagrzanym piecu.

3) CHLEB Z MAKI RYŻOWEJ

Składniki:

70 g mąki ryżowej
30 g mąki ziemniaczanej
30 g mąki bezglutenowej
1 jajko
½ łyżeczki soli
½ łyżeczki cukru
5 g drożdży
100 ml mleka (może być troszeczkę więcej)
troszkę oleju
Tłuszcz do wysmarowania formy

Wykonanie:

Drożdże z cukrem i mlekiem wymieszać, następnie dodać pozostałe składniki. Wymieszać ciasto na jednolitą masę, przełożyć do foremki wysmarowanej tłuszczem i odstawić do wyrośnięcia w ciepłe miejsce na ok. 30 min. Piec 15-20 min w temp. 230°C w dobrze nagrzanym piecu.

4) BEZGLUTENOWY CHLEB WIELOZIARNISTY

Składniki:

70 g mąki bezglutenowej wieloziarnistej
50 ml wody
½ łyżeczki soli
½ łyżeczki cukru
5 g drożdży
½ łyżki oleju
dowolne dodatki
tłuszcz do wysmarowania formy

Wykonanie:

Drożdże rozetrzeć z cukrem i odrobiną letniej wody. Pozostałą wodę wlać do naczynia, dodać rozczyn, olej, sól i mąkę. Wyrabiać łyżką albo mikserem przez 5 min, aby uzyskać konsystencję gęstej śmietany. Formę wysmarować tłuszczem. Przenieść ciasto do formy i odstawić w ciepłe miejsce na 15-20 min. Gdy ciasto zacznie rosnąć, wstawić do nagrzanego piekarnika (230°C) i piec 20-30 min.

PIECZYWO O OBNIŻONEJ ZAWARTOŚCI BIAŁEK GLUTENOWYCH

Składniki:

49 g mąki pszennej
21 g mąki z ziarna poddanego kiełkowaniu/mąki poddanej mikrofalowanej/mąki poddanej gotowaniu
42 ml wody
2,1 g drożdży
0,7 g soli

Drożdże dodawać w postaci zawiesiny wodnej, rozpuszczając drożdże w 10 ml wody przeznaczonej do ciasta.

Sól dodawać w postaci roztworu, rozpuszczając 10 ml wody przeznaczonej do ciasta.

Wykonanie:

Odważyć mąkę do miski, dodać roztwory soli i drożdży oraz pozostałą ilość wody, a następnie przygotować ciasto. Mieszenie ciasta wykonać ręcznie w ciągu 5-10 min. Ciasto wstawić do komory fermentacyjnej (temp. 32°C) na 30 min, aby wyrosło. Po tym czasie przemieszać ciasto ręcznie w ciągu 1 min, a następnie wstawić ponownie do komory fermentacyjnej na 30 min. Wyrośnięte ciasto przełożyć do formy, uprzednio wysmarowanej olejem. Ciasto z formą umieścić w komorze fermentacyjnej na ok. 15-20 min. Ciasto powinno wyrosnąć, wypełniając prawie całkowicie objętość formy. Wyrośnięte ciasto piec w temp. 230°C przez ok. 20 min.

PIECZYWO TRADYCYJNE PSZENNE

Składniki:

200 g mąki pszennej typ 650
120 ml wody
6 g drożdży
2 g soli

Drożdże dodawać w postaci zawiesiny wodnej, rozpuszczając 6 g drożdży (3% w stosunku do mąki) w 50 ml wody przeznaczonej do ciasta.

Sól dodawać w postaci roztworu, rozpuszczając 2 g soli (1% w stosunku do mąki) w 25 ml wody przeznaczonej do ciasta.

Wykonanie:

Odważyć mąkę do miski, dodać roztwory soli i drożdży oraz pozostałą ilość wody, a następnie przygotować ciasto. Mieszenie ciasta wykonać ręcznie w ciągu 5-10 min. Ciasto wstawić do komory fermentacyjnej (temp. 32°C) na 30 min, aby wyrosło. Po tym czasie przemieszać ciasto ręcznie w ciągu 1 min, a następnie wstawić ponownie do komory fermentacyjnej na 30 min. Wyrośnięte ciasto przełożyć do formy, uprzednio wysmarowanej olejem. Ciasto z formą umieścić w komorze fermentacyjnej na ok. 20-30 min. Ciasto powinno wyrosnąć, wypełniając prawie całkowicie objętość formy. Wyrośnięte ciasto piec w temp. 230°C przez ok. 30 min.

