

Budapesti Corvinus Egyetem

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Főbb gabona allergének immunanalitikai kimutatása

Takács Krisztina

Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

Biológia Osztály

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Fodor Péter,
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem

Témavezető: Dr. Gelencsér Éva
Főosztályvezető, címzetes egyetemi tanár, CSc
Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet
Élelmiszerbiztonsági Főosztály, Biológia Osztály

A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Dr. Fodor Péter
iskolavezető

.....
Dr. Gelencsér Éva
témavezető

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2008. október 7-ei határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Farkas József, MHAS, Budapesti Corvinus Egyetem

Tagjai

Rezessyné Szabó Judit, PhD, Budapesti Corvinus Egyetem

Polgár Marianne, PhD, Heim Pál Gyermekkorház Madarász Kórháza

Barna Mária, CSc, Semmelweis Egyetem

Kiskó Gabriella, PhD, Budapesti Corvinus Egyetem

Opponensek

Lásztity Radomir, DSc, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Varga Zsuzsa, PhD, Semmelweis Egyetem

Titkár

Kiskó Gabriella, PhD, Budapesti Corvinus Egyetem

TARTALOMJEGYZÉK

JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. BEVEZETÉS	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	11
2.1. Az élelmiszerallergia és népegészségügyi kockázata	11
2.2. Gabonaallergia, Cöliákia	14
2.3. Élelmiszer allergének és keresztallergének tulajdonságai	18
2.4. Az allergén aktivitás és a fehérjeszerkezet közötti kapcsolat	19
2.5. Élelmiszer allergének adatbázisai és nomenklatúrája	20
2.6. Fő búza allergének, cöliákia kiváltásáért felelős fehérjék és velük keresztreagáló fehérjék..	22
2.7. Allergének élelmiszerekből való kimutatására alkalmas analitikai módszerek.....	28
2.7.1. A kimutatást befolyásoló tényezők, kimutatási határérték	34
2.7.2. Gluténmentesség kimutatása	37
3. CÉLKITŰZÉSEK	42
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	43
4.1. Anyagok.....	43
4.1.1. Hazai köztermesztésben lévő gabonák és pszeudocereáliák.....	43
4.1.2. Kenyérmodell minták és alapanyagok.....	44
4.1.3. Száraztészta modellek és alapanyagok	45
4.1.4. Humán szérumok.....	46
4.1.5. Egyéb anyagok, reagensek	46
4.2. Módszerek.....	47
4.2.1. A hazai köztermesztésben lévő gabonák és pszeudocereáliák jellemzése.....	47
4.2.2. Búza alapú, gluténnal szennyezett- és gluténmentes diétába illeszthető kenyérmodellek előállítása	48
4.2.3. Száraztészta modellek előállítása és jellemzése	49
4.2.4. Elektroforetikus módszerek	52
4.2.5. Antigen-specifikus poliklonális ellenanyag előállítás, tisztítás (HARBOE and INGILD 1973).....	53
4.2.6. ELISA technikák (TIJSSEN 1985).....	54
4.2.7. Immunblott technikák.....	56
4.2.8. Fehérjeazonosítás folyadékkromatográfiás-tandem tömespektrometriás (LC-MS/MS) módszerrel.....	57
4.2.9. Szerin proteázok és α -amiláz inhibitorok jelenlétének igazolása	58
4.2.10. Pepszines emésztés membránon.....	59
5. EREDMÉNYEK	60
5.1. Hazai gabonák és pszeudocereáliák allergén kockázata.....	61
5.1.1. Gabonák és pszeudocereáliák búza allergén/keresztallergén profiljának <i>in vitro</i> vizsgálata	61
5.1.3. Víz- és sóoldható frakció IgE-reaktív fehérjeinek azonosítása folyadékkromatográfiás-tandem tömespektrometriás (LC-MS/MS) módszerrel	81
5.1.4. α -amiláz és szerin proteináz enzim inhibitorok jelenlétének igazolása	86
5.1.5. IgE-reaktív fehérjék pepszin rezisztencia vizsgálata immunblott technikával	88
5.2. Gliadin-specifikus ELISA-k alkalmazhatósága gliadinnal szennyezett, illetve gluténmentes diétába illeszthető kenyérmodellekben	89
5.3. Gliadinok kimutatási lehetősége hőkezelt és funkcionális adalékokkal minőségileg javított élelmiszer-mátrixban	92

5.3.1. Búza alapú, transzglutamináz enzimmel minőségileg javított száraztészta modellek jellemzése	92
5.3.2. Gluténmentes diétába illeszthető sárgaborsóliszt alapú száraztészta modellek jellemzése	101
5.4. Új tudományos eredmények	104
6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	106
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	109
8. SUMMARY.....	111
MELLÉKLETEK.....	113
M1. Irodalomjegyzék	113
M2. Oldatok, pufferek összetétele	129
M3. Gabonák és pszeudocereáliák fehérje- és szárazanyagtartalma	133
M4. Humán szérumok fehérjékkel szembeni immunreaktivitása immunblott alapján.....	134
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	135

JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AGA	Anti-gliadin antibody, gliadin ellen termeltetett ellenanyag
1D, 2D	1 dimenziós, 2 dimenziós
APC	Antigen Presenting Cell, antigén bemutató sejt
APS	Ammonium persulfate, ammónium perszulfát
BBI	Szója Bowman-Birk tripszin/kimotripszin inhibitor
BSA	Bovine Serum Albumin, marha szérum albumin
CD4+ T-sejtek	Th sejtek
cDNS	Copy DNS, másolati DNS
DBPCFC	Double Blind Placebo Controlled Food Challenge, Kettős vak placebo kontrollált ételprovokációs vizsgálat
DEAE-cellulóz	Diethylaminoethyl cellulose, dietil-amino-etil-cellulóz
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DTT	DL-Dithiothreitol, DL-ditiotreitol
EAST	Enzyme-allergo-sorbent test, enzim-allergo-szorbens teszt
„EF-hand” proteins	kalciumkötő motívum (A kalciumkötő fehérjék közös szerkezeti sajátága az „EF hand” domén, mely egy ún. hélix-hurok-hélix szerkezetű konszenzus aminosavszekvenciát tartalmaz)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay, szilárd fázisú enzimjelzéses immuntechnika
EmA	Endomysial antibodies, endomízium elleni antitest
FcεRI	Az IgE-molekulák Fc részét kötő receptor
FDEIA	Food Dependent, Exercise Induced Anaphylaxis; táplálék függő, mozgás által kiváltott anafilaxia
HLA	Human Leukocyte Antigen, emberi leukocita antigén (az emberi MHC elnevezése)
HMW	High Molecular Weight, nagy molekulatömeg
IEF	Izoelektromos fókuszálás
IFN	Interferonok, különböző sejtek által termelt, immunválaszt szabályozó hatású glikoproteidek
IgA, IgE, IgG	ImmunoglobulinA, E, G
IgA tTG	Tissue transglutaminase IgA antibodies, szöveti transzglutamináz elleni IgA típusú ellenanyag
IL	Interleukin, a leukociták által termelt citokinek egy csoportja
IPG	Immobilized pH gradient, rögzített pH gradiens
IRMM	Institute for Reference Materials and Measurements, Referencia Anyagok és Mértékrendszerek Intézete
kDa	kilodalton
LC-MS/MS	Liquid chromatography–tandem mass spectrometry, folyadékkromatográfiás-tandem tömespektrometriás módszer
LDS	Lithium Dodecyl Sulfate, lítium dodecil szulfát
LMW	Low Molecular Weight, kis molekulatömeg
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level, észlelt kedvezőtlen hatás legalacsonyabb szintje

	(legalacsonyabb allergén mennyiség)
MES	2-N-morpholino ethane sulfonic acid, 2-N-morfolin etán szulfonsav
MHC	Major Histocompatibility Complex, fő hisztokompatibilitási génkomplex, rendkívüli polimorfizmust mutató gének csoportja, melyek termékei a T-limfociták általi antigénfelismerésben fontos szerepet játszó MHC I. ill. MHC II. osztályba tartozó membránfehérjék. Szervátültetéskor transzplantációs antigénként viselkednek.
MLPs	Major Latex Proteins, fő latex fehérjék
Mt	molekulatömeg
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level, Felvételi vagy terhelési küszöb, melynél a káros hatás még nem figyelhető meg (tünet nélkül fogyasztható legnagyobb allergén mennyiség)
nsLTP	Non-specific lipid transport protein, nem-specifikus lipid szállító fehérje
OAS	Oral Allergy Syndrome, orális allergia szindróma
OPD	o-Phenylenediamine dihydrochloride, o-fenilén-diamin dihidroklorid
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis, poliakrilamid gélelektroforézis
PBS	Phosphate Buffered Saline, foszfát pufferolt fiziológiás sóoldat
PCR	Polymerase Chain Reaction, polimeráz láncreakció
pI	Isoelectric point, izoelektromos pont
PR-fehérjék	Pathogenesis-related proteins, patogénre utaló védő fehérjék
PVDF	Polyvinylidene difluoride, polivinilidén-difluorid
R5	Rye5, ω-szekalin (rozs prolamin) antigén ellen termeltetett monoklonális ellenanyag, mely öt aminosavból álló szekvenciát ismer fel
RAST	Radio-allergo-sorbent test, radio-allergo szorbens teszt
RIE	Rocket immunoelectrophoresis, rakéta immunoelektroforézis
RRPs	Ripening Related Proteins, éréssel összefüggő fehérjék
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, nátrium-dodecil szulfát jelenlétében végzett poliakrilamid gélelektroforézis
SPT	Skin Prick Test, allergiás bőrteszt
TCA	Triclore acetic acid, triklór-ecetsav
Tc-sejtek	T cytotoxic cells, a célsejtet MHC-függő módon felismerő és elpusztító effektor T-sejt
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin
TG	Transglutaminase, transzglutamináz
Th-sejtek	T helper-cells, a T-sejtek szubpopulációi. CD4+ reguláló sejtek, melyek az immunválasz folyamán az effektor sejtek képződését segítik elő. A Th-sejt alpopulációk (Th1 és Th2) egymástól eltérő citokon-

	készletet termelnek, ennek megfelelően az immunválaszt elrtérő irányba terelik.
Th1-sejt	Celluláris immunválaszt segítő sejtek
Th2-sejt	Humorális immunválaszt segítő sejtek
TMB	Tetra Methyl Benzidine, tetrametilbenzidin
TNF	Tumor Necrosis Factor, tumor nekrózis faktor (szisztémás gyulladásos folyamatok kialakulásában fontos szerepet játszó citokincsalád)
TPIS	Triose-phosphate isomerase, trióz-foszfát izomeráz
Tri a	<i>Triticum aestivum</i>
Tri m	<i>Triticum monococcum</i>
Tween-20	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate, polioxietilén-szorbitán-monolaurát
WDEIA	Wheat Dependent, Exercise Induced Anaphylaxis; búza függő, mozgás által kiváltott anafilaxia
GRAS	Generally Recognized As Safe, általában biztonságosnak ismert (itt: élelmiszerbiztonsági szempontból)
ppm	Part Per Million, mg/kg vagy µg/g koncentráció
PA ₂	Pea albumin2, borsó albumin 2
Fc-receptor	Az Ig-molekulák Fc részét kötő receptor
tTGA	Tissue transzglutaminase, szöveti transzglutamináz
CX/NFSDU	Codex Committe on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses, Táplálkozástudományi és Különleges Táplálkozási Célú Élelmiszerek Codex Bizottsága

1. BEVEZETÉS

A gabonafélék ősidőktől fogva nagy szerepet játszanak a humán táplálkozásban. Energiatartalmuk mellett rendkívül fontos a tápanyagtartalmuk: szénhidrát- vitamin-, ásványi anyag-, élelmi rost- és fehérjeszükségletünk legfontosabb forrásai.

A cereáliák közül az egyik legértékesebb és legnagyobb területen termelt gabona a búza. Kedvező élettani hatása mellett, mégis az egyik leggyakoribb allergénforrás a cöliákiás és a gabonaallergiás betegek körében egyaránt. A kétféle érzékenység hátterében alapvetően más immunológiai folyamatok húzódnak, és kiváltásukban is más allergének játszanak szerepet. Eddigi ismereteink szerint a gabonaallergiát leggyakrabban kiváltó erős allergén komponensek a gliadinok (α és ω 5), az α -amiláz inhibitorok (CM3, 0.53) és a nem-specifikus lipid transzfer fehérjék. A tünetek széles skáláját okozhatják, mint például búza függő, mozgás által indukált anafilaxiát (Wheat Dependent, Exercise Induced Anaphylaxis, WDEIA), orális allergia szindrómát (Oral Allergy Syndrome, OAS), bőrpírt, viszketést. Az érzékenyítés történhet légzőrendszeren, vagy tápcsatornán keresztül. A cöliákia esetében a búza gliadinok és a gliadinokkal azonos szerkezettel rendelkező prolaminek (rozs szekalin, árpa hordein, zab avenin) a toxikus allergén faktorok, melyek főként bélboholy elváltozást okozhatnak. Mindkét betegségnél az egyetlen gyógymód a tüneteket kiváltó allergének és intolerancia faktorok elkerülése, azaz csak allergénmentes élelmiszerek fogyasztása.

Mivel a búzafehérjékben sok allergén tulajdonságú fehérjét tártak fel, éppen ezért vált indokolttá széles körben való kutatásuk, kémiai-, immunológiai-, orvosi- és molekuláris alapokon nyugvó vizsgálatuk. Ez nem könnyű feladat, hisz a betegekben előforduló klinikai tünetek és a tüneteket kiváltó búza allergének heterogenitása nagymértékben megnehezítik ezeket a vizsgálatokat.

A potenciális fehérje allergének fehérjeszerkezetük alapján immunológiai módszerekkel (pl. ELISA, 1D és 2D immunblott) kimutathatók, majd biotechnológiai úton tiszta rekombináns fehérjeként előállíthatók és jellemezhetők, valamint adatbázisokban közölhetők. A rekombináns technológia megkönnyítette az allergének nagy számban, nagy hozamban, nagy tisztaságban való előállítását, amely során az IgE- illetve IgA-kötő kapacitásuk összehasonlíthatóvá vált a természetben előfordulókéhoz. Ezek az egymásra épülő, egymással kombinálható vizsgálatok, a rekombináns fehérjén alapuló új diagnosztikus eljárások fejlődéséhez nagymértékben hozzájárultak. A diagnosztika fejlődése mellett a toxikus allergén búzskomponensek, élelmiszerekből történő kimutatásának módszerfejlesztése is nagyléptékben haladt előre, fehérje- és DNS alapon egyaránt. A kimutathatóság igénye a fogyasztók és az élelmiszer-előállítók részéről egyaránt felmerült, hisz az élelmiszer-biztonság mindkettőjük szempontjából fontos alapkövetelmény. Az alap kutatások

harmadik fontos eleme lett még a diagnosztika és az allergén fehérjék kimutatási módszerfejlesztése mellett, a cöliákiás és gabonaallergiás betegek számára irányuló diétás élelmiszerek fejlesztése.

