

# ARRAUTZA HIPOALERGENIKOA, UTOPIA EDO ERREALITATEA?

Egileak: Maren Iturrioz, Shara Carnero, Xuban De Lera, Oier Jimenez

---

## 1. SARRERA

Arrautza, hegaztien batez ere, oso elikagai ohikoa da munduko gastronomian. Super elikagai bezala kontsideratua dago dietarako oinarriazkoak diren mantenugaien eduki handiak dituelako, esaterako: bitaminak, proteinak eta mineralak. Gainera, ikerketek erakutsi dute arrautza kopuru jakin bat irenstea osasun ona susta dezakeela.

Kontsumo dietetikoaz gain, arrautzaren erabilera oso zabalduta dago elikagaien industrian, oinarriko osagaia baita helatu, bizkotxo edota saltsetan. Dena den, beste elikagai batzuetan ere bere presentzia nabaria da, hain ezaguna ez izan arren. Adibidez, garagardo eta ardoaren industrian edota gazteen artean hain zabalduta dauden gehigarri dietetiko batzuetan. Beste aplikazioetan ere agertzen da, industria kosmetiko eta farmazeutikoetan erabiltzen dira, zenbait txerto arrautzetan oinarritzen baitira.

Dena den, azken ikerketek erakutsi dute arrautza elikagai alergeniko ohikoenetakoa dela eta populazioan, inzidentziak gora egin duela azken urteetan. Egungo prebalentzia-tartea %1etik % 2ra bitartekoa da helduen kasuan eta % 9,5era iristen da haurretan (Xiaojuan Ma *et al.*, 2020).

Alergia hori arrautzetan agertzen diren proteina batzuk sortzen dute. Modurik errezena arrautza gure dieta, elikagai eta erabiltzen ditugun produktuen osagaietatik kentzea izango litzateke. Hala ere, egoera ikusita, ikerketek arrautzatik eratorritako produktu hipoalergenikoak eta arrautza-proteinekin egindako osagai hipoalergenikoak sortzea alternatiba garrantzitsua ikusten dute alergia pairatzen duten pazienteentzat. Hori dela eta, gure helburua arrautza hipoalergeniko bat lortzea da, hau da alergenoko gabeko arrautza bat.

## 2. OINARRI TEORIKOA

### 2.1. ARRAUTZARI ALERGIA

Arrautzak bi osagai ditu zuringoa eta gorringoa, eta biek sor dezakete alergia, hau da, sistema immunologikoaren kontrako erreakzioa. Zuringoak gutxienez alergia sorrazten duten 24 proteina mota ditu. Esanguratsuenak oboalbumina, obomukoidea, obotrasferina eta lisoizima dira. Gorringoan, berriz, alfa-libetina aurki dezakegu.

Proteina hauen ingestak, kontaktuak edo inhalazioak alergia eragiten du eta honelako sintomak erakutsi ditzakete:

- Azkura ahoan eta ahosabaian
- Errinitisa eta/edo konjuntibitisa
- Arnasteko zailtasuna
- Asma-krisia
- Larruazaleko hantura edo erlauntza

Sintomak aldakorrak eta larritasun-mota ezberdinekoak izan daitezke. Epe laburrean gertatzen dira, gehienez ere ordu batean, arrautza edo arrautza duten elikagaiak kontsumitu ondoren. Baina ez dago klinika tipikorik.

Sintomak tratatzeko berehala jo beharko da medikuarenera eta hark emango du beharrezko medikazioa edota alergologo batengana bidali arrautzari eta/edo beste elikagai bati alergia ote dien erabaki eta egiazta dezan. Konfirmatzen bada, antihistaminikoak hartzen dira sintomak gutxitzeko eta larrialdi kasuan epinefrina injezioa.

Behin alergia dela konfirmatuta arrautza edo bere eratorriak ekidin beharko dituzte arazorik ez izateko.

## 2.2. ELIKAGAIEN TRATAMENDUA

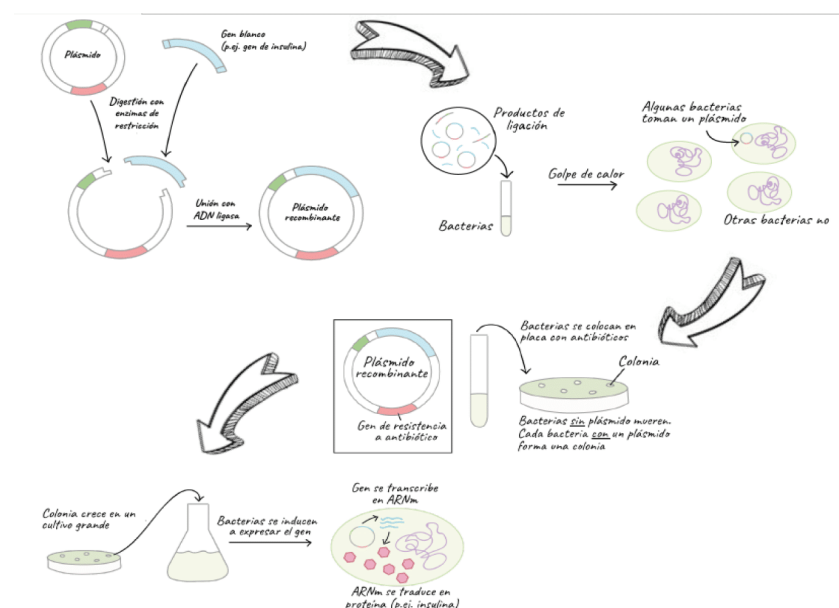
Gaur egun, badadue tratamendu ugari elikagietan aplikatzen direnak:

- Tratamendu termikoa: eragin desberdinak ditu arrautza zuringoaren alergenengan, baina *Ovomucoid* bero-egonkorra denez, ez da guztiz eraginkorra izango.
- Glikazioa: elikagaien proteina batzuen alergenotasuna murrizteko modu eraginkorra da.
- Hidrolisi entzimatikoa: elikagaien alergenoen hidrolisiak beren alergenotasuna murrizteko gai dela. Adibidez pepsinaren hidrolisiaren bitartez.
- Presio hidrostatikoa: presio handiko tratamenduak ovalbuminaren egituraren aldaketa itzulezinak eragiten zituela jakinarazi zen.
- Irradiazioa: ovoalbuminaren alergenotasuna ere murriztu zuen.
- Gurutze lotura entzimatikoa : zenbait entzimen bidezko gurutzaketak obomukoidearen antigenizitatea murrizten duela jakinarazi zen.

Tratamendu hauetatik entzimatikoak direnak proposatuko ditugu arrautzaren alergenoen presentzia ekiditeko.

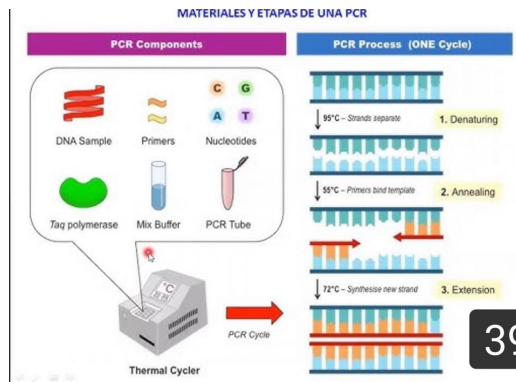
## 2.3. ENTZIMAK

Entzimak giza gorputzean eta elikagaietan dauden molekulak dira erreakzio kimikoak bizkortzen dituztenak. Digestio-entzimak digestioa bizkortzen dute eta listu eta urin gastrikoetan aurkitzen dira. Adibidez, laktasak laktosa digeritzen du eta lipasak gantzak.



## PCR

Teknika honek DNA zati baten berdin-berdinak diren kopia ugari sortzeko balio du polimerasaren kate-erreakzioaren bidez. 1986. urtean asmatu zuen Kay Mullis-ek eta DNA zatiak zelularik gabe klonatzeko aukera ematen du, zuzenean saio-hodi batean. Gaur egun, PCRa guztiz automatikoki egiten da.



Gure proiektuan pepsina bezalako entzima kantitate handiak lortu behar ditugu arrautza tratatzeko. Horretarako entzima horren genea identifikatu (Bos taurus pepsin gene), genearen kopia asko lortu PCR teknikaren bitartez, genea duen plasmidoa edo DNA birkonbinatua lortu eta behin eta berriz plasmido birkonbinatua ekoiztu *E.coli* bakterioan.

## 2.5. ARRAULTZA HIPOALERGENIKORAKO TRATAMENDUAK

- **Tratamendu termikoa:** Berotzeak eragin desberdinak eragiten ditu arrautza zuriaren alergenoen IgE lotzeko ahalmenean. Ovomuroid bero-egonkorra da, eta horrek alergenotasuna laguntzen du elikagaiak prozesatu ondoren.
- **Glikazioa:** Azken berrikuspen batek jakinarazi du glikazioa elikagaien proteina batzuen alergenotasuna murrizteko modu eraginkorra dela. Izan ere, glikazioa ovoalbuminaren IgE lotzeko gaitasuna murrizten zuela aurkitu zen, baina ez ovomukoideak.
- **Hidrolisi entzimatikoa:** Hainbat ikerketek jakinarazi dute elikagaien alergenoen hidrolisiak beren alergenotasuna murrizteko gai dela. Matsuda, Tsuruta, Nakabe eta Nakamura-k (1985) aurkitu zuten pepsinaren hidrolisiak 30 minutuz irakitearen ondoren ovomukoidea sor zezakeela in vivo alergenotasun murriztuarekin.
- **Presio handiko hidrostatikoa:** 400 MPa-ko presio handiko tratamenduak ovalbuminaren egitura sekundarioan eta tertziarioan aldaketa itzulezinak eragiten zituela jakinarazi zen.
- **Irradiazioa:** Irradiazioak kasuen arabera ovomukoidearen IgE lotura murriztu zuen eta ovalbuminaren alergenotasuna ere murriztu zuen.
- **Gurutze lotura entzimatikoa :** Transglutaminasa, peroxidasa, tirosinasa eta