OCENA ORGANOLEPTYCZNA PIECZYWA

Wykonać następnie ocenę organoleptyczną poprzez zbadanie wybranych cech fizycznych uzyskanego pieczywa:

Kształt pieczywa, barwa skórki i wygląd zewnętrzny. Przy ocenie przyjąć (najczęściej stosowane) następujące określenia: kształt płaski, kulisty, właściwy dla danej formy (przy wypieku chleba w formach); barwa skórki złocista, złocistobrazowa, brązowa, niejednolita, zbyt ciemna, zbyt jasna; wygląd powierzchni skórki: gładka, błyszcząca, lekko pomarszczona, popękana, z pęcherzami.

Dalsze cechy pieczywa określić po przekrojeniu bochenka przez środek.

Zapach. Ustalić natychmiast po przekrajaniu bochenka określając jako: właściwy, przyjemny, aromatyczny, stęchły, mdły, itp.

Smak i zanieczyszczenia mineralne. Oznaczyć przez powolne przeżuwanie miękiszu pobranego ze środka pieczywa. Smak pieczywa może być: właściwy, gorzki, słony lub niesiony, kwaskowy, kwaśny itp. Określić również ewentualne, wyczuwalne *zanieczyszczenia mineralne* (np. piasek), co przejawia się w charakterystycznym trzeszczeniu przy przeżuwaniu.

Elastyczność, chrupkość i grubość skórki. Elastyczność skórki określić przez jej naciśnięcie, chrupkość przez rozgryzienie, a grubość przez zmierzenie linijką. Skórka powinna być sprężysta, ściśle związana z miękiszem, o barwie zanikającej równomiernie w kierunku miękiszu.

Barwa miękiszu. Ustalić używając następujących określeń: kremowa, kremowo-szara, szara, szaro-ziemista dodając jeszcze określenie czy jest równomierna czy nie.

Elastyczność, spulchnienie i porowatość miękiszu. Elastyczność miękiszu ustalić naciskając palcem kromki pieczywa o grubości 1,5 cm. Miękiśz nacisnąć do oporu i po uwolnieniu nacisku obserwować jego zachowanie. Jeżeli nastąpi natychmiastowy powrót do stanu pierwotnego, elastyczność określa się jako bardzo dobrą, jeżeli nastąpi powolny powrót do stanu pierwotnego – jako dobra, jeżeli powstanie niewielka deformacja miękiszu – jako dostateczną oraz jeżeli nastąpi stała i duża deformacja – jako niedostateczną.

Analiza wyników

Wyniki oceny organoleptycznej zestawić w formie tabeli według wzoru przedstawionego w przewodniku. Wskazać na ewentualne zalety i wady takiego pieczywa w porównaniu z pieczywem kontrolnym.

Wnioski:

1. Opis zastosowanych zamienników białek glutenowych w recepturze pieczywa bezglutenowego (należy przypisać im określone cechy funkcjonalne).
2. Opis dodatkowych składników w recepturze w aspekcie wzbogacania wartości odżywczej.
3. Ocena organoleptyczna pieczywa – porównanie pieczywa tradycyjnego i bezglutenowego.

wzór tabeli do sprawozdania

Tabela 1. Porównanie składu, jakości i wartości odżywczej pieczywa tradycyjnego i bezglutenowego.

| | Pieczywo tradycyjne - pszenne | Pieczywo bezglutenowe 1 (receptura własna) | Pieczywo bezglutenowe 2 (receptura podana) |
|--|---|--|--|
| Receptura | | | |
| 1. Składniki podstawowe | mąka drożdże sól woda | | |
| 2. Składniki dodatkowe | _____ | | _____ |
| Ocena organoleptyczna* | | | |
| kształt pieczywa | właściwy (białka glutenowe) | | |
| wygląd skórki (grubość, barwa) | | | |
| wygląd miękiszu (barwa, porowatość) | | | |
| elastyczność miękiszu | | | |
| smak i zapach | | | |
| inne cechy/wady | | | |
| Wartość odżywcza** | | | |
| Kaloryczność (niska, średnia, wysoka) | | | |
| Białko | mąka (średnia) | | |
| Węglowodany - skrobia - błonnik | mąka (wysoka) mąka (niska) | | |
| Witaminy: - z grupy B - C - E | drożdże (średnia) mąka (niska) | | |
| Składniki mineralne: - magnez - wapń - | mąka (niska) mąka (niska) | | |