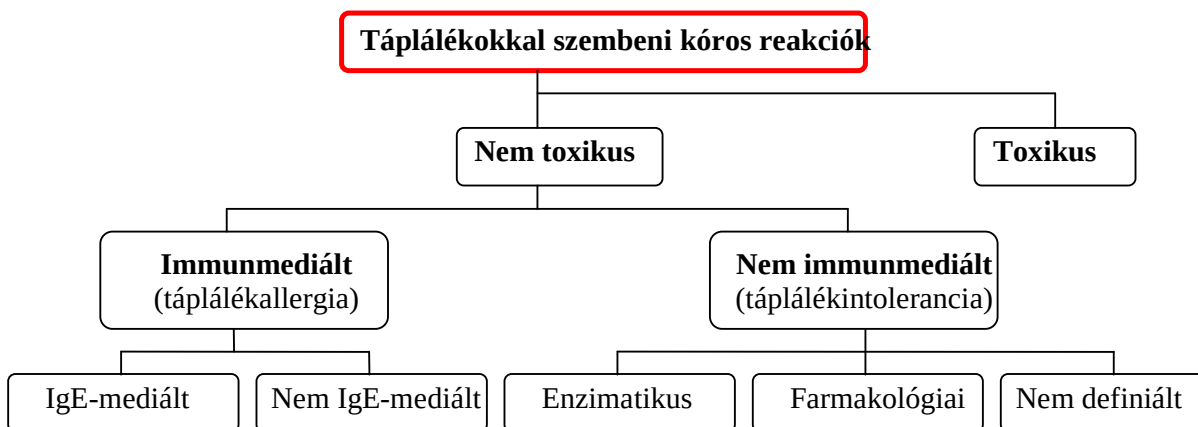
Témaválasztásomat a hazánkban előforduló búzák fehérjéinek szerkezete, funkciója, biológiai aktivitása, és allergenitása közti összefüggések pontosabb ismeretének igénye indokolta. Összehasonlító vizsgálatokat végeztem a különböző búzafajták és más gabonafélék fehérje-összetételére és antigén tulajdonságaira vonatkozóan gliadin- és α -amiláz inhibitor specifikus poliklonális ellenanyaggal. Cöliákiás- és gabonaallergiás humán szérumok felhasználásával a hazai búzák allergén fehérjéit, illetve a velük keresztreagáló hazai gabonák fehérjéit követtem nyomon, és a fő búza allergéneket adatbázisban azonosítottam.

Ezen kívül a búza fehérjéket élelmiszer-mátrixban (tészta) enzimikus módosításnak vettem alá, és ezen enzimikus kezelés hatását vizsgáltam a fehérjék összetételére, és antigenitásának változására vonatkozóan. Végül alapanyagokban, és hőkezelt élelmiszer-mátrixokban (tészták, gluténnal szennyezett kenyerek) a toxikus gliadin komponens kimutathatóságát vizsgáltam különböző immunmódszerekkel (ELISA, gyorseszteszt), továbbá feltérképeztem ezen módszerek specificitását és érzékenységét.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az élelmiszerallergia és népegészségügyi kockázata

Az élelmiszer okozta kóros reakciókat gyakran csak az élelmiszerallergiának tulajdonítják, pedig az élelmiszerallergia azoknak csak egy kis részét képezi. Az élelmiszerekre adott kóros válaszreakciók csoportosítását az **1. ábra** mutatja.



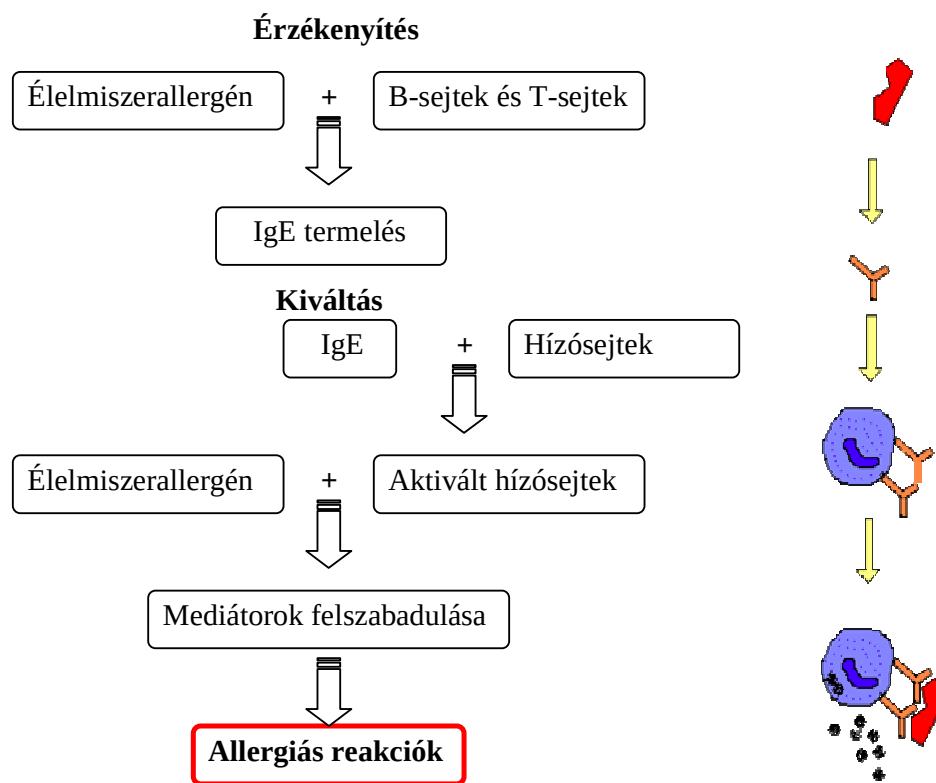
1. ábra: Élelmiszer okozta kóros reakciók (ORTOLANI and PASTORELLO 2006)

Bizonyos élelmiszerekre az érzékenységtől függően kialakuló kóros reakciók lehetnek toxikusak és nem toxikusak (ORTOLANI and PASTORELLO 2006). A reakciókkal járó tünetek az orális irritációtól kezdve a szív és érrendszeri betegségekig terjedhetnek (JACKSON 2003). A toxikus reakciókat, egyéni érzékenységtől független, emberre károsító hatású táplálékok (pl. kontaminált táplálék, nem ehető gomba) okozzák. A nem toxikus reakciók egyéni érzékenységen alapuló reakciók, melyekért egyes tápanyagok vagy azok alkotórészei a felelősek, melyek lehetnek immunmediált és nem-immunmediált reakciók. Az IgE-mediált reakciók atópiás egyéneken figyelhetők meg, akiknél a táplálék vagy táplálékalkotórész allergénként hatva immunológiai folyamatot – IgE ellenanyag-termelést – indít el. Ebbe a csoportba tartozik a „klasszikus”, vagy „valódi” élelmiszerallergiának nevezett betegség. A nem IgE-mediált reakciók a táplálék allergének által kiváltott olyan immunreakciók, amelynek során nem mutatható ki IgE típusú specifikus immunglobulin. Ebbe a csoportba sorolható betegség a cöliákia, valamint az élelmiszerfehérje indukált enterocolitis is (JOHANSSON et al. 2001, SAMPSON 2004). IgE-mediált és nem-IgE mediált mechanizmust egyaránt magába foglaló élelmiszer okozta betegségek is léteznek, mint például az allergiás eozinofil gasztropátia és az atópikus dermatitis (SAMPSON 2004). A nem immunmediált kóros reakciók esetében a tünetek kiváltásában a táplálék okozati szerepe

provokációs tesztekkel igazolható, azonban az immunológiai mechanizmus nem. Ezt a reakciót okozhatja enzimdefektus, gyógyszerek vagy élelmiszer adalékanyagok. Enzimhiányon alapuló táplálékintolerancia bizonyos táplálékok, vagy aditívek fogyasztása esetén jön létre. Ezek azért okoznak klinikai tüneteket, mert a táplálék enzimatis bontása nem történik meg (pl. alkohol intolerancia az aldehid dehidrogenáz hiányakor fordul elő). A farmakológiai táplálékintolerancia kiváltásában vasoaktív aminok, monoaminok, hisztamin felszabadulást kiváltó táplálékok és élelmiszer aditívek játszanak szerepet. A farmakológiai táplálékintolerancia függ a táplálékokban jelen levő vasoaktív anyagok mennyiségétől és az egyén érzékenységétől.

Az élelmiszerallergiás megbetegedések száma évről évre emelkedik, egyre növekvő világproblémává válik. Kialakulásának oka lehet a megnövekedett áteresztőképességű bélhámrendszer, a genetikai hajlam (atópia), az immunszabályozásban bekövetkező zavarok. Kialakulását befolyásolhatják környezeti faktorok, mint például az antigénnel való találkozás, az élelmiszer allergén típusa, az élelmiszer-feldolgozás típusa, az életkor, illetve az immunológia éretlenség (GERGELY and ERDEI 2006, TAYLOR and HEFLE 2001, SAMPSON 2003, MALEKI 2004). Egy korábbi allergiás reakció egy megnövelt kockázatot jelentő jövőbeli komolyabb reakciót is eredményezhet. Az allergia bármely életkorban megjelenhet, csecsemőkorban és kisgyerekkorban gyakrabban fordul elő (5-8%); felnőtteknél ritkábban (2%), váratlanul is megjelenhet akár egy olyan élelmiszer fogyasztása során is, amit a beteg előtte biztonságosan fogyasztott (BESLER 2001, THOMAS et al. 2007). Az allergiát kiváltó fehérje mennyisége 10 mg-tól grammnyi mennyiségig terjedhet, esetenként akár 10 g is lehet (CREVEL et al. 2007).

Az élelmiszerallergia I. típusú túlérzékenységi reakció, amelynek pontosan ismert a patomechanizmusa (**2. ábra**). A nyálkahártyával borított felületeken keresztül a szervezetbe jutó allergént az antigén bemutató sejtek (Antigen Presenting Cells, APCs) a CD4⁺ T-sejteknek prezentálják, melyek aktiválódnak és Th2 limfocitákká differenciálódnak. Ezek a T-sejtek részben a közvetlen kapcsolat, részben az általuk termelt interleukinok (IL-4 és IL-13) révén döntő szerepet játszanak az allergénnel reagáló B-sejtek IgE-termelő plazmasejtté való alakulásában. A termelődött, allergén-specifikus IgE a szervezet különböző szöveteiben elszórtan jelen lévő hízósejteknek és a vér bazofil granulocitáinak nagy affinitású IgE-kötő receptorához (FcεRI) kötődik. Ezek után a szervezetbe ismételt bejutó allergén keresztköti ezeket a receptorokat, ami a granulociták aktiválását és degranulálását eredményezi. A felszabaduló mediátoranyagok a különböző célsejtekre hatva okozzák az allergiás reakciók jellegzetes klinikai tüneteit. A tünetek azonnal, 1-2 percen belül jelentkeznek (ZUERCHER et al. 2006, ORTOLANI and PASTORELLO 2006).



2. ábra. Az élelmiszerallergia hatásmechanizmusa (FDA 2006)

A reakcióval járó tünetek széles skáláján megemlíthető az orális allergia szindróma (ajak, nyelv, szájpadlás irritáció), bőrtünetek (ekcéma), szemirritáció, bélrendszeri panaszok (reflux, hasmenés), légzőszervi tünetek (orrfújás, rhinitis, torokfájás, asztma), szív és érrendszeri betegségek (gyengeség). A légzőszervi és a szív- és érrendszeri betegségek eszméletvesztéshez, anafilaxiás sokkhoz, majd halálhoz vezethetnek (JACKSON 2003). A tünetek, általában a túlérzékenységi reakciót kiváltó anyaggal, az allergénnel való minden egyes érintkezés után fellépnek. A tünetek időlegesek, illetve az élet folyamán elmúlhatnak. A tünetek kezelésére az allergiát kiváltó élelmiszert ki kell hagyni az étrendből. Magát a betegséget vérvizsgálattal, azaz ellenanyag kimutatással (allergén-specifikus IgE antitest kimutatás Radio-Allergo-Szorbens-Tesztel (RAST), össz. IgE kimutatás), allergiás bőrtesztel (Skin Prick Test, SPT), kettős vak placebo kontrollált ételprovokációs vizsgálattal (Double Blind Placebo Controlled Food Challenge, DBPCFC) diagnosztizálják.

Az élelmiszerallergiát az élelmiszerek széles választéka idézi elő. Több mint 160 élelmiszert azonosítottak allergénként (POMS and ANKLAM 2004). A leggyakoribb élelmiszer allergének, melyek az esetek 90%-t okozzák, jelöléskötelezettek: a glutént tartalmazó gabonák, rákfélék, tojás, halak, földimogyoró, szójabab, tej, diófélék, zeller, mustár, szezám, csillagfűrt, puhatestűek és az ezekből készült élelmiszertermékek (2007/68/EK (XI. 27.), 40/2008 (IV. 3.) FVM-SZMM

együttes rendelet 4. számú melléklete). Orális allergiás szindrómát friss zöldségek és gyümölcsök is kiválthatnak, mégsem jelöléskötelezettek, az általuk kiváltott allergia alacsonyabb gyakorisága miatt.