lakasak erabili ohi dira proteinak gurutzatzeko. transglutaminasaren bidezko gurutzaketak ovomukoidearen antigenizitatea murrizten duela jakinarazi zen.

### **3. PROZEDURA**

a- Honako zatiak dituen bektore egokia erosten da:

- Entzima sintetizatzen hasia ahalbidetzen duen promotorea
- Antibiotikoei erresistentzia ematen dien genea
- Errestrikzio entzimek moztuko duten gunea (ECOR I).

b- Erositako bektorea *Escherichia coli* bakterioekin harremanetan jartzen da eta bero golpe/elektroporesiaren bitartez plasmidoak bakterioetan sartuko dira.

c- Bektore honen kopia anitzak egiteko bakterio kultiboak egiten dira muller kreston saldan 12 ordutan 34°Ctan mantenduz. Lortutako kultiboa zentrifugatu eta beheran gelditzen den "pelet"ean bakterioak egongo dira.

d- Plasmidoak isolatzeko bakterioan erauzi egiten dira GeneGET plasmid Miniprep kit-arekin, zelula apurtu eta bertako material genetikoa lortzen da. Helburua plasmido asko eta kromosoma bakteriano gutxi edukitzea da, elektroforesian errazago identifikatzeko.

e- Beste alde batetik gure entzimaren genea isolatzen da eta bere kode genetikoa data-baseetan aurkitu.

f- Genearen kopia anitzak egiteko PCR teknika erabiltzen da.

g- Genearen kopiak eta plasmidoaren kopiak ondo egin direla ziurtatzeko agarosako gelean elektroforesia egiten da.

h- Entzimaren genea plasmidoan txertatzen da errestrikzio entzimak gehituaz, gure kasuan endonukleasa, eta ondoren genea bektorearekin lotzeko ADN ligasa entzima gehitzen da.

i- Lortutako plasmido berria edo DNA birkonbinatua berriz ere *Escherichia coli* bakterioekin harremanetan jartzen da eta bero golpe/elektroporesiaren bitartez plasmidoak bakterioetan sartuko dira.

j- DNA birkonbinatua duten bakterioak hautatzeko antibiotikodun plaka batean jartzen dira, eta bertan plasmidoa duen bakteriak bakarrik hasiko dira antibiotikoei duten erresistentziaren ondorioz.

k- DNA birkonbinatuaren presentzia ziurtatzeko plasmidoen erauzketa egingo da eta ondoren elektroforesia.

l- Kultibo bat egiten da arabinosa azukrea duena promotorea aktibatzeke eta guk hautatutako entzima sortuko da.

m- Entzima purifikatu egiten da.

n- Entzima desberdinak edukita arrautza tratatu da konbinazio eta kontzentrazio desberdinak erabiliz.

n- Tratatutako arrautzan alergenoren desberdinen presentzia analizatuko da arrautza

hipoalergenikoa lortzeko ondoren tratamendu egokiena zehazteko.

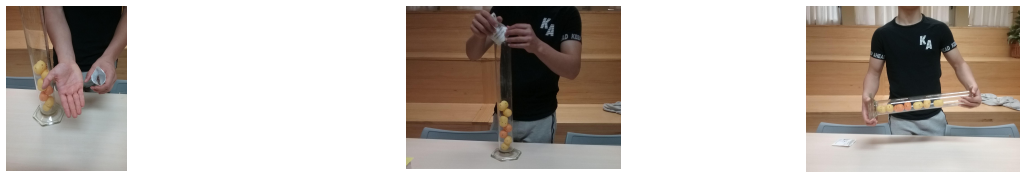
#### **4.- EMAITZAK**

##### **4.1.- DNA birkonbinatua lortzeko teknika ulertzen (maketa)**

Ikerketa egin ari ginenean teknika hau hobeto ulertzeko pieza desberdinekin lotu daiteken maketa bat sortu genuen.



##### **4.2.- DNA birkonbinatua bakterian sartzea edo elektroporesia (maketa)**



Bakterioak irudikatzeko “kinder bueno” potetxoak erabili genituen eta DNA birkonbinantea gomatxo txiki batzuk izango ziren. Potetxoetan zulotxoak egin genituen gomatxoak bakterio barrura nola sartzen ziren ikusteko.