* ocenić w sposób opisowy oraz podać w nawiasie składnik odpowiadający za daną cechę,

** podać źródło składnika (mąka, drożdże, owoce, zioła, itp.) oraz przewidywaną zawartość (niska, średnia, wysoka) – wskazując tym samym czy pieczywo jest dobrym źródłem poszczególnych składników

ĆWICZENIE NR 3

1. Temat ćwiczenia

Charakterystyka molekularna białka a jego cechy alergogenne

2. Cel ćwiczenia

- ◆ zapoznanie studentów z podstawowymi elementami bazy Swiss-Prot/TrEMBL
- ◆ odnajdywanie białek alergennych, zapisywanie ich sekwencji, wyznaczenie teoretycznego pI i masy cząsteczkowej białka i wybranych fragmentów
- ◆ określenie hydrofobowości białka /peptydu

3. Zadania do wykonania

- ◆ odszukanie w bazie Swiss-Prot/TrEMBL 7-10 białek, należących do frakcji α -, ω -, γ - gliadyn oraz HMW i LMW glutenin,
- ◆ zapisanie ich sekwencji w utworzonym nowym pliku,
- ◆ określenie pI, długości oraz masy cząsteczkowej całego białka oraz wybranych fragmentów N- terminalnych (100 resztowych),
- ◆ określenie indeksu hydrofobowości całego białka oraz ich fragmentów N- terminalnych,
- ◆ poszukiwanie w sekwencji białek tetrapeptydów odpowiedzialnych za celiakię – PSQQ, QQQP, QQPY, QPYP
- ◆ obliczenie udziału molowego aminokwasów polarnych i niepolarnych, tryptofanu, proliny i cysteiny.

Aminokwasy hydrofobowe:

alanina, walina, leucyna, izoleucyna, prolina, fenyloalanina, tryptofan i metionina

Aminokwasy polarne:

- 1) bez ładunku: glicyna, tyrozyna, cysteina, seryna, treonina, asparagina i glutamina
- 2) o ładunku dodatnim: lizyna, arginina i histydyna
- 3) o ładunku ujemnym: kwas asparaginowy i kwas glutaminowy

Analiza wyników

Uzyskane wyniki zestawić w formie tabeli. Na podstawie otrzymanych wyników określić frakcję o najwyższej hydrofobowości oraz zawartości epitopów dla przeciwciał antygliadynowych.

Poniżej przedstawiono przykład analizy charakterystyki białek alergennych w bazie UniProt.

**PODSTAWOWA ANALIZA SEKWENCJI
i INFORMACJI NAUKOWYCH nt. WYBRANYCH BIAŁEK ALERGENNYCH**

PRZYKŁADY Z BAZY BIOINFORMATYCZNEJ BIAŁEK ALERGENNYCH

(UniProtKB: Swiss-Prot i TrEMBL)

Swiss Institute of Bioinformatics

1 sprawozdanie/prezentacja - 1-2 osoby

Jeden student – 2 alergeny

Dwóch studentów - 4 alergeny

Należy wybierać alergeny z różnych grup żywności i/lub reagujących krzyżowo z żywnością

<http://www.uniprot.org/>

wybierać głównie alergeny

z tzw. „wielkiej 8”, chociaż można wybrać również inne, np.:

np.: fish allergen, shrimp allergen, wheat allergen, ovalbumin allergen, latex allergen, pollen allergen, profilin, expansin, LPT allergen, inhibitor allergen, heat shock allergen

The mission of UniProt is to provide the scientific community with a comprehensive, high-quality and freely accessible resource of protein sequence and functional information.

UniProtKB
Swiss-Prot (547,599)
Manually annotated and reviewed.
TrEMBL (90,860,905)
Automatically annotated and not reviewed.

UniRef
Sequence clusters

UniParc
Sequence archive

Proteomes

Supporting data
Literature citations
Taxonomy
Subcellular locations
Cross-ref. databases
Diseases
Keywords
XXX

News
Mosquitoes prefer human
UniProt release 2015_02
Thalidomide, the pharmacological version of yin and yang | Cross-references to DEPOD, MoonProt and Proteomes
UniProt release 2015_01
Higher and higher | New mouse and zebrafish variation files | Structuring of 'cofactor' annotations
UniProt release 2014_11
News archive

Getting started
Text search
Our basic text search allows you to search all the resource available.