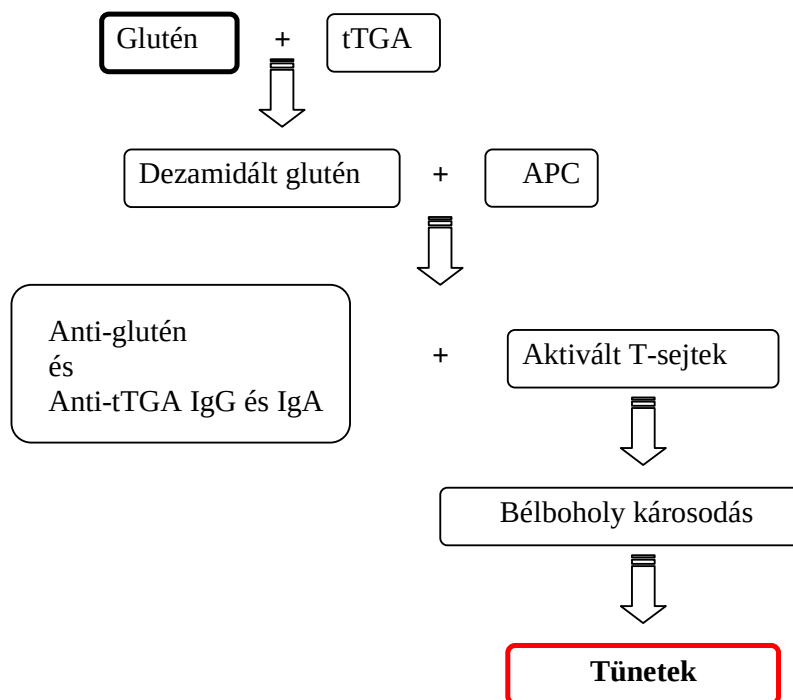
2.2. Gabonaallergia, Cöliákia

Az immunmediált élelmiszer okozta túlérzékenységi reakciókban a gabonaféléknek nagy szerepük van. A gabonafehérjék okozta reakciókkal összefüggésben sok tisztázatlan, vagy többféle értelmezésben használt fogalom van, ami a gyakorlatban diagnosztikus és terápiás tévedésekhez vezethet. Ennek érdekében fontos megkülönböztetni ezeket reakciótípusuk, illetve a reakciót kiváltó allergénjeik szempontjából. A gabonafehérjék a 2.1. pontban ismertetett IgE-mediált allergiás reakciót, valamint T-sejt-mediált cöliakiás reakciót egyaránt kiválthatnak. A gabonafehérjék által kiváltható reakció az érzékenyítés útja alapján lehet táplálékallergia (gabonaallergia, cöliákia), amelynél az érzékenyítés gasztrointesztinális úton történik, vagy légúti allergia (pékasztma). A légúti allergia a gabonaallergia egy olyan fajtája, amelynél az érzékenyítés a légzőrendszeren keresztül történik. Az utóbbi esetében főleg a héjfehérjék, a nsLTP-k és az α -amiláz inhibitorok a tüneteket előidéző allergének.

Gabonaallergia olyan esetekben fejlődik ki, ha az arra érzékeny egyén folyamatosan fogyaszt gabona termékeket, beleértve a kenyeret, tésztát, kekszet, és egyes alkoholos italokat. A fő tünetek már röviddel az első gabona alapú termék elfogyasztása után jelentkeznek (csalánkiütés, kivörösödés, viszketés, arc feldagadása), de néha csak órák múlva alakulnak ki (gyomor/bélrendszeri panaszok). Az utóbbinál nehezebb felismerni, hogy vajon melyik táplálék válthatta ki a reakciót. A gabonaallergia légúti megjelenésének egyik formája a „pékek asztmája”, amelyet a lisztek belélegzése okoz, és mint fő foglalkozási ártalom lép fel. A gabonák kiválthatnak ún. táplálék függő, mozgás által indukált anafilaxiát is (Food Dependent, Exercise Induced Anaphylaxia, FDEIA), amelyet a már korábban megemésztett gabona vált ki, egy bizonyos idő elteltével végzett testmozgás után (MORRIS et al. 2007). A köznyelvben a gabonaallergián a búza, rozs, árpa, zab gluténje okozta allergia értendő. Ugyanakkor a gabonaallergiát okozó fehérjék emellett vízben/sóban oldhatatlan gluténfehérjék, illetve vízben/sóban oldható albumin/globulin gabonafehérjék is lehetnek, és nemcsak az említett négy gabonára vonatkoztatva. A kezelés érdekében a tüneteket kiváltó adott gabonát ki kell vonni az étrendből, kivonás után a tünetek rendszerint megszűnnek. A gabonafélék közötti keresztallergia lehetősége is fennállhat, amely szerint, az egyik gabonaféleségre allergiás egyén a többire is reakciót mutat, mivel az egyes növényekben az immunológiai szempontból szerkezetileg rokon fehérjerészek érzékenyített egyénben kiválthatják az allergiás reakciót. Ugyanígy gyomnövényekkel is kialakulhat

keresztreakció, főleg a pollenszezonban. Fűpollenre, vagy rozspollenre allergiás egyén érzékenységet mutathat gabonafélékre (búza, árpa, zab, kukorica, rizs) is (POLGÁR 2005).

Ezzel szemben a **cöliákia** (gluténszenzitív enteropátia; angolul coeliac sprue, illetve coeliac disease) nem gabonaallergia, valószínűleg autoimmun betegség, de nem halálos kimenetelű. Olyan rendellenesség, melyet a táplálék gluténtartalmával szembeni állandó érzékenység okoz. A betegségre jellemző, hogy az immunrendszer a saját sejtjei, fehérjei (transzglutamináz-2) ellen támad, azokat véli „betolakodónak” (3. ábra).



3. ábra: A cöliákia hatásmechanizmusa (FDA 2006)

A betegség patomechanizmusa még nem teljesen ismert. Valószínű, hogy a gabonafehérje (glutén) az immunrendszert aktiváló módon kerül molekuláris kapcsolatba a szervezet fehérjéivel. A szervezetben megtalálható „szöveti” vagy a 2-es típusú transzglutamináz enzim, jelátvivő anyagként (G-protein) működik. Fontos élettani szerepe van: stabilizálja a kötőszövetet, elősegíti a sebgyógyulást, részt vesz bizonyos idegek működésében, a természetes sejthalál (apoptózis) révén pedig elősegíti a többi sejt védelmét. Intracellulárisan elhelyezkedve az antitestek nem férhetnek hozzá. Ha azonban kijut a sejtek közötti térbe, a kötőszövetbe, az endomízium és a retikulin felszínéhez kapcsolódva fehérje-keresztkötéseket létrehozó enzimként működik. Hozzákapcsolódik a gluténfehérjéhez. A bélhám szöveteiben lévő transzglutamináz enzim (tTGA) így antigénné válik, az ellenanyagok ezt a formáját már képesek felismerni. A T-sejt közvetített B-sejt aktiváció után a

módosított glutén (gliadinok és gluteninek) peptidek elleni IgG és IgA ellenanyagok, valamint tTG elleni ellenanyagok keletkeznek. Az aktivált T-sejtek felelősek tehát azért, hogy az önfelszámolási folyamat alatt a vékonybélbolyhok szerkezetileg átalakulnak, részlegesen elsovad a vékonybél nyálkahártyája, a bél nem képes megfelelően ellátni a feladatát, sérül a felszívódás, leépül a szervezet. Cöliákia esetén a Th1-sejtek kóros túlműködése, aktivizációja történik (SCHUPPAN and HAHN 2002). Az ezekből a limfocitákból felszabaduló citokinek (IL-2, IFN γ , TNF β) a reakció helyszínére vonzzák és aktiválják a makrofágokat és a citotoxikus T-sejteket (T_C-sejteket). A gluténfogyasztás elhagyásával a T-sejt- és ellenanyagválasz megváltozik, és a legtöbb esetben teljes mukózális felújulás, azaz gyógyulás következik be (KAUKINEN et al. 1999, FASANO and CATASSI 2001, CICLITIRA and MOODIE 2003).

A túlérzékenységi mechanizmusok közül a cöliákia IV. típusú, késői hiperszenzitivitású reakció. Cöliákia esetén a búzafajták (durum, spelta, kamut), rozs, tritikálé, árpa, és zab gluténfehérjéi okozzák a tüneteket, melyek rendszerint fokozatosan, lassan, 1-3 napon belül alakulnak ki (LUNDIN et al. 2003, ARENTZ-HANSEN 2004, KASARDA 2004). A rozs, árpa, tritikálé taxonómiaiilag a búzához hasonlóak, hasonló szerkezetű peptideket expresszálnak, ezért toxikusak a búzával együtt a cöliákiásokra nézve (VADER et al. 2002). A zab toxicitása vita tárgya, mivel számos publikáció szerint a zab nem ártalmas a bél nyálkahártyájára (JANATUINEN et al. 2002, HÖGBERT et al. 2004, STORSRUD et al. 2003). Az még nem ismert, hogy esetleg más gabonák fehérjéi okozhatnak-e toxikus reakciót a cöliákiásoknak (KASARDA 2001). A cöliákia az élet folyamán is kialakulhat, de örökletes is lehet: cöliákiára hajlamosító tényezők nagy része a 6-os kromoszóma MHC II. osztályba tartozó HLA alléljeivel áll szoros összefüggésben. A betegek többségénél a HLA-B8, HLA-D3, HLA-DR7, kisebb hányaduknál HLA-DR5 és HLA-DR7 allélek mutathatók ki. A HLA-DQ2 fehérje 95%-ban, a HLA-DQ8 5%-ban viszont minden cöliákiás beteg esetében előfordul, de a nem HLA asszociált gének is szerepet játszanak a betegség keletkezésében (KISS 2004, WOODWARD 2007). A betegség diagnózisa vérvizsgálattal (IgA endomízium ellenanyag (EmA), IgA szöveti transzglutamináz ellenanyag (IgA tTG), gliadin-specifikus IgA és IgG ellenanyag kimutatása), és ismételt (3x-4x) jejunális biopsziával történik. A glutén tartalmú búza-, rozs-, árpa-, zab gabonák gluténje okozta allergia (nem-cöliákiás gluténérzékenység) és a cöliákia közötti különbség csak a cöliákiás diagnosztizálás során derülhet ki, mivel legtöbbször -de nem minden esetben- a megnyilvánuló tünetek (zsírszéklet, pókhas, fejlődés elmaradása, hipovitaminózisok, pszichés és magatartási zavarok) és az allergiát kiváltó fehérjék (búza, rozs, árpa, zab gluténjei) azonosak (<http://www.foodintol.com/celiac.asp>). Az említett gluténallergia esetében a négy gabona taxonómia rokonsága miatt nem javasolt egyik gabona fogyasztása sem, de klinikai tüneteket nem biztos, hogy mindegyik előidézik a betegben. A különbség tehát a tünetek mögötti nagyon különböző immunológiai folyamatokban van. Ebből adódóan a betegség

felismerésére szolgáló vizsgálatok, és a kezelésre vonatkozó utasítások, a két betegség kimenetele, és a gyógyulás hajlama is különböző (1. táblázat).

1. táblázat: Búza, rozs, árpa, zab gluténje okozta gluténszenzitív betegségek közötti azonosságok és különbségek

	Nem-cöliákiás gluténérzékenység (allergia)	Cöliákia
Patomechanizmus	Jól ismert patomechanizmus IgE mediált reakció I. típusú, azonnali	Nem teljesen ismert T-sejt mediált reakció IV. típusú, késői
Életkor	Kialakulhat bármikor, főként felnőttkorban	Kialakulhat bármikor, főként gyermekkorban
Tünetek	Gyomor/bélrendszeri, bőr, légúti	Gyomor/bélrendszeri, extraintesztinális
Vékonybél szöveti elváltozás	Nem jellemző, de előfordulhat	Súlyos boholyatrófia és/vagy jellegzetes szöveti jelek
Genetika	Családi halmozódás, atópia	Családi halmozódás, HLA DQ2 és/vagy HLA DQ8 pozitivitás
Diagnózis	Specifikus IgE antitest szérumból, bőrtesztek	EmA, tTG IgA és IgG, bélbiopszia szövettani lelete
Kezelés	Diéta-nem feltétlenül kell mind a négy gluténra	Diéta-búza, rozs, árpa, zab gluténra
Kimenetele	Megszűnhet	Egész életen át megmarad

Jelenleg nem ismerünk olyan kezelési módot, amely a cöliákiát meg tudná szüntetni. A glutén (búza, rozs, árpa, zab) teljes étrendi kiiktatása viszont megállítja a kóros immunológiai folyamatokat és így, a betegség minden tünete elmúlik, a vékonybél-nyálkahártya teljesen normalizálódik, a beteg teljes életet élhet. A „száműzött” gabonák helyett pl. amaránt, hajdina, kukorica, szója vagy indiai rizsfű, quinoa, vadrizs használható (ARENDT et al. 2004). A cöliákiás diéta életreszóló, míg az allergia esetén előfordulhat, hogy csak egy megadott időre vonatkozik a betartása.

A korszerű cöliákiás vizsgálatoknak köszönhetően már tudjuk, hogy a könnyebben felismerhető, típusos esetek mellett a betegségnek ún. csendes (silent) és latens formája is van. Csendes cöliákiáról akkor beszélünk, mikor látszólag még nincs tünet, de a szervezetben már zajlik a károsító immunfolyamat, kimutatható a vékonybélbolyhok átépülése. A latens cöliákiában szenvedőknek a vizsgálat idején még nincsenek panaszaik, bélbolyhaik épek. Ez a csoport szűrő- és genetikai vizsgálatok kapcsán vált ismertté.

2.3. Élelmiszer allergének és keresztallergének tulajdonságai

A legtöbb élelmiszer számos fehérjét tartalmaz, de nem mindegyik allergén. Az élelmiszer allergének többsége fehérje (gliko-, lipo- és nukleoproteinek), más része poliszacharid vagy lipoid, de az élelmiszerekben maradványként, szennyeződésként előforduló anyagok, antibiotikumok, peszticidek, hormonok, toxinok, egyéb kismolekulák és a részben elbontott immunreaktív komponensek is hordozóhoz kötődve lehetnek allergének. Molekulatömegük 5-70 kDa között mozog, bár vannak oligomer allergének is, melyek 200 kDa molekulatömegűek is lehetnek (BESLER 2001). A tünetekért felelős allergének nem kor-, illetve tünetfüggők (TAKIZAWA et al. 2001). Az allergén jelleg alsó határát a molekulatömeg tekintetében az immunválasz kiváltása, a felsőt pedig a bélfal áteresztőképessége szabja meg. Általános jellemzőjük, hogy hőstabilak, ellenállnak a tápcsatorna enzimeknek (pl. pepszines, tripszines, kimotripszines emésztés), savas izoelektromos ponttal rendelkeznek, technológiai kezelések során stabilan megtartják szerkezetüket és minimálisan két IgE-kötő hellyel rendelkeznek (POMS and ANKLAM 2004). Az élelmiszer allergéneknek két típusát különböztetjük meg (2. táblázat).