##### **4.3.- Aukeratu ditugun entzima desberdinen kode genetikoaren bilaketa**

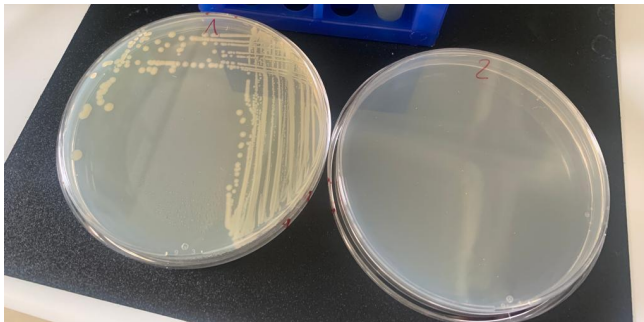
Erabili genuen databasean lau entzimetatik bakarrik pepsinaren kode genetikoak aurkitu genuen.

```
1 ttttccacag tgatgacgag agtggcagcg ttgtgatgtt tggtagcatt gattttctt
61 actacactgg aagcctgaac tgggtgcctg ttctttatga gggctactgg cagatcactc
121 tggacaggtg agagtgc
[ gap 100 bp] Expand\_Ns
238
241 tacttagcat caccatggat ggagagacca tcgctgtgct ttagatgctg caggccattg
301 tggacacggg cactctctg ctggctggcc ccaccagcgc catttccaac atccagagct
361 acattggagc ttctgagaac tctgatggcg aggcgaagtcc ag
[ gap 100 bp] Expand\_Ns
503
541 cctgccccaa cattgtcttc accatcaatg gattccagta cctgtgccc gccagtgcct
601 acatcctgga ggtaaggat c
```

//

##### **4.4.- Petri plaketan erositako bektorea duten bakterio kolonien lorpena**

Laborategian bakterioak erositako bektorearekin gordeta zeuden eta hauek puruak zirela ziurtatzeko bi petri plaka inokulatu ziren. Irudian ikusten den bezala bi plaketatik bakar batean (1ean) lortu genuen bakterioa purua zela konfirmatzea.



#### 4.5.- Saldan bakterio freskoen kultiboaren lorpena

Bakterioen kantite handia lortu zen.



#### 4.6.-DNA birkonbinatuaren presentzia ziurtatzeko elektroforesia agarosa gelean.

ELEKTROFORESIA (I)



Aztertutako 9 laginetatik 3tan agertu zen gure DNA birkonbinatua.



## **5. ONDORIOAK**

Gure helburua arrautza hipoalergeniko bat lortzea izan da, klonazio genetikoaren teknika erabiliz. Horretarako, klonazioaren pausoak ikertu, ulertu eta aurrera eramán ditugu neurri batean, bere konplexutasunak eta aplikazioak ikusiz.

Arrautza hipoalergenikoa lortzeko hasieran batean lau entzima identifikatu genituen arren, pepsinaren kode genetikoak bakarrik lortu dugu. Dena den, beste DNA database batean bilaketa eginez gero, gainerako entzimen kodea edota aminoazidoen sekuntzia lortu daiteke klonazioa aurrera eramateko.

Hala ere, teknikaren konplexutasuna, beharrezko baliabideak eta ikerketa denbora direla eta, arrautza hipoalergenikoa lortzea ezinezkoa izan zaigu. Horregatik, etorkizunerako ikerketa posible izan daitekeelakoan gaude.

## **BIBLIOGRAFIA**

### **Arrautza hipoalergenikoa**

[“Can food processing produce hypoallergenic egg?”](#) Food Science (Egileak: Xiaojuan Ma,Rui Liang,Qianlu Xing,Daniel Lozano-Ojalvo) Data: 2020-08-10

### **Nukleotido sekuentziak**

[“Gene Database” PubMed](#) (Egile:National Library of Medicine National Center of Biotechnology)

### **Klonazioa**

[“Clonación”](#)(Egilea:National Human Genome Research Institute)September 27, 2019

### **Terapia genetikoak**

[“Terapia génica”](#) (Egilea:national human genome research institute) Data: 2022-04-29

### **DNA Klonazioa**

[“Overview: DNA cloning”](#) (Egilea: Khan Academy)

## **ESKERRAK**

Hasteko eskerrak eman Juan Antonio Miguel González-i CIC bioGUNE-n Genética eta Bioinformatikako departamentuan lan egiten duena eta gure proiektua aurrera eramateko ideiak eta informazio iturri baliagarriak eskaini dizkigulako

Eta nola ez Elene Sevillano Peña-ri Euskal Herriko Unibertsitatean Mikrobiologiako departamentuko arduraduna. Bera izan bait delako gure bidelagun proiektua aurrera eramateko eta bere laborategiko ekipamendua erabiltzeko aukera eman digulako.