UniProt data
Download latest release
Get the UniProt data

Protein spotlight
Taming Genes
March 2015

Wpisujemy **allergen** i szukamy w bazie alergenów

| Entry | Entry name | Protein names | Gene names | Organism | Length |
|--------|-------------|--|---------------------|---|--------|
| P30438 | FEL1A_FELCA | Major allergen I polypeptide chain ... | CH1 | Felis catus (Cat) (Felis silvestris catus) | 92 |
| P30440 | FEL1B_FELCA | Major allergen I polypeptide chain ... | CH2 | Felis catus (Cat) (Felis silvestris catus) | 109 |
| P02689 | 2S5_RICCO | 2S albumin | | Ricinus communis (Castor bean) | 258 |
| P42035 | RA2_DAVTA | 60S acidic ribosomal protein P2 | CLAH5, CLAH3, CLAH4 | Davidiella tassiana (Mycosphaerella tassiana) (Cladosporium herbarum) | 111 |
| Q28133 | ALL2_BOVIN | Allergen Bos d 2 | | Bos taurus (Bovine) | 172 |
| P80384 | ALL2_LEPDS | Mite group 2 allergen Lep d 2 | | Lepidoglyphus destructor (Fodder mite) | 141 |
| P14946 | MPAL1_LOLPR | Pollen allergen Lol p 1 | | Lolium perenne (Perennial ryegrass) | 263 |
| P35778 | VA3_SOLIN | Venom allergen 3 | | Solenopsis invicta (Red imported fire ant) (Solenopsis wagneri) | 234 |
| Q9HDT3 | ENO_ALTAL | Enolase | ENO, ALTA11, ALTA6 | Alternaria alternata (Alternaria rot fungus) (Torula alternata) | 438 |

W celu poprawienia jakości danych, wyniki filtrujemy na rodzaj wyświetlanych wyników, zaznaczając **reviewed**

Filter by' Reviewed (1,068) Swiss-Prot

Popular organisms

- A. thaliana (67)
- Rice (61)
- Human (16)
- Mouse (12)
- Bovine (8)

Other organisms

Search terms

Filter "allergen"

- annotation topic (0)
- keyword (709)
- protein family (23)
- protein name (453)

View by

- Taxonomy
- Keywords

| Entry | Entry name | Protein names | Gene names | Organism | Length |
|--------|-------------|--|---------------------------|---|--------|
| P30438 | FEL1A_FELCA | Major allergen I polypeptide chain ... | CH1 | Felis catus (Cat) (Felis silvestris catus) | 92 |
| P30440 | FEL1B_FELCA | Major allergen I polypeptide chain ... | CH2 | Felis catus (Cat) (Felis silvestris catus) | 109 |
| P01089 | 2SS_RICCO | 2S albumin | | Ricinus communis (Castor bean) | 258 |
| P42039 | RLA2_DAVTA | 60S acidic ribosomal protein P2 | CLAH5, CLAH3, CLAH4 | Davidiella tassiana (Mycosphaerella tassiana) (Cladosporium herbarum) | 111 |
| Q28133 | ALL2_BOVIN | Allergen Bos d 2 | | Bos taurus (Bovine) | 172 |
| P80384 | ALL2_LEPDS | Mite group 2 allergen Lep d 2 | | Lepidoglyphus destructor (Fodder mite) | 141 |
| P14946 | MPAL1_LOLPR | Pollen allergen Lol p 1 | | Lolium perenne (Perennial ryegrass) | 263 |
| P35778 | VA3_SOLIN | Venom allergen 3 | | Solenopsis invicta (Red imported fire ant) (Solenopsis wagneri) | 234 |
| Q9HDT3 | ENO_ALTAL | Enolase | ENO, ALTA11, ALTA6 | Alternaria alternata (Alternaria rot fungus) (Torula alternata) | 438 |
| P67875 | RNMG_ASPFU | Ribonuclease mitogillin | mitF, aspF1, AFUA_5G02330 | Neosartorya fumigata (strain ATCC MYA-4609 / Af293 / CBS 101355 / FGSC A1100) (Aspergillus fumigatus) | 176 |
| P15322 | ALL1_SINAL | Allergen Sin a 1 | | Sinapis alba (White mustard) (Brassica hirta) | 145 |
| P08176 | PEPT1_DERPT | Peptidase 1 | DERP1 | Dermatophagoides pteronyssinus (European house dust mite) | 320 |
| P15494 | BEV1A_BETPN | Major pollen | BETVIA, BETVI | Betula pendula (European white birch) (Betula) | 160 |

Klikamy na kod w kolumnie **Entry** np. **P15322**

Należy wybierać białka i peptydy dłuższe niż 70AA

Np. **Allergen Sin a 1** (białko gorczycy białej)

Pojawia się wówczas kolejna strona z charakterystyką białka

Function¹
This is a 2S seed storage protein.