2. táblázat: Az élelmiszer allergének tulajdonságai (BAKOS 2006)

	1. típusú	2. típusú (Légúti allergénnel keresztreaktív allergének)
Szenzibilizáció	Gasztrointesztinális úton	Inhalatív-primér légúti allergénnel
Hő- és savstabilitás	Erősen stabil	Általában labilis (OAS), ritkán stabil (szisztémás reakciók)
Klinikai tünetek	Bőrön, gyomorban és bélcsatornában, légzőszervben (anafilaxia)	Szájirritáció (OAS), emésztőrendszer bevezető szakaszában (szisztémás reakciók)
Példák	Tehéntej, tojás, hal, földimogyoró	Gyümölcs (keresztreakál nyírfával, latexel), Feketeüröm (keresztreakál zellerrel, fűszerrel)

Az 1. típusú allergének stabil szerkezetűek, és emésztés során fejtik ki hatásukat. A 2. típusú allergének csak a már korábban légúti allergénnel érzékenyített betegek esetében okoznak lokális -, illetve szisztémás reakciókat. A 2. típusú allergének allergizáló hatása az inhalatív allergénnel történő keresztreakcióban rejlik. A légúti allergén által kiváltott allergiában a légúti allergén az elsődleges, ahol az allergén a légutakon keresztül vált ki reakciót, sorrendben ezt követi a táplálékokkal szemben kialakult reakció. A 2. típusú allergénekre, melyek legtöbbször zöldegekből és a gyümölcsökből származnak, a legjellemzőbb tünet az orális allergia szindróma (OAS), amely gégeödéma, gégeduzzanat esetén életveszélyes anafilaxiás sokká is fajulhat. Ilyen OAS lehet a pollen-élelmiszer szindróma (VIETHS et al. 2002, VIETHS 1997), illetve a latex-élelmiszer szindróma (WAGNER et al. 2004, YAGAMI 2002). A keresztreakció szempontjából a másik lehetőség az, hogy a táplálék az elsődleges allergén, ekkor a gyomor-bélrendszer nyálkahártyáján

keresztül történik az érzékenyítés és ez váltja ki például a háziporátka aktiválódását. Abban az esetben alakul ki a fehérjék között immunológiai keresztreakció, amikor két különböző, de hasonló molekulaméretű fehérje között szerkezeti hasonlóság (részben azonos aminosav szekvencia) található. Keresztreakció nemcsak táplálék - és légúti fehérjék között jöhet létre, hanem azonos állatfajok fehérjéi, azonos növényfajok fehérjéi, távoli állatfajok fehérjéi, távoli növényfajok fehérjéi, illetve növényi és állati eredetű anyagok között egyaránt. A keresztreakció kialakulása független a fehérjék funkciójától, illetve azok oldhatóságától.

2.4. Az allergén aktivitás és a fehérjeszerkezet közötti kapcsolat

A stabilitáson kívül a fehérjék allergén jellege szempontjából nagy szerepet játszik immunogén karakterük. Az immunogenitás a fehérjék olyan képessége, mely során az élő szervezetbe jutva immunválasz kiváltására képesek, azaz az immunkompetens sejteket aktiválva antigén-specifikus ellenanyag-termelést indítanak el. Az immunválaszt kiváltó tulajdonságukat, azaz a fehérjék allergén/antigén jellegét kémiai szerkezetük, és molekulatömegük határozza meg (FAO/WHO 2001b). A natív fehérjemolekulák pontosan meghatározott, állandó térszerkezettel rendelkeznek. Az antigén felületén számos olyan motívum található (epitópok, antigéndeterminánsok, 12-18 aminosav), melyekhez az antitestek specifikusan kötődni tudnak (POMS and ANKLAM 2004). Az epitópok két csoportra oszthatók: szekvenciális (folytonos) és konformációs (nem-folytonos) epitópokra. A szekvenciális epitópokat peptidkötéssel közvetlenül egymáshoz kapcsolt aminosavakból álló rövid lineáris peptidszakaszok (aminosav szekvenciák) alkotják, a konformációs epitópokat pedig a fehérje térszerkezetének kialakulása során egymáshoz szorosan asszociálódott aminosavak alakítják ki (REGENMORTEL 1992). Minél több epitóppal rendelkezik a fehérje, annál nagyobb a specifikus reakcióképességet biztosító antigenitása.

Az utóbbi években nagyszámú táplálék allergént azonosítottak, izoláltak és jellemeztek. Ennek ellenére a fehérje allergének nem írhatók le egy közös, általános szerkezettel (POMÉS 2008). AALBERSE (2001) az ismert szerkezetű élelmiszer allergéneket öt csoportba sorolta a fehérjék harmadlagos szerkezete alapján (**3. táblázat**). Az ismert allergének háromdimenziós szerkezetének vizsgálatából azt a következtetést lehetett levonni, hogy nem rendelkeznek általánosítható, különleges, háromdimenziós szerkezeti vonásokkal, csak azzal a képességgel, hogy el tudják érni és képesek stimulálni az immunsejteket és a hízósejteket.

3. táblázat: Az élelmiszer allergének szerkezet szerinti csoportosítása (AALBERSE 2001)

	Szerkezet	Példák
1.	Anti-paralel β -szerkezet	Szerin proteázok (tripszin), szója KTI
2.	Anti-paralel β -szerkezet és egy vagy több α -hélix asszociációja	β -laktoglobulin (tej)
3.	α - és β -szerkezetek (nem szoros asszociáció)	Lizozim, laktalbumin
4.	α -hélix	nsLTP-k, 2S albuminok (magok), parvalbuminok (halak)
5.	Egyéb szerkezetek	Szerin proteáz inhibitor, (ovalbumin), amiláz, tropomiozin, kis fehérjék

2.5. Élelmiszer allergének adatbázisai és nomenklatúrája

Az allergénként azonosított fehérjék jellemző adatainak tárolására eltérő részletességgel és eltérő filozófiával számos adatbázis jött létre (4. táblázat).

Az allergén adatbázisoknak nagy szerepük van egyrészt a bioinformatikában, mellyel a biotechnológiai úton előállított új élelmiszerek élelmiszer-biztonsági kockázatbecslési vizsgálatát segítik, másrészt az élelmiszer allergén fehérjék szerkezeti és fizikokémiai tulajdonságainak analizésében.

A szekvencia információs adatbázisok csak az ismert allergének aminosav-szekvenciájára utaló adatokat tartalmazzák, de nem ismertetik a fehérje szerkezeti és funkcionális tulajdonságait. A molekuláris információkra fókuszált adatbázisok az aminosav-szekvencia információn kívül a fehérje szerkezetéről-, és az allergén epitóp (ha ismert) elhelyezkedéséről is tájékoztathat. Az általános adatbázisok az allergén fehérjével kapcsolatos információkon (forrás, biológiai funkció, érzékenyítés útja, molekulatömeg, szerkezet, taxonómia) kívül, klinikai, diagnosztikai, biokémiai és epidemiológiai információkat, valamint a témával kapcsolatos folyóiratokat is tartalmazhatják. Az adatbázisok nagyrészt más adatbázisok adataihoz is van hozzáférése. Az adatbázisok közül kilóg az „Allergen Nomenclature”, mely az Immunológiai Társaságok Nemzetközi Szövetségének Allergén Nomenklatúra Albizottsága (International Union of Immunological Societies (IUIS) Allergen Nomenclature Sub-Committee) által elfogadott allergénnek minősült fehérjék uniform és állandó megnevezését biztosítja. Ezt több adatbázis is alkalmazza. A tisztított allergének nomenklatúrája szisztematikus rendszert követ. A jelölés első három betűje a nemzetségre-, az azt követő egy betűje a fajta névre, a végén megjelenő arab szám pedig az allergén azonosításának kronológiai számára utal (pl. Bet v 1 nyírfapollen allergén). A rendszer ugyanazon allergén izoallergénjeit és izoformáit (variánsait) is jelöli (SCHEIN et al. 2007, BRUSIC and PETROVSKY 2003, BRUSIC et al. 2003, MARI et al. 2006, CHAPMAN et al. 2007).

4. táblázat: Allergén-specifikus adatbázisok

Adatbázis	URL (http://)
Szekvencia adatbázisok	
GenBank/GenPept	www.ncbi.nlm.nih.gov
EMBL/TrEMBL	www.ebi.ac.uk/embl
DDBJ/DAD	www.ddbj.nig.ac.jp
SWISS-PROT	www.expasy.ch
Protein Information Resource (PIR)	www.nbrf.georgetown.edu
Protein Data Bank (PDB)	www.rcsb.org/pdb
Nucleic Acids Research database collection	www3.oup.co.uk/nar/database/
Molekuláris adatbázisok	
Biotechnology Information for Food Safety (BIFS) Database (National Center For Food Safety Technology)	www.iit.edu/sgendel/fa.htm
Food Allergy Research and Resource program (FARRP) Allergen Database (University of Nebraska)	www.allergenonline.com
Central Science Laboratory (CSL) Allergen Database (ADB)	www.csl.gov.uk/allergen
Structural Database of Allergenic Proteins (SDAP)	fermi.utmb.edu/SDAP
Allermatch	www.allermatch.org
Allergénekről, allergiáról szóló általános adatbázisok	
Food Allergens of Plant Origin PROTALL	www.ifr.bbsrc.ac.uk/Protall
InformAll	foodallergens.ifr.ac.uk
ALL ALLERGY	www.allallergy.net
Allergome	www.allergome.org
Asthma & Allergy Gene Database	cooke.gsf.de/asthmagen/main.cfm
Allergen Database for Food Safety (ADFS)	allergen.nihs.go.jp/ADFS
ALLERDB	research.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/Allergen/
IMGT Marie-Paule Allergen page	imgt.cines.fr/textes/IMGTeducation/IMGTlexique/A/AllergensBiochemicalData.html
The Immune Epitope Database	www.immuneepitope.org
WebAllergen	weballergen.bii.a-star.edu.sg
Pfam protein family database	www.sanger.ac.uk/Software/Pfam
allergen database for food safety	allergen.nihs.go.jp/ADFS
Food Allergy Research and Resource Program Allergen Database	www.allergenonline.com
Nomenklatura	
Allergen Nomenclature Allergen Nomenclature Sub-Committee of the World Health Organization and International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS)	www.allergen.org

Az allergének szekvenciájáról és szerkezetéről egyre bővülő ismereteinknek köszönhetően, később már az élelmiszer allergéneket családok és szupercsaládok szerint osztályozták a szerkezeti és biokémiai funkcióik szerint. Azok a fehérjék kerültek egy családba, amelyek között 30% vagy

annál nagyobb volt a szekvencia-azonosság, valamint azok a fehérjék, amelyek ugyan 30%-nál alacsonyabb szekvencia-azonosságot mutattak, de funkcióikban és szerkezetükben hasonlóak voltak. A Pfam adatbázis 16.0 verziója 7677 fehérjecsaládot foglal magában (BREITENEDER and MILLS 2005). Ha család és család között alacsony volt a szekvenciabeli azonosság, de a szerkezeti és a funkcionális tulajdonságok közös evolúciós eredetre utaltak, akkor a családokat egy szupercsaládba sorolták (BREITENEDER and RADAUER 2004). Biokémiai funkciójuk alapján a fehérjék lehetnek: hidrolitikus és nem hidrolitikus enzimek, enzim inhibitorok, transzport fehérjék, szabályozó fehérjék, tartalék fehérjék a magban, vagy védekezésben szerepet játszó fehérjék. A növényi eredetű élelmiszer-allergének négy fő csoportját az **5. táblázat** mutatja. Érdekességgéppen elmondható, hogy ezen élelmiszer-allergének 60%-a a prolamin szupercsaládba tartozik. A pollen eredetű allergéneket 29 családba sorolták, de ezek közül a fő pollenallergén családok az expanszinok, a profilinek, és a Ca-kötő fehérjék családja. Az állati eredetű allergének három fő családja a tropomiozinok, az ún. EF-kezű fehérjék („EF-hand” proteins) (köztük paralbuminok), és a kazeinek családja, 14 kisebb család mellett (BREITENEDER 2008).

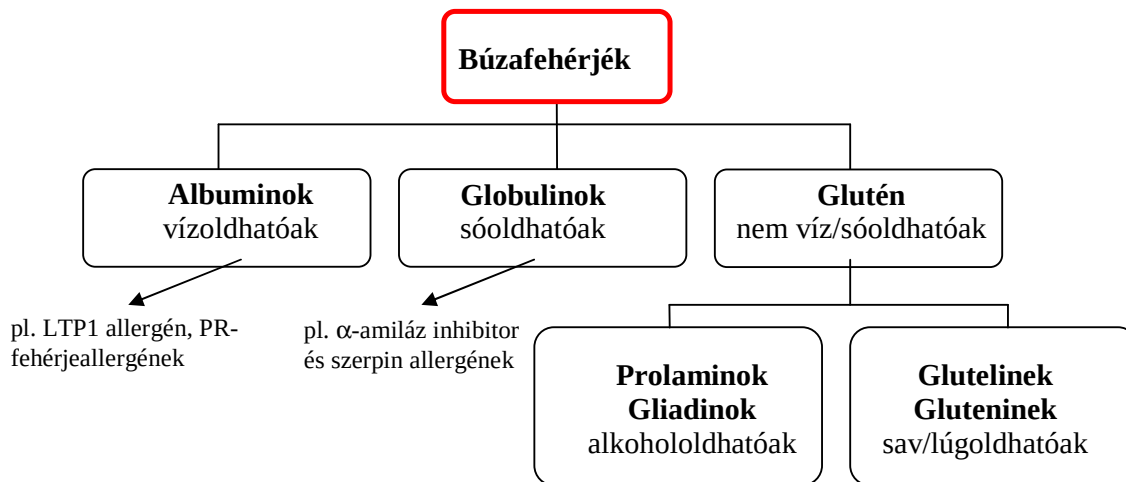
5. táblázat: Növényi eredetű élelmiszer allergének osztályozása (RADAUER et al. 2007)

Fehérje osztályok
I. Prolamin szupercsalád 1. Nem-specifikus lipid transzer fehérje család 2. 2S albumin tartalék fehérje család 3. Gabona eredetű α-amiláz/tripszin inhibitor család 4. Gabona eredetű prolamin család
II. Cupin szupercsalád 1. Vicilin-típusú mag tartalék fehérje család 2. Legumin-típusú mag tartalék fehérje család
III. Bet v 1 szupercsalád 1. PR-10 család 2. Fő latex fehérje család (major latex proteins, MLPs) 3. Éréssel összefüggő fehérje család (Ripening Related Proteins, RRP)
IV. Profilinek

2.6. Fő búza allergének, cöliákia kiváltásáért felelős fehérjék és velük keresztreakáló fehérjék

OSBORNE (1907) nyomán a gabonafehérjéről szóló szakirodalomban igen elterjedt a gabonafehérjék oldhatóság szerinti csoportosítása. Ezen az alapon vízzoldható albuminokat, sóoldható globulinokat, alkohololdható prolaminokat, és sav-, illetve lúgoldható glutelineket különböztetnek meg. OSBORNE (1907) nyomán a búza endospermium tartalék fehérjéit gliadinokra, illetve gluteninekre osztották (LÁSZTITY 1999), aszerint, hogy 70%-os alkoholban,

illetve híg savban vagy lúgban oldódnak-e (**4. ábra**). Az albuminok, globulinok a fehérjék 20-50%-át, míg a glutén frakció a fehérjék 50-80%-át teszik ki. A prolaminek szekvencia szerint kén-szegény – (pl. ω -gliadin), kén-gazdag – (pl. α , γ -gliadin, LMW glutenin) és HMW prolaminekra -, a prolaminek gliadinok pedig elektroforetikus mobilitásuk alapján α , β , γ , ω -gliadinokra is csoportosíthatók. Néhány gabona prolamintartalma a következő: búza gliadin 69%, kukorica zein 55%, árpa hordein 46-52%, rozs szekalin 30-50%, zab avenin 16%, rizs orzenin 5% (<http://www.immunocapinvitrosight.com>).