GO - Molecular function¹
• nutrient reservoir activity [Source: UniProt-KW]

Keywords - Molecular function¹
Seed storage protein, Storage protein

Names & Taxonomy¹

Protein names¹ Recommended name:
Allergen Sin a 1
Alternative name(s):
• Allergen Sin a 1
• Allergen: Sin a 1
Cleaved into the following 2 chains:
• Allergen Sin a 1 small chain
• Allergen Sin a 1 large chain

Organism¹ Sinapis alba (White mustard) (Brassica hirta)

Taxonomic identifier¹ 3728 [NCBI]

Taxonomic lineage¹ Eukaryota > Viridiplantae > Streptophyta > Embryophyta > Tracheophyta > Spermatophyta > Magnoliophyta > eudicotyledons > Gunneridae > Pentapetalae > rosids > malvids > Brassicales > Brassicaceae > Sinapis

Pathology & Biotech¹

Allergenic properties¹
Causes an allergic reaction in human. Causes cabbage allergy.

Keywords - Disease¹
Allergen

Molecule processing

| Feature key | Position(s) | Length | Description | Graphical view | Feature identifier | Actions |
|-------------------------|-------------|--------|------------------------------|----------------|--------------------|---------|
| Chain ¹ | 1 – 39 | 39 | Allergen Sin a 1 small chain | | PRO_0000032167 | |
| Propeptide ¹ | 40 – 54 | 15 | 1 Publication | | PRO_0000032168 | |
| Chain ¹ | 55 – 145 | 91 | Allergen Sin a 1 large chain | | PRO_0000032169 | |

Keywords - PTM¹
Disulfide bond

Interaction¹

Subunit structure¹
The protein consists of two chains linked by disulfide bonds.

Structure¹

3D structure databases

ProteinModelPortal¹ P15322

ModBase¹ Search...

MobiDB¹ Search...

Family & Domains¹

Sequence similarities¹
Belongs to the 2S seed storage albumins family.

Family and domain databases

InterPro¹ IPK016140. Bifunc_inhib/LTP/seed_store. IPK000617. Napin. [Graphical view]

Pfam¹ PF00234. Tryp_alpha_amyl. 1 hit.

Sprawdzamy:

Molecular function: (np. białko zapasowe nasion)

Sequence similarities: (np. należy do rodziny 2S albumin zapasowych)

PTM (modyfikacje potranslacyjne): (np. tworzenie wiązań disulfidowych)

Jeśli jest dostępna SECONDARY STRUCTURE (rozwinąć details – spisać struktury helikalne (helix), pasmowe (strand) i skręty (turn))

Protein Allergen Sin a 1
Gene N/A
Organism *Sinapis alba* (White mustard) (*Brassica hirta*)
Status Reviewed - Annotation score: ●●●●● - Experimental evidence at protein levelⁱ

Display None [BLAST](#) [Align](#) [Format](#) [Add to basket](#) [History](#) [Feedback](#) [Help video](#)

Functionⁱ
 This is a 2S seed storage protein.
GO - Molecular functionⁱ
 ▶ nutrient reservoir activity [Source: UniProtKB-KW](#)
 Complete GO annotation...
Keywords - Molecular functionⁱ
 Seed storage protein, Storage protein

Names & Taxonomyⁱ

Protein namesⁱ **Recommended name:**
Allergen Sin a 1
 Alternative name(s):
 • Allergen Sin a I
 • Allergen: Sin a 1
 Cleaved into the following 2 chains:
 • Allergen Sin a 1 small chain

Display None **Keywords - Disease**
 Allergen

Protein family/group databases

Allergome¹ 3477. Sin a 1.0101.
 627. Sin a 1.

PTM / Processingⁱ

Molecule processing

| Feature key | Position(s) | Length | Description | Graphical view | Feature identifier | Actions |
|-------------------------|-------------|--------|-------------------------------|----------------|--------------------|--|
| Chain ¹ | 1 - 39 | 39 | Allergen Sin a 1 small chain | | PRO_0000032167 | Add BLAST |
| Propeptide ¹ | 40 - 54 | 15 | 1 Publication | | PRO_0000032168 | Add BLAST |
| Chain ¹ | 55 - 145 | 91 | Allergen Sin a 1 large chain | | PRO_0000032169 | Add BLAST |

Keywords - PTMⁱ
 Disulfide bond

Interactionⁱ

Subunit structure¹
 The protein consists of two chains linked by disulfide bonds.