4. ábra: Osborne szerint frakcionált búzafehérjék

A búzafehérjék több mint 300 fehérjéje közül csak néhányat (>70) azonosítottak allergénként. A búzafehérjék víz- és sóoldható frakciója (albuminok/globulinok) is és a víz- és sóoldhatatlan frakciója (gliadinok, gluteninek) is jelentős allergénforrás (WALSH et al. 1985), mégis a víz- és sóoldható frakció képviseli a legfontosabb allergének csoportját (BITTNER et al. 2008).

A búza allergének azonosítására és jellemzésére az elektroforetikus módszerekkel kombinált IgE immunblott (1D, 2D) alkalmazása terjedt el. Manapság az elektroforetikus úton való fehérje-elválasztás a kromatográfiás elválasztással szemben nagyobb előnyben részesül, hisz általa, a búzaliszt komplett fehérje-összetétele feloldásra kerül, valamint a vizsgálat nagyobb felbontásban elvégezhető, így a felelős allergének könnyebben jellemezhetők (BAUR and POSCH 1998).

Számos irodalomban olvasható, hogy a különböző búza pozitív humán szérumok különböző búzafehérjéket ismertek fel, amelyek rendkívül heterogén és egyedi immunblott-mintázatot eredményeztek. SANDIFORD et al. (1997) 12, 21, 26, 33, 69 kDa-nál, VARJONEN et al. (1995) 26, 38, 69 kDa-nál, HOUBA et al. (1996) 14, 30, 32 kDa-nál azonosítottak erős IgE-kötő tulajdonsággal rendelkező búzafehérjéket. JONES et al. (1995) 20 és 47 kDa búzafehérjéknél, emésztés után mutattak ki IgE-reaktivitást.

A molekulatömeg alapján azonosított IgE-kötő allergén fehérjék közül csak néhányat azonosítottak és jellemeztek molekuláris szinten (6. táblázat).

6. táblázat: Szekvencia alapján beazonosított búza allergének

α -amiláz inhibitorok Heterotetramer alegységek: WTAI-CM2 (14 kDa) WTAI-CM3B (14 kDa) WTAI-CM16 (16 kDa) WTAI-CM16* (16 kDa) Homodimer alegységek: WDAI-1 (15 kDa) WDAI-1 és/vagy WDAI-2 Monomer WMAI-1 (14 kDa)	WALSCH et al. 1989 ARMENTIA et al. 1993 FRANKEN et al. 1994 POSCH et al. 1995
Tri a Bd 17K (α -amiláz inhibitor CM16 homológ)	YAMASHITA et al. 2001
Agglutinin homodimer alegység: WGA (17 kDa)	SUTTON et al. 1984
Agglutinin isolectin 1 (Tri a 18)	http://allallergy.net/databases, www.allergen.org
Acil-CoA oxidáz (rizs homológ) (27 kDa)	POSCH et al. 1995
Fruktóz-biszfoszfát aldoláz (rizs homológ) (37 kDa)	WEISS et al. 1997
Tri m peroxidáz (36 kDa)	SANCHEZ-MONGE et al. 1997
Tri a peroxidáz (60 kDa)	WATANABE et al. 2001
Tri a Bd 36K	YAMASHITA et al. 2002
Tri a trióz-foszfát izomeráz (TPIS)	ROZYNEK et al. 2002
Thioredoxin (Tri a 25)	WEICHEL et al. 2006a,b, www.allergen.org
Szerpin, szerin-karboxipeptidáz	AKAGAWA et al. 2007, WEICHEL et al. 2006a
β -Purthionin	WEICHEL et al. 2006a
Glicerinaldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz	AKAGAWA et al. 2007
α -, β -, γ -, ω 5-Gliadin (Tri a 19)	BITTNER et al. 2008 http://allallergy.net/databases, www.allergen.org
HMW glutenin Glutenin (Tri a 26)	www.allergen.org
ns LTP1 (Tri a 14)	www.allergen.org
Tri a LTP	ASERO et al. 2000
Profilinek (Tri a 2.1; Tri a 2.2; Tri a 2.3; Tri a 12)	http://allallergy.net/databases
Tri a kitináz	DIAZ-PERALES et al. 1999
Tri a germin	JENSEN-JAROLIM et al. 2002

Ezek közé tartoznak a víz- és sóoldható frakción belül a különböző 14-17 kDa közötti α -amiláz/tripszin inhibitor család fehérjéi (GOMEZ et al. 1990), beleértve a tetramer α -amiláz inhibitor CM2, CM3, CM16 alegységeket (ARMENTIA et al. 1993, ZAPATERO et al. 2003), a dimer α -amiláz inhibitor (ARMENTIA et al. 1993, POSCH et al. 1995, AMANO et al. 1998, RASANEN et al. 1994, FRANKEN et al. 1994), a monomer α -amiláz inhibitor (ARMENTIA et al. 1993, AMANO et al. 1998) és egy rozs eredetű tripszin inhibitorhoz homológ fehérjét (AMANO et

al. 1998). Ezek a fehérjék főként a pékasztma, kevésbé az élelmiszerallergia kiváltói. JAMES et al. (1997) demonstrálták, hogy a dimer búza α -amiláz inhibitor alegység (15 kDa) emésztés után is allergiát okozott.

AMANO et al. (1998) a monomer α -amilázok közül a 0.19-et és a 0.28-at találták a legerősebb immunreaktív fehérjéknek. KUASABA-NAKAYAMA et al. (2000) kutatásai szerint az atópikus dermatitiszben szenvedő japán betegek széruma a tetramer α -amiláz alegységek közül csak a CM3-al (14 kDa) mutatott IgE-reaktivitást. Tehát a CM3 alegységek nemcsak a pékasztma, hanem az atópikus dermatitisz kiváltásáért is felelős allergének. TSUJI et al. (2001) 17 kDa-nál azonosítottak α -amiláz inhibitor glikozilált alegységeket (CM16, CM17). YAMASHITA et al. (2001) egy CM16-al homológ Tri a Bd 17K fehérjét azonosítottak.

POSCH et al. (1995) 2D-n 5,5-6,8 pH között történő elektroforetikus elválasztást fehérjeanalízissel kombinálva azonosítottak búza allergéneket. Körülbelül 700 oldható polipeptidből 70-80 mutatott IgE-reaktivitást púlozott (kevert) búza-pozitív szérummal, de az érzékenyítés gyakoriságát nem mérték. Az IgE-kötés domináns helyei a gélképen a következők voltak: 14-18 kDa, 27 kDa (pI 5,8-6,8), 37 kDa, 55 kDa (pI 5,9-6,5) és 70 kDa (pI 5,5-6,1). Fehérjeszekvencia és aminosav-összetétel analízissel búza-, árpa-, kukorica- és rizs- eredetű α -amiláz inhibitorokat (14-18 kDa), - acil-CoA-oxidázt (26 kDa), - fruktóz-biszfoszfátáz aldolázt (37 kDa) azonosítottak.

SUTTON et al. (1984) szerint egy homodimer agglutinin alegység (17 kDa) szintén mutatott IgE-kötő tulajdonságot.

KITTA et al. (2006) 2D-s elválasztást követő MALDI TOF MS-el 2 fehérjesávot CM17 fehérje prekuzorral, illetve CM16 fehérje prekuzorral azonos aminosav-szekvenciájúnak, egy fehérjesávot pedig LTP1 prekuzorral homológiának találtak.

PALACIN et al. (2007) nsLTP1-t (Tri a 14) pékasztmás betegek szérumával ismertek fel. A ns LTP-k 9 kDa (90-95 aminosav) alapú polipeptidek. Az LTP-k valószínűleg szájon át érzékenyítenek, de légúti allergének is lehetnek.

SANCHEZ-MONGE et al. (1997) *T. monococcum* búzában egy búzaliszt peroxidázt (Tri m peroxidáz, 36 kDa) azonosítottak, melyet 6/10 búza-pozitív szérum IgE ellenanyaga felismert. Az érzékenyítés inhalációval történt. *T. aestivum* búzában YAMASHITA et al. (2002) egy Tri a Bd 36K fehérjét, míg WATANABE et al. (2001) egy 60 kDa-os Tri a peroxidáz fehérjét találtak.

AKAGAWA et al. (2007) a búzaliszt teljes fehérje-extraktját 2D SDS-PAGE-val történő elválasztás után IgE-szérummal reagáltatták. A több mint 200 fehérjepontból (különböző pI-vel, különböző Mt-vel) 23 fehérjepont reagált az IgE-ellenanyaggal. Öt allergént azonosítottak: köztük szerpint, α -amiláz inhibitor, γ -gliadint és HMW glutenint. Megemlítették, hogy a búza víz- és

sóoldható frakciójában lévő glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (20-70 kDa) szintén a pékasztma egyik fő allergénje.

PASTORELLO et al. (2007) α -amiláz inhibitor, LTP-t (9 kDa), LMW glutenin alegységeket azonosítottak. ASERO et al. (2000) szintén egy Tri a LTP-t azonosítottak.

WEICHEL et al. (2006a,b) fág vektorban előállított cDNS alapján szelektáltak és azonosítottak IgE-kötő fehérjéket, amelyek a következők voltak: α -amiláz/tripszin inhibitor család tagjai, α -, β -, γ -gliadinok, szerin-karboxipeptidáz, β -purthionin, thioredoxin (Tri a 25; 13,4-15 kDa).

DIAZ-PERALES et al. (1999) egy Tri a kitináz fehérjét, JENSEN-JAROLIM et al. (2002) Tri a germin glikoproteint azonosítottak, amelyek biotikus és abiotikus stressz hatására keletkeztek.

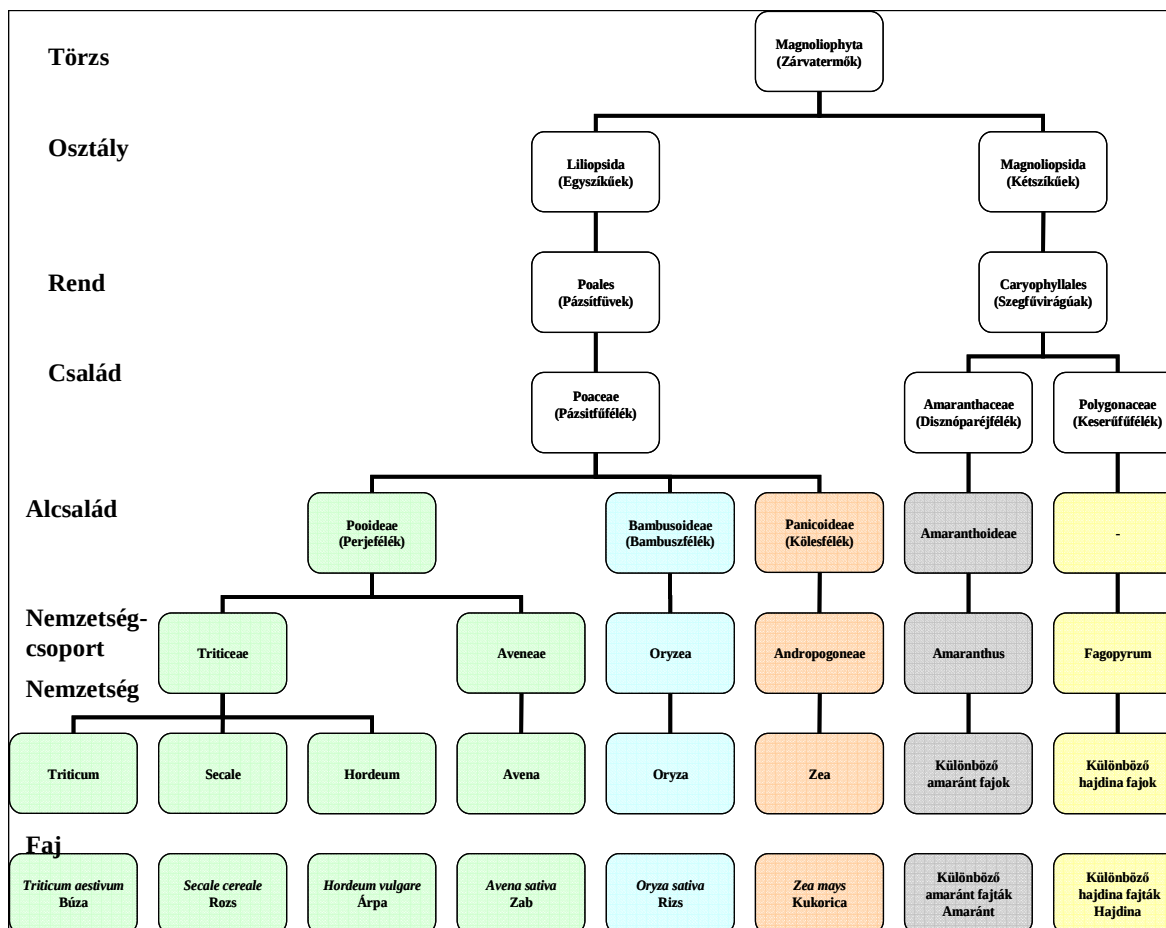
ROZYNEK et al. (2002) egy triózfoszfát izomerázt (Tri a TPIS) azonosítottak, mely pékek esetében szintén inhalációs allergén.

A víz- és sóoldhatatlan frakció fehérjéi közül az α -, β -, γ -, ω -gliadinokat, és a LMW/HMW glutenin-alegységeket sokan a pékasztma allergénjeként azonosítottak (WATANABE et al. 1995, MARUYAMA et al. 1998, SANDIFORD et al. 1997, BITTNER et al. 2008). PALOSUO et al. (2001) vizsgálatai szerint az ω -gliadinok nemcsak a pékasztma, hanem a WDEIA, és az élelmiszerallergia kiváltói is. MORITA et al. (2007) a HMW glutenineket is a WDEIA tünetkiváltójaként közölték az ω -gliadinok mellett (MATSUO et al. 2004).

A fehérjék között keresztreakció is létrejöhet. A keresztreakció szerint az egyik fehérjére specifikus ellenanyag a másik fehérjében található, szerkezetileg homológ szekvenciát (epitópot) is felismeri. Keresztreakció lehet fajtaazonos búzafehérjék között, különböző búzafajták fehérjéi között, illetve búza és más gabonák fehérjéi között is. BORGHI et al. (1996) Einkorn búzák, különösen a *T. monococcum* fajták gliadin fehérjéi közötti keresztreaktivitást figyelték meg, valamint azt tapasztalták, hogy ezek a fehérjék a kenyér- és tésztabúzákhöz képest kevésbé voltak toxikusak a cöliákiások számára. A legtöbb Einkorn búzavonalban kevesebb az α -amiláz inhibitor komponens, mint a kenyér- és tésztabúzában, ennek ellenére a lisztjeik és a víz- és sóoldható frakciói (20-60 kDa) némi IgE-keresztreaktivitást mutatnak (SANCHEZ-MONGE et al. 1996).

Nagy valószínűséggel keresztreakció, a közeli rokonságban lévő gabonafajok fehérjéi között jöhet létre. Az **5. ábrán** jól látható, hogy a búza, a rozs, az árpa és a tritikálé fehérjéi közötti keresztreakció a legvalószínűbb, bár a rokonságilag távolabbi zab, kukorica, és rizs is keresztregáló lehet velük. BLOCK et al. (1984) RAST inhibíciós teszttel mutatták ki, hogy keresztreaktivitás nemcsak búza, rozs, árpa és zablisztek között lehet, hanem az említett gabonák és a kukorica és a rizs között is. Laborvizsgálatok szerint a búzaliszt allergének részleges immunológiai azonosságot mutattak a rozslisztek mellett fűpollenekkel is (BJORKSTEN et al. 1977, SUPHIOGLU et al. 1998, JONES et al. 1995). A kétszikűek közé sorolt amaránt és hajdina

nagyon távoli rokonságban van az előbb említettekkel, így a fehérjék keresztreakciójára kisebb az esély.



5. ábra: Rokonsági fa gabonafélék és pszeudocereáliák esetében

A keresztreakció nem feltétlen azonos oldékonyságú fehérjék között jön létre, hisz különböző prolaminok között, különböző víz- és sóoldható fehérje között, valamint a prolaminok és a víz- és sóoldható albumin/globulin fehérjék között is lehet aminosavszekvencia hasonlóság (BATTALIS et al. 2005). A különböző gliadin-alegységek (α , β , γ , ω) aminosavszekvenciái és 3D-s szerkezete között homológia van (BITTNER et al. 2008). Immunblott vizsgálatok igazolták, hogy az ω 5-gliadinokra érzékeny WDEIA-s betegségek keresztreakáltak γ -gliadinokkal és más gabonák prolamin fehérjéivel, mint a rozs γ -70 (70 kDa) és γ -35 szekalinokkal (32 kDa) és az árpa γ -3 hordeinekkal (34 kDa). Ez azt jelenti, hogy a rozs és az árpa is előidézhethet tüneteket WDEIA-ban szenvedő betegekben (MORITA et al. 2003). ELISA-val vizsgálva γ -70 szekalinokkal szemben 21/23 (91%) -, γ -35 szekalinokkal szemben 19/23 (83%) -, γ -3 hordeinekkal szemben pedig 21/23 (91%) WDEIA-s betegségek mutattak IgE reaktivitást. Bőrpróbánál γ -70 szekalinokkal szemben

10/15 (67%) -, γ -35 szekalinokkal szemben 3/15 (20%) - és a γ -3 hordeinekkal szemben 7/15 (47%) betegnél lett pozitív a teszt (PALOSUO et al. 2001). A legtöbb búza és rozs szerpin reaktív-centrum-szekvenciái hasonlóságot mutattak a prolamin tartalmú fehérjék glutaminban gazdag, ismétlődő szekvenciáival (<http://www.cbms.mq.edu.au/-plantserpins/SERineProteinaseINhibitor>). A búza triózfoszfát izomeráz fehérjéje keresztreagál más gabonák triózfoszfát izomeráz fehérjéivel (ROZYNEK et al. 2002). A búza thioredoxinnal (Tri a 25) érzékenyített pékasztmás betegek széruma IgE-keresztaktivitást mutatott a kukorica thioredoxin-h1-el (Zea mays allergen 25 (Zea m 25), a 74%-os szekvencia-azonosságnak köszönhetően. A búza LTP (Tri a 14) és a barack LTP (Pru p 3) között 45%-os szekvencia-azonosságot állapítottak meg, de a búza LTP-re érzékeny humán szérumokkal végzett vizsgálatoknál csak néhány embernél volt kimutatható a keresztreakció. Ez rámutatott arra, hogy nagy a különbség a 3D-s IgE-kötő részekben (PALACIN et al. 2007). ASERO et al. (2000) azt is megállapították, hogy a *spelta* búzában lévő LTP az árpa-, a rizs-, a kukorica- és az őszibarack LTP-vel is keresztreagál. IZUMI et al. (1992) a rizs, árpa és búza α -amiláz inhibitorok között igazolták a keresztreakciót. DIAZ-PERALES et al. (1999) vizsgálatai szerint a latex-zöltség allergiás betegekből származó anonim szérumok a búza kitinázt is felismerték. A védő (PR)-fehérjék ugyanis gyakran mutatnak keresztaktivitást latex allergénekkal, vagy gyümölcs- és zöltség eredetű orális allergia szindrómát (OAS) kiváltó allergénekkal, illetve pollénnel asszociált légúti allergénekkal (YAGAMI 2002).

2.7. Allergének élelmiszerekből való kimutatására alkalmas analitikai módszerek

Az élelmiszer-biztonsággal kapcsolatos módszertani fejlesztések között kiemelt szerepet kapott a táplálék allergének kimutatása és mennyiségi meghatározása, mivel a fogyasztói bizalom helyreállítása érdekében ezek jelölése és nyomonkövethetősége az EU-s szabályozásnak (2000/13/EK módosítására: 2003/89/EK; 2006/142/EK; 2007/68/EK) megfelelően kötelezővé vált. Az allergénekkal kapcsolatos EU-s szabályozás magyar megfelelői: a 19/2004 (II. 26.) FVM-EszCsM-GKM együttes rendelet és ennek módosított mellékletei (167/2004 (XI. 29.) FVM-EÜM-SZMM, 38/2005 (IV. 27.) FVM-EÜM-SZMM, 86/2007 (VIII. 17.) FVM-EÜM-SZMM, 40/2008 FVM-SZMM (IV. 3.)), valamint a 90/2005 (X.13.) FVM-EÜM-GKM együttes rendelete (R.4. sz. melléklete I. II. fejezetek).

Az analitikai módszerekkel szemben felállított elvárás a magas specificitás és érzékenység, a még nyomokban előforduló allergének érzékelésére is, valamint a robosztusság, a gyorsaság, a megbízhatóság és a költség-hatékonyság. Jelenleg az allergének élelmiszerekből való kimutatása immunológiai alapokon nyugszik a rutin analízisben. Ilyen módszerek a gélelektroforézissel

és/vagy izoelektromos fókuszálással (1D/2D) elválasztott fehérje-kivonatok immunblott vizsgálata, dotblott, rakéta immunoelektroforézis (Rocket immunoelectrophoresis, RIE), immunkromatográfiás gyorsteszt, ELISA, radio-allergo-szorbens teszt (RAST), enzim-allergo-szorbens teszt (EAST), ahol IgE-specifikus humán szérumok vagy poliklonális ellenanyagok felhasználásával történik a vizsgálat (BESLER 2001, POMS et al. 2004). A RIE, az immunblott, a dotblott, az immunkromatográfiás gyorsteszt, a RAST és az EAST kvalitatív és fél-quantitatív-, míg az ELISA kvantitatív eredménnyel szolgál.

Az elektroforézis olyan elválasztási technika, amelyben a molekulák elektromos erőter hatására különbözőképpen mozdnak el, és ezáltal szétválaszthatók. A gélelektroforézis esetén a közeg, amiben a molekulák mozognak hidrogél, leggyakrabban poliakrilamid, néha agaróz. Poliakrilamid gél esetében a lineáris poliakrilamid láncokat bisz-akrilamiddal térhálósítják. Az akrilamid koncentrációval jellemezhető a gél „sűrűsége” (3-30%). A polimerizációhoz szükség van TEMED (tetrametil-etilén-diamin) katalizátorra, a polimerizáció megindulásáért ammónium-perszulfátra, valamint oxigénmentes közegre. Sűrűsége szerint a gél lehet: homogén, discontinuous és gradiens. A **discontinuous gélnél** a tényleges futtató gél fölött tömörítő gélszakasz van. Célja a viszonylag nagy mintatérfogatban lévő fehérjék összetömörítése egy csíkba, hogy azután jól elváló, jól észlelhető csíkokat kaphassunk. A tömörítő gélszakasz összetétele olyan, hogy ott gyorsabban vándorolnak a fehérjék: vezetőképessége és sűrűsége kisebb. Amikor a molekulák kiérnek a tömörítő gélszakaszból, akkor hirtelen lefékeződnek, összevárják egymást. A **gradiens gélek** sűrűsége a futtatási szakasz mentén folyamatosan változik, növekszik. Célja az egy gélen szélesebb móltömeg-tartomány átfogása.

A **poliakrilamid gélelektroforézis (natív PAGE)** elve a méret és töltés szerinti elválasztás. A nagyobb töltésű, illetve a kisebb méretű molekulák gyorsabban vándorolnak a gélben. A minták előkészítésekor a minta sűrűségét cukoroldattal vagy glicerinnel kell beállítani, majd markert kell hozzáadni. A marker olyan festék, ami a futtatásnál „előre” halad, és ezzel vizuálisan követhető a folyamat. **SDS-poliakrilamid gélelektroforézisről (SDS-PAGE)** akkor beszélünk, ha a fehérjék denaturálását redukálószerekkel és detergenssekkel (legtöbbször merkaptó-etanollal és nátrium dodecil-szulfáttal (SDS)) kezeljük. Az SDS és a redukálás hatására a diszulfid hidak felbomlanak. A fehérjére SDS-molekulák tapadnak, amelyek a pozitív töltéseket leárnyékolják, és az apoláris részekre negatív töltéseket ragasztanak. Így minden fehérje negatív töltésű lesz. Mindegyik egy irányba (az anód felé) vándorol. A vándorlási sebességet csak a méret szabja meg.

A fehérjecsíkok szabad szemmel nem láthatók, ezért festési eljárásokkal „hívják elő”. A festés előtti fehérje-fixálás savas reagensekkel (perklórsav, szulfoszalicilsav) történik. A festésre a Coomassie Blue R250 a legáltalánosabban használt festék, mely kék színt ad és elég érzékeny. Ezüst-festés esetén, ezüst-nitrát oldatból a fehérjékre barna fémezüst-kolloid csapódik le. Érzékenysége 5-100-

szorosa lehet a Coomassie Blue festéssel történt fehérje kimutatáshoz képest, ezért széles körben használják, de alkalmazása igen tiszta körülményeket igényel. Az Amido Black és a Fast Green-festékek ritkán használatosak. A moltömeg meghatározásához a futtatást kalibrálni kell, ezért minden gélen futtatnak ismert moltömegű fehérjéket (kalibrációs „létra”) (LAEMMLI 1970).

Az **izoelektromos fókuszálás** (IEF) egy pH-gradiensben lejátszódó elektroforézis. Az eltérő töltésű részecskék a feszültség hatására kialakuló pH-gradiensnek megfelelően töltésük szerint vándorolnak és az izoelektromos pontnak megfelelő pH-értéknél helyezkednek el. A pH-gradienst amfolitok, azaz kis molekulatömegű (300-900 Da) amfoter anyagok (40-50 féle) keveréke szolgáltatja. Ezek szintetikus ikerionos molekulák, melyek izoelektromos pontjukban különböznek. A gyártó cégtől függően amino-, karboxil- és szulfo-csoportokat tartalmaznak (HAJÓS and IDEI 2001).

A fehérjék alegységeinek felbontását szolgáló leghatékonyabb technika a **kétdimenziós gélelektroforézis** (2D), amely az izoelektromos fókuszálást és az SDS-PAGE-t kombinálva, összetett fehérje- és peptid-rendszerek (1000-2000 db.) elválasztására alkalmas. A vizsgálandó fehérjéket az első dimenzióban rögzített pH gradiensben, izoelektromos fókuszálással választják el. Az előre elkészített immobilizált pH gradienst tartalmazó (IPG) gélcsíkok karboxil-sav, vagy tercier amino csoportot tartalmazó akrilamid-származékokkal készülnek, amelyek kopolimerizálódnak az akrilamiddal és a bisz-akrilamiddal. Az így kialakított pH gradiens az elektroforézis alatt nem változik, így reprodukálható eredményeket biztosít. A második dimenzióban molekulatömeg szerint történik az elválasztás SDS gélelektroforézissel. Az eltérő 2D gélek képeinek speciális szoftverrel történő összehasonlítása egy különbségi fehérjetérképet eredményez, amely egyes fehérje alegységekben lévő csoportok jelenlétét, hiányát, azok mennyiségi viszonyait mutatja. A módszer nagy hatékonysága miatt fontos szerepet játszik a proteomikai kutatások területén, ahol az eredményül kapott szekvencia információk, a genomikai kutatások eredményeivel kiegészítve, nagyban hozzájárulnak a fehérjék funkcióinak megértéséhez (RIGHETTI 1985).

Az **immunblottolás** fehérjelenyomat készítést jelent, mely során az elválasztott fehérjék a gélből elektroforetikusán átvihetők (blottolhatók) szintetikus membránra (PVDF, nitrocellulóz), és a membránon speciális eljárással kimutathatók. A membránra átvitt fehérjék könnyen hozzáférhetővé válnak az antitest, illetve a speciális reagensek számára szilárd fázisban.