Structureⁱ

3D structure databases

ProteinModelPortal¹ P15322.
 ModBase¹ Search...
 MobiDB¹ Search...

Structureⁱ

Secondary structure¹

Legend: ■ Helix ■ Turn ■ Beta strand

[Hide details](#)

| Feature key | Position(s) | Length | Description | Graphical view | Feature identifier | Actions |
|--------------------|-------------|--------|----------------------------------|----------------|--------------------|---------|
| Helix ¹ | 45 - 53 | 9 | Combined sources | | | |
| Helix ² | 55 - 68 | 14 | Combined sources | | | |

3D structure databases

| Select the link destinations: | Entry | Method | Resolution (Å) | Chain | Positions | PDBsum |
|---|-------|--------|----------------|-------|-----------|--------|
| <input checked="" type="radio"/> PDB ¹ | 1BH1 | NMR | - | A | 44-69 | [*] |
| <input type="radio"/> RCSB PDB ¹ | 2MLT | X-ray | 2.00 | A/B | 44-69 | [*] |
| <input type="radio"/> PDBj ¹ | 3QRX | X-ray | 2.20 | B | 44-69 | [*] |

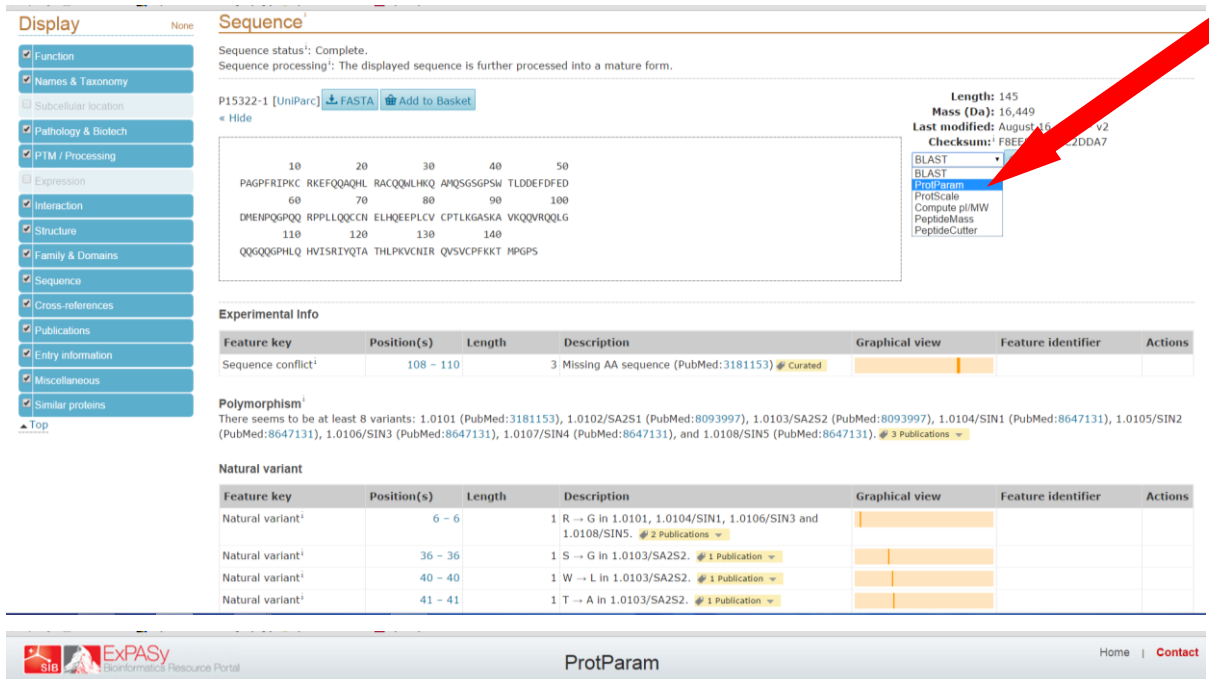
ProteinModelPortal¹ P01501.
 SMR¹ P01501. Positions 44-69.
 ModBase¹ Search...
 MobiDB¹ Search...

Miscellaneous databases

EvolutionaryTrace¹ P01501.

Family & Domainsⁱ

Chcąc poznać skład aminokwasowy białka należy z listy po prawej stronie wybrać **ProtParam**, a następnie zatwierdzić wybór całego łańcucha za pomocą **Submit**



The screenshot shows the ProtParam web interface. On the left, there is a 'Display' sidebar with various categories like Function, Names & Taxonomy, Pathology & Biotech, etc. The main area is titled 'Sequence' and shows the protein sequence: P15322-1 [UniParc]. A dropdown menu on the right contains options: BLAST, BLAST, ProtParam (highlighted by a red arrow), ProtScale, Compute pI/MW, PeptideMass, and PeptideCutter. Below the sequence, there are sections for 'Experimental Info', 'Polymorphism', and 'Natural variant', each with a table of details.

ProtParam

Selection of endpoints on the sequence

ALL1_SINAL (P15322)

Allergen Sin a 1 precursor (Allergen Sin a 1) (Allergen Sin a 1) [Contains: Allergen Sin a 1 small chain; Allergen Sin a 1 large chain]
Sinapis alba (White mustard) (Brassica hirta).

Please select one of the following features by clicking on a pair of endpoints, and the computation will be carried out for the corresponding sequence fragment. By default, the complete sequence is used.

Note: Only the features corresponding to subsequences of at least 5 residues are highlighted.

| | | | |
|----|--------|--------|-------------------------------|
| FT | CHAIN | 1-39 | Allergen Sin a 1 small chain. |
| FT | PROPEP | 40-54 | {ECO:0000269 PubMed:3181153}. |
| FT | CHAIN | 55-145 | Allergen Sin a 1 large chain. |

Or, if you wish to select a different sequence fragment (at least 5 amino acids long), you can enter the desired endpoints on the sequence here (by default, the computation will be carried out for the complete sequence).

N-terminal:
C-terminal:

The sequence ALL1_SINAL consists of 145 amino acids.

Uzyskamy informacje przeliczone dla całego łańcucha.

ALL1_SINAL (P15322)

Allergen Sin a 1 precursor (Allergen Sin a I) (Allergen Sin a 1) [Contains: Allergen Sin a 1 small chain; Allergen Sin a 1 large chain]
 Sinapis alba (White mustard) (Brassica hirta).
 The computation has been carried out on the complete sequence (145 amino acids).

Warning: All computation results shown below do not take into account any annotated post-translational modification.
 References and documentation are available.

Number of amino acids: 145

Molecular weight: 16448.7

Theoretical pI: 8.73

Amino acid composition: [CSV format](#)

| | | |
|---------|----|-------|
| Ala (A) | 7 | 4.8% |
| Arg (R) | 7 | 4.8% |
| Asn (N) | 3 | 2.1% |
| Asp (D) | 5 | 3.4% |
| Cys (C) | 8 | 5.5% |
| Gln (Q) | 24 | 16.6% |
| Glu (E) | 7 | 4.8% |
| Gly (G) | 9 | 6.2% |
| His (H) | 6 | 4.1% |
| Ile (I) | 4 | 2.8% |
| Leu (L) | 11 | 7.6% |
| Lys (K) | 9 | 6.2% |
| Met (M) | 3 | 2.1% |
| Phe (F) | 5 | 3.4% |
| Pro (P) | 15 | 10.3% |
| Ser (S) | 7 | 4.8% |
| Thr (T) | 5 | 3.4% |
| Trp (W) | 2 | 1.4% |
| Tyr (Y) | 1 | 0.7% |
| Val (V) | 7 | 4.8% |
| Pro (P) | 0 | 0.0% |
| Sec (U) | 0 | 0.0% |
| (B) | 0 | 0.0% |
| (Z) | 0 | 0.0% |
| (X) | 0 | 0.0% |

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 12

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 16

Atomic composition:

| | | |
|----------|---|------|
| Carbon | C | 714 |
| Hydrogen | H | 1126 |
| Nitrogen | N | 216 |
| Oxygen | O | 218 |
| Sulfur | S | 11 |

Formula: C₇₁₄H₁₁₂₆N₂₁₆O₂₁₈S₁₁

Total number of atoms: 2277

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 12090

Abs 0.1% (-1 g/l) 0.790, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 12490

Abs 0.1% (-1 g/l) 0.750, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is P (Pro).