A **dotblottolás** során a fehérje-extraktot egy a vizsgálandó allergénnel korábban érzékenyített poliészter lapra csöppentik. A kialakult immunkomplexet egy második, jelzett ellenanyaggal detektálják. A módszer kiválóan alkalmas az élelmiszerminták szűrésére, ahol a foltok intenzitása az antigén mennyiségére utal.

A **rakéta immunelektroforézis (RIE)** során ellenanyagot tartalmazó gélben a fehérjeminták elektroforetikus mobilitásuk alapján addig vándorolnak, amíg a gélben meg nem jelenik az antigén-

ellenanyag komplexek precipitátuma, rakétaformát képezve az antigén-ellenanyag egyensúlyi pontjánál. A rakéták magassága a fehérje mennyiségére utal. A precipitátumok festése Coomassie-vagy immunfestéssel megvalósítható. Ezt a módszert ritkán használják a fehérjék detektálására.

Az **ELISA technika** alkalmazása során az antigén-ellenanyag komplex kialakítása antigén kötőhelyeket tartalmazó szilárd fázison (mikroküvetében) megy végbe. A szilárd fázison rögzített immunkomplex azonosítása enzimes jelöléssel történik. A jelölt immunkomplex az enzimre specifikus szubsztrát és az enzimes reakcióval arányos kromogén átalakítását követő színreakcióval jellemezhető. A színes oldat fényelnyelése ELISA fotométerrel mérhető, a koncentráció kalibrációs görbe lineáris illesztése alapján számítható. A módszer alaptípusai: direkt-, indirekt-, kompetitív-, kettős ellenanyag „szendvics” módszerek.

Direkt módszer esetén az antigént, vagy az ellenanyagot jelezzük. Az eljárás alkalmas antigének vagy ellenanyagok kimutatására. A módszer elve, hogy a jelzett komponens kötődésének mértéke egy bizonyos koncentráció-tartományban arányos a másik komponens mennyiségével. Így a jelzett ellenanyag esetében a kötődés arányos a szilárd fázishoz kötött -, vagy a szolubilis antigén mennyiségével, az antigén jelzése esetében pedig az ellenanyag mennyiségével.

Indirekt módszer során az antigén-ellenanyag kapcsolódást az ellenanyaggal specifikusan reagáló, anti-globulin aktivitású jelzett, ún. „második ellenanyaggal” mutatjuk ki. A módszer elsősorban ellenanyagok kimutatására és mennyiségi meghatározására használható.

Kompetitív módszer során a jelzett antigén vagy ellenanyag kötődését nem jelzett antigént vagy az ellenanyagot tartalmazó ismeretlen mintával gátoljuk. Ez esetben a jelzett komponens kötődése a nem jelzett antigénnel vagy ellenanyaggal kompetitíve gátolható. A gátlás mértéke a gátló anyag koncentrációjával arányos, de nagymértékben függ az ellenanyag és az antigén között kialakult kötés erősségétől, az ellenanyag affinitásától is. A módszer igen kis (ng) mennyiségű ellenanyag(ok) és antigén(ek) kimutatására, illetve mennyiségi meghatározására alkalmas.

A **kettős ellenanyag, „szendvics” módszernél** az antigénnel specifikusan reagáló ellenanyag-molekulákat kötjük a szilárd fázishoz. Az ily módon kötött ellenanyag specifikusan köti az antigént, és ezért az antigén többkomponensű oldatból kimutatható és izolálható. Az ellenanyag-antigén kötődés az antigénnel specifikusan reagálni képes jelzett ellenanyaggal mutatható ki.

A mérés legtöbb esetben nyúlban termelt, tisztított poliklonális ellenanyaggal, vagy egérben termelt, tisztított monoklonális ellenanyaggal történik.

A **monoklonális ellenanyagok** azonos specificitású ellenanyag molekulákból állnak, egyetlen B-sejtből származó sejtvonal (sejtklón) termeli őket, és egyetlen epitóp felismerésére képesek. Az antigénre specifikus ellenanyag előállításához az immunizálást egérben, vagy patkányban végzik. Előállítása hibridóma-technikával történik, melynek alapja, hogy aktivált immunsejteket in vitro B-sejt eredetű tumorsejtekkel (mielóma sejtekkel) fúzionáltatnak. A keletkező hibridekben egyesül az

ellenanyag-termelés és a korlátlan tenyésztetőség képessége. Minden hibrid sejtvonal csak egyféle antitestet termel, hiszen az egyes B-limfocita sejtek csak egy adott antigénnel szemben képesek ellenanyagot termelni. Fajlagos immunreakció alapján választható ki az a vonal, amelyik a kívánt antitestet termeli. **A poliklonális ellenanyagok** több, eltérő specificitású ellenanyag keveréke, több B-sejt klón termékei, amelyek egy adott antigén eltérő epitópjait ismerik fel. Előállításuk nyúlban, birkában, vagy kecskében történik.

A **gyors immunteszt** immunokromatográfia elven működő „szendvics” rendszerű tesztsík (kromatográf membrán). A tesztsíkok általában monoklonális ellenanyag alapúak. A membránt a vizsgálandó fehérje-extraktumba kell mártani. A membrán adszorbens zónáján antigén-specifikus ellenanyaggal fedett, színezett mikroszemcsék találhatók. Ezek hozzákapszolódnak a mintában lévő célfehérjéhez, komplexet alkotnak és így együtt haladnak a reakciózóna felé. Itt egy bizonyos ponton a létrejött immunkomplex a membránon mobilizált antigén-specifikus ellenanyaghoz kapcsolódik, amit a mikroszemcse elszíneződése jelez. A teszt működését kontroll mikroszemcse biztosítja.

A **RAST /EAST inhibíciós mérések** esetében az IgE-specifikus humán szérumot a vizsgálni kívánt élelmiszermintával egy kémcsőben előinkubálják. Az oldatban lévő antigének gátolják az IgE ellenanyagok kötődését a szilárd fázishoz kötött antigénhez. Az immunkomplexek detektálására izotóppal (RAST), vagy enzimmal (EAST) jelölt anti-IgE ellenanyagot használnak. RAST esetén az emittált fényt, EAST esetén a szubsztrát hozzáadásával keletkező színváltozást mérik, amellyel a kötött IgE ellenanyagokat detektálják (POMS et al. 2004).

Az élelmiszerekben lévő allergének kimutatására az IgE-specifikus humán szérumokkal történő vizsgálat nem validálható detektálási módszer, hiszen az adott allergénre érzékeny allergiás betegek szérumai egyénenként más IgE-specificitást mutatnak, valamint a szérumok mennyisége is limitált a vizsgálatokhoz. Ezenkívül nehezíti a mérést a multiallergia és/vagy más allergénnel való keresztallergia esetleges előfordulása. A humán szérumokkal végzett vizsgálatokat az élelmiszerből történő allergének kimutatása helyett inkább az élelmiszerallergia klinikai diagnosztizálására használják fel. A humán szérumok felhasználásával gélelektroforézissel vagy/és izoelektromos fókuszálással (1D/2D) elválasztott fehérje-kivonatokat immunblott vizsgálatok, az allergiás betegeknél reakciót kiváltó fehérjék kimutatására rendkívül alkalmasak és legjobban elterjedt módszerek (GONZÁLEZ-BUITRAGO et al. 2007).

Az élelmiszerből történő kimutatásban ismertetett hátrányok kiküszöbölésére a vizsgálni kívánt allergén ellen, kísérleti állatokban (nyúl, egér, kecske, bárány, csirke) termeltetve ellenanyagokat fejlesztettek. Napjainkig csak néhány validált, immunológiai alapokon nyugvó kimutatási módszer létezik ELISA kitek, gyors immuntesztek formájában, kizárólag állati eredetű

szérum (poliklonális vagy monoklonális) felhasználásával; és csak limitált számú élelmiszer allergén meghatározására (ASENSIO et al. 2008). A kitek az allergén élelmiszerforrás (szója, tej, tojás, búza, mogoró, földimogyoró, mandula, kagylófélék, szezám) egy allergén fehérjéjének detektálására irányulnak (pl. tejből kazein-, tojásból ovalbumin-, búzából gliadin meghatározás).

Az immunológiai módszerek mellett, napjainkban az egyre szélesebb körben terjedő **PCR módszer** is alkalmazzák. Bizonyos feldolgozott, hőkezelt, részlegesen- illetve teljesen hidrolizált vagy más technológiai hatásoknak kitett élelmiszerekben, ahol a szerkezetében megváltozott fehérje kioldása megnehezítheti a fehérje alapon történő kimutathatóságot, szükség lehet olyan kiegészítő módszer fejlesztésére, amely komplex mátrixnál is működőképes. Fontos, hogy a módszer reprodukálható és megbízható legyen, de mindenekelőtt jól kiegészítse és megerősítse az ELISA-val vagy fehérje kitekkel kapott eredményeket (ALLMANN et al. 1993). Ezen feltételeknek megfelelő, kiegészítő módszer lehet az adott allergén fehérjét kódoló vagy más az adott növényi vagy állati komponensre specifikus DNS alapú tesztmódszer, amelyet egyre szélesebb körben kezdtek alkalmazni az allergén kontamináció kiszűrésére. Az ilyen típusú vizsgálatok alapja, hogy a DNS a fehérjénél hőstabilabb molekula, és szekvenciája nem változik meg a technológia során kitett hő és mechanikus hatások során. Azonban a DNS-fragmensméret csökkenésével ez esetben is számolni kell, illetve a savas közegű termékek vizsgálata kritikus lehet. A technika alkalmazásának egyik kritikus kérdése, hogy korrelál-e a tulajdonképpeni allergiát okozó fehérje az őt kódoló specifikus DNS-el? Továbbá, vajon összevethető-e a hagyományos kimutatási módszerként alkalmazott ELISA eredménye a DNS módszer eredményével? Előfordulhatnak olyan esetek is, amikor a feldolgozás során a félkész élelmiszer ugyan érintkezett az adott allergén nyersanyaggal (pl. búza), tehát a DNS-szennyezés kimutatható, de fehérje már nincs benne (pl. keményítő, növényi olajok). A DNS-tartalom és/vagy jelenlét meghatározására több típusú specifikus DNS szakasz felsokszorozásán alapuló PCR módszer áll a rendelkezésünkre. A kutatási területen alkalmazott legelterjedtebb módszerek típusai:

Az **Egyszerű PCR technika** egy rövid oligonukleotid pár (ún. „primerpár”), polimeráz enzim és dezoxinukleotidok segítségével sokszorozásra „szaporítja” a kívánt DNS szakaszt. A sokszorozás után gélelektroforézises módszerrel történő elválasztás, majd festés után értékelhető az eredmény és „igen-nem” választ kaphatunk a kérdéseinkre, azaz információt kapunk arról, hogy az adott mintánk tartalmazza-e az allergén-forrás DNS-ét, vagy sem (NÉMEDI et al. 2007).

A **Real Time-PCR**, az alap technika továbbfejlesztett változata, mely megfelelő standard sorok alkalmazása segítségével mennyiségi mérést tesz lehetővé, utólagos elektroforetikus termék-elválasztás nélkül. Az eljárás lényege, hogy a polimeráz láncreakció során végbemenő DNS szakasz sokszorozása speciális festékek (SYBR Green) ill. próbák (pl. Taq man) által a folyamat

során nyomon követhető, az emittált fluoreszcencia megfelelő hullámhosszon mérhető és arányos a reakcióelegyben lévő mért szekvencia aktuális mennyiségével.

A **PCR-ELISA** esetében a PCR-termék leggyakrabban biotinnal jelölt primerekkel sokszorozódik, így a reakció lefutását követően, sztreptavidin kötött ELISA lemezen, enzimesen jelölt ellenanyag segítségével fél-kvantitatívan vagy kvantitatívan fotométerrel kiértékelhetők.

Kereskedelmi forgalomban lévő PCR-kitek bizonyos élelmiszer allergén források (zeller, mandula, mogoró, földimogyoró, tej, szója) kimutatására kaphatók (POMS et al. 2004), illetve a kimutatás szolgáltatásként, élelmiszer-analitikai területen dolgozó cégeknél megrendelhetők.

2.7.1. A kimutatást befolyásoló tényezők, kimutatási határérték

A táplálék allergének kimutatásában és mennyiségi meghatározásában, így ennek megfelelően jelölésükben számos nehezítő tényező játszik szerepet. Korlátokat az szab, hogy maga a kimutatás nem teljesen tisztázott kérdés, hisz nincs még véglegesített szabályzat arra vonatkozóan, hogy mit is kell pontosan mérni: a DNS-t, vagy a peptid-szekvenciát, vagy az allergén fehérjét (egyet vagy többet), vagy az allergént hordozó élelmiszert. Csak ajánlások vannak erre vonatkozóan különböző kitek formájában. Akadályozó faktor az is, hogy az allergén gyakran csak nyomokban található az élelmiszer termékekben, illetve az élelmiszermátrix által maszkírozott formában lehet jelen. Ezenkívül az élelmiszermátrixban akár több mint egy allergén is előfordulhat egyidejűleg. Mindemellett hiányzik egy kellően érzékeny módszer arra, hogy a jelentős, és a kevésbé jelentős allergéneket, valamint a keresztreakáló fehérjéket kimutathassuk. A kimutatási módszer elvárt érzékenységi határát sem tudjuk pontosan behatárolni, hisz még nem ismerjük pontosan a legérzékenyebb ember által is tünet nélkül fogyasztható legnagyobb allergén mennyiséget (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL) illetve azt a legalacsonyabb allergén mennyiséget (Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL), amely a legérzékenyebb emberben már megfigyelhető tünet(ek)et vált ki (TAYLOR et al. 2002, CREVEL et al. 2007). Erre vonatkozóan állatkísérletes modell nem megoldható, így csak a betegek klinikailag igazolt adataiból tudunk tájékozódni. Egy általános megállapodás szerint a kimutatási határoknak valahol 1 és 100 ppm közé kell esniük az adott élelmiszerre vonatkozóan (POMS and ANKLAM 2003). Fontos problémaként merül fel a mintavételezés és mintaelőkészítés is, hiszen nem ismerjük jól az allergén extrahálhatóságát, illetve a feldolgozás (pl. hőkezelés) utáni viselkedését sem. Ez utóbbi jól látszik abból is, hogy a rendelkezésünkre álló kitek is különböző kioldási protokollt ajánlanak, az extrahálhatóság nincs szabályos módszerbe foglalva (pl. gliadin kimutatása esetén). A nem megfelelő extrahálhatóság miatt az alkalmazott analitikai módszereknél mennyiségi mérési hibák is előfordulhatnak, azaz a reprodukáltság nem biztosított. Az alkalmazott kimutatási útmutatók ezért általánosan nem használhatók minden élelmiszerre (HORACSEK 2005). Fontos az ellenanyag

megfelelő specificitása is azaz, hogy akár feldolgozott élelmiszerből is ki lehessen mutatni az allergént.