The estimated half-life is: >20 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
 >20 hours (yeast, in vivo).
 ? (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 62.61
 This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 59.17

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.832

Dla sekwencji dokonujemy:

- 1) analizy składu aminokwasowego oraz: **Instability index** (do 40 białko stabilne), **Aliphatic index** (względna objętość zajęta przez alifatyczne łańcuchy alaniny, waliny, izoleucyny i leucyny), **Grand average of hydropathicity** GRAVY (im wyższa wartość tym białko bardziej hydrofobowe) (funkcja: **ProtParam**)
- 2) analiza pI i masy cząsteczkowej (funkcja: **Compute pI/MW** zamiast **ProtParam**)
- 3) hydrofobowość (wg. Kyte & Doolittle) w tzw. oknach (funkcja: **ProtScale**) – stosować ustawienia automatyczne (2 razy klikamy **Submit**).

EXPASY Proteomics Server

You are here: EXPASY CH > Tools > Primary structure analysis > Compute pI/Mw

Compute pI/Mw

Selection of endpoints on the sequence

P01501 (P01501)

Melittin precursor (Allergen Api m III) (Allergen Api m 3)
Apis mellifera (Honeybee).

Please select one of the following features by clicking on a pair of endpoints, and the computation will be carried out for the corresponding sequence fragment.
Note: Only the features corresponding to subsequences of at least 5 residues are highlighted.

| | | | |
|----|---------|-------|-----------------------------------|
| FT | SIGNAL | 1-21 | |
| FT | PROPEP | 22-43 | Removed by a dipeptidylpeptidase. |
| FT | PEPTIDE | 44-69 | Melittin. |
| FT | HELIX | 45-53 | |
| FT | HELIX | 55-68 | |

Or, if you wish to select a different sequence fragment (at least 5 amino acids long), you can enter the desired endpoints on the sequence here (by default, the computation will be carried out for the complete sequence).

N-terminal:

C-terminal:

The sequence P01501 consists of 70 amino acids.

Przy wszystkich analizach oceniać całe białko – odrzucić tylko peptyd sygnałny (w tym przykładzie od 1 do 21 - analizować pozostałą sekwencję – tutaj od 22 do 69)
Zatwierdzić wybór – **SUBMIT**

EXPASY Proteomics Server

Compute pI/Mw

Compute pI/Mw

ALL1_SINAL (P15322)

Allergen Sin a 1 precursor (Allergen Sin a 1) (Allergen Sin a 1) [Contains: Allergen Sin a 1 small chain; Allergen Sin a 1 large chain]
Sinapis alba (White mustard) (Brassica hirta).
The computation has been carried out on the complete sequence (145 amino acids).

Molecular weight (Da): 16448.78 (average mass), 16438.10 (monoisotopic mass)

Theoretical pI: 8.73

Otrzymujemy wyniki **pI** oraz **MW** tego peptydu

Dodatkowo należy zanalizować zawartość aminokwasów:

- ✓ **niepolarnych**
- ✓ **polarnych z ładunkiem**
- ✓ **cysteiny**
- ✓ **proliny**
- ✓ **glutaminy**

oraz obliczyć hydrofobowość całego białka ze skali Kyte-Doolittle (skala zamieszczona w tabeli 1 na stronie 22 w przewodniku)

Punkty sprawozdania:

1. Zestawienie danych
2. Opis literaturowy wybranych alergenów
3. Wnioski
4. Literatura

Wzór tabeli do sprawozdania

Tabela 1. Charakterystyka wybranych białek alergennych – zestawienie danych

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|----------------------------|---|---|---|
| Dane podstawowe | | | | |
| Kod białka | | | | |
| Organizm/źródło | | | | |
| Przynależność do rodziny (<i>Sequence similarities</i>) | | | | |
| Funkcja molekularna białka | | | | |
| Znaczenie technologiczne | | | | |
| Cechy biochemiczne białka | | | | |
| Długość cząsteczki (AA) | | | | |
| Masa cząsteczkowa | | | | |
| pI | | | | |
| Struktury II-rzędowe | Procentowy udział struktur | | | |
| Helix | | | | |
| Strand | | | | |
| Turn | | | | |
| Indeks niestabilności | | | | |
| Indeks alifatyczności | | | | |
| Indeks GRAVY | | | | |
| Hydrofobowość | | | | |
| Modyfikacje potranslacyjne (PTM) | | | | |
| Skład aminokwasowy białka | | | | |
| Niepolarne | | | | |
| Polarne z ładunkiem | | | | |
| Cysteina (C lub Cys) | | | | |
| Prolina (P lub Pro) | | | | |

Rysunek: hydrofobowość (Kyte & Doolittle) w tzw. oknach (ProtScale) stosować ustawienia automatyczne.