Az élelmiszerből való allergének kimutatását befolyásolhatja a táplálék fehérjék szerkezetének, élelmiszeripari eljárásokkal való különböző mértékű módosítása. Az előállított élelmiszerek allergén jellegének csökkentésére több út lehetséges (SOLER-RIVAS and WICHERS 2001):

- hagyományos nemesítés az allergén negatív epitópok szelekciójával,
- az epitópok lebontása fizikai folyamatokkal (pl. hőkezelés, hidrolízis, enzimes kezelés), génmanipulációval (post-transzkpcionális géncsendesítés, kritikus diszulfid hidak tioredoxinos redukciója, allergént kódoló génmódosítás aminosav helyettesítéssel),
- az epitópok maszkírozása (pl. keresztkötést kialakító transzglutamináz enzimes kezelés).

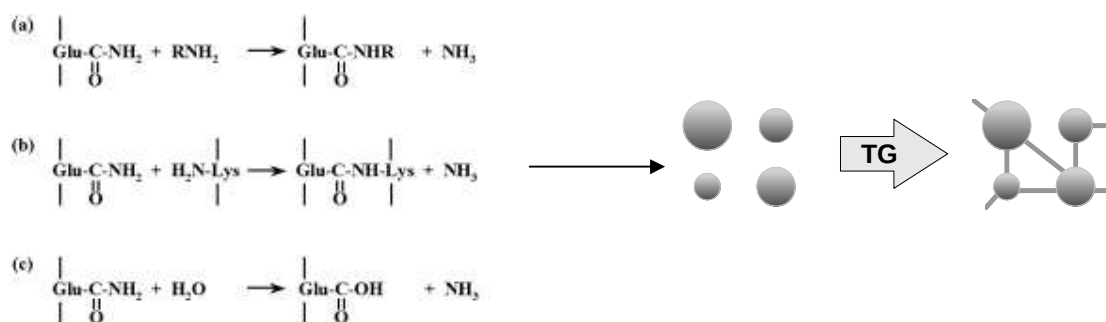
Ezek közül jelenleg leggyakrabban az enzimes kezelést, illetve az enzimes kezelést és a hőkezelést együttesen alkalmazzák. Az élelmiszeriparban egyre szélesebb körben használnak fel enzimkészítményeket (transzglutamináz, glükóz-oxidáz, lakkáz, α -amiláz, pentózanáz, proteáz), mivel a táplálékok lebontása a szervezetben is enzimek közreműködésével zajlik le (CABARELLO et al. 2007b). Az enzimes módosítások előnyei közé tartozik a gyors reakciósebesség, az enyhe reakció körülmények és az alkalmazott enzimek specificitása (NAKAI and LEE-CHAN 1993). Az élelmiszerként használt fehérjék enzimkatalizált módosítása folyamán a fehérjék tápértéke növelhető, funkcionális tulajdonságuk javítható (FEENEY and WHITAKER 1986). Élelmiszerbiztonsági szempontból biztonságosak (Generally Recognized As Safe, GRAS), nem maradnak aktív formában például sütés után a végtermékben. Ezért az enzimeket a terméken sem kell jelölni (CABALLERO et al. 2007a).

2.7.1.1. A transzglutamináz (TG) enzim hatása az élelmiszer fehérjék kimutatására

A transzglutamináz enzimet (TG) széles körben alkalmazzák az élelmiszeripar minden területén termékminőség javítására állományjavítóként, egészségesebb élelmiszer előállítására, valamint más élelmiszeralkotók funkciójának növelésére (KURAISHI et al. 2001, ZHU et al. 1995, CABALLERO et al. 2007b, MOTOKI and SEGURO 1998). Az enzim könnyen alakít ki keresztkötéseket tej, tojás, hús, szója és glutén fehérjék között (KÖKSEL et al. 2001).

A transzglutamináz enzim egy fehérje-glutamin- γ -glutamil transzferáz enzim (EC 2.3.2.13), mely három reakciót katalizál: acil csoport átviteli reakciót; lizin és glutamin aminosavak közötti keresztkötést; valamint dezamidálási folyamatot (**6. ábra**). A fő reakció típusa a keresztkötési reakció, amelynek során a lizin és glutamin maradék között alakul ki keresztkötés ϵ -(γ -Glu)-Lys kötéssel anélkül, hogy a lizin maradék biológiai értéke csökkenne (GERRARD et al. 2001). A

keresztkötések kialakulásával új polimer vegyületek keletkeznek (ROSELL et al. 2003, LARRE 2000, GUJRAL and ROSELL 2004). Az élelmiszerfehérjék keresztkötése befolyásolja az élelmiszermatrix állományát és a fehérjék kioldhatóságát (GERRARD 2002). A keresztkötések mértéke függ a szubsztrátként szereplő fehérje makromolekuláris szerkezetétől (HINZ et al. 2007). A leghatékonyabb keresztkötés azon fehérjék között valósul meg, amelyek glutamin maradéka a fehérje flexibilis régiójában van (DICKINSON 1997). Tehát nem a fehérjék abszolút lizin- és glutamintartalmának, hanem az elsődleges szerkezetének van nagyobb jelentősége a keresztkötés kialakításában (KURTH and ROGERS 1984).



6. ábra: TG enzim hatásmechanizmusa (YOKOYAMA et al. 2004)

a. acil csoport átvitel; b. Fehérjékben/peptidekben lévő Gln és Lys maradékok közötti keresztkötés; c. dezamidálás

A transzglutamináz enzim nagy lehetőséget rejt a gabonaipar számára is. Felhasználásával minőségi termék állítható elő akár nem tradicionális, pszeudocereália örleményekből, kukoricakeményítőből, rizslisztből (MOORE et al. 2006), mivel ezek a nyersanyagok kismértékben vagy egyáltalán nem tartalmazzak a tészta reológiai szerkezetét döntően befolyásoló sikért (GERRARD and SUTTON 2005). Sikért nagy mennyiségben tartalmazó búzaliszt alapú termékek esetében a TG enzim okozta változások milyenségéről kevés információ áll rendelkezésre, ezért egyre jobban előtérbe került ennek vizsgálata (BAUER et al. 2003). A gluténszerkezet módosítható, amely során bár kísérleti bizonyítékokkal nem alátámasztott, csak feltételezhető, hogy a búzalisztból készített termékek esetén a transzglutamináz enzim segítségével létrejött keresztkötések csökkenthetik a fehérjefrakciók allergén jellegét (GERRARD and SUTTON 2005), így esetleg toxikus szekvenciákat nem tartalmazó, hipoallergén, cöliákiás betegek diétájába illeszthető termék is nyerhető (WATANABE et al. 1994).

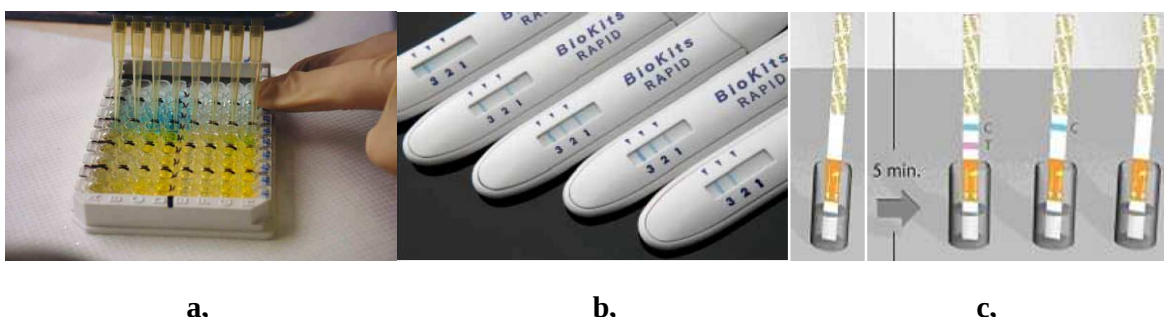
2.7.2. Gluténmentesség kimutatása

A népesség jelentős hányadánál a glutén cöliákiás megbetegedést és gabonaallergiát okoz, és emiatt jelöléskötelezett allergénként tartjuk számon. A prolaminok olyan gluténfrakciók a gabonákban, amelyeket etanolos extrakcióval (40-70%) lehet kivonni. A gabonatermékeken kívül a glutén fizikai-kémiai tulajdonságainak és alacsony árának köszönhetően kötő- ill. töltőanyagként más élelmiszerekben (hús, kolbász), valamint gyógyszerekben, kozmetikumokban is megtalálható. A klinikai tünetek sokfélesége miatt nehezen határozható meg a gluténmentes élelmiszerekben, nyomokban előforduló glutén küszöbértéke. Az eddigi kísérletek, és a diétás felmérések azt mutatták, hogy már a napi 100 mg gliadin-bevitel elegendő volt a tipikus cöliákiás elváltozások előidézéséhez, míg a 4-14 mg gliadin-bevitel még nem okozott a vékonybélben mukózális elváltozást a betegeknél (HISCHENHUBER et al. 2006). Természetesen az ideális helyzetnek a 0 mg glutén-bevitel tekinthető. Ez az ún. „zéró-tolerancia” elv a gyakorlatban, a gluténmentes élelmiszerek előállításánál (a gluténmentes élelmiszerek előállítására vonatkozó jelenlegi magyarországi szabályozást a 36/2004 (IV. 26.) ESZCSM rendelet tartalmazza /módosítása: 12/2007 (III. 6.) EüM rendelet/) viszont nem tartható, mivel glutén nagyon kis mennyiségben, de kimutatható a gluténmentessé tett és a természetesen gluténmentes élelmiszerekben is. Szükség van tehát egy elfogadható határérték felállítására. Ennek érdekében egy megfelelő kimutatási módszer kidolgozása létfontosságúvá vált.

A Táplálkozástudományi és Különleges Táplálkozási Célú Élelmiszerek Codex Bizottsága (Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses, CX/NFSDU) szerint az élelmiszerekben és élelmiszeralkotókban a glutén kvantitatív kimutatása immunológiai módszerrel ajánlott (pl. ELISA), alternatív módszernek pedig a DNS alapú kvalitatív meghatározás javasolt.

A gluténmentes élelmiszer, meghatározása alapján, egyrészt olyan összetevőkből áll, melyek nem tartalmazzak búzából, egyéb *Triticum* fajokból (rozs, árpa), zabból és keresztezett változataikból származó egy alkotót sem, és amelynek kontaminációból származó gluténtartalma nem haladja meg a 20 mg/kg-ot. Másrészt gluténmentes az élelmiszer, ha búzából, egyéb *Triticum* fajokból (rozs, árpa), zabból és keresztezett változataikból készült, de gluténjuk kivonásával „gluténmentessé” alakított, és az így kapott maradvány gluténtartalma nem több mint 20 mg/kg. Csökkentett glutén tartalmú élelmiszerről akkor beszélhetünk, ha búzából, egyéb *Triticum* fajokból (rozs, árpa), zabból és keresztezett változataikból készült termék speciális technológiával csökkentett gluténtartalma 20-100 mg/kg között mozog (CX/NFSDU ALINORM 08/31/26, Appendix III.). Az analitikai módszerekkel szembeni elvárás az, hogy a kimutatási határ legalább 10 ppm legyen a végtermék szárazanyagtartalmára vonatkoztatva.

Elektroforetikus mobilitásuk alapján α -, β -, γ -, ω -prolaminokat különböztethetünk meg, amelyek mennyiségi eloszlása minden gabonanövénynél más és más. Az α -típusú prolaminokat tartják elsősorban toxikusnak cöliákia esetén, de a hőkezelt élelmiszerekben, csak az ω -gliadinok kimutatására van mód. A különböző prolaminok (α , β , γ , ω) mennyiségi eloszlása mellett az élelmiszerek heterogenitása is szerepet játszik a glutén detektálásában. A vizsgálandó élelmiszer lehet szilárd (pl. sütemények), vagy folyadék (joghurt, szirup). Ezenkívül az élelmiszerek nagy része feldolgozásuk során hőkezelésnek vagy enzimes folyamatoknak van kitéve. Ennek eredményeképpen a glutén szerkezete megváltozik, esetenként a felszíne oldhatatlanná válik, illetve részlegesen vagy teljesen hidrolizálódik. Fontos követelmény a fehérje alapú glutén-detektálási módszereknél, hogy ne csak natív formában, hanem az élelmiszer feldolgozása után is detektálhatóak legyenek a prolaminok. Ezen fehérjék kinyerése megfelelő extraháló-oldattal javítható. A glutén fehérje alapú kimutatására többfajta módszer létezik: mikroszkópos, elektroforetikus, kromatográfiás, illetve immunológiai. Az immunológiai alapokon működő módszerek előnye, hogy nyers és feldolgozott élelmiszerek kvantitatív mérésére alkalmasak az előzőekben felsorolt, időigényes és drága műszerezettséget igényelő módszerekkel szemben. Ezenkívül megbízható eredményt adnak, különösen a feldolgozott és hőkezelt élelmiszerek esetében. A glutén immunológiai alapokon nyugvó kimutatása kétféle módon történhet. A mikrotiter lemezen végzett kimutatás idő- és műszer igényesebb, ugyanakkor kvantitatív és kvalitatív mérést is lehetővé tesz (7/a. ábra). Általában kompetitív vagy szendvics ELISA elven működik. A másik egy 5-10 percet igénybevevő, immunkromatográfia elven működő ún. gyorsmódszer, amely a minták monitorozására, kvalitatív mérésre szolgál (7/b.,c. ábrák).



7. ábra: Glutén tesztek

(a. mikrotiter lemezen; b. gyorsteszt: ω -gliadin alapú; c. gyorsteszt: R5 alapú)

Ezek a szűrőmódszerek megmutatják, hogy a megengedett értékhatár fölött vagy alatt van-e a minta glutén koncentrációja. A gyorsmódszerek kvalitatív mérésen kívül alkalmasak fél-quantitatív mérésre is. Míg az ELISA vizsgálatok monoklonális ill. poliklonális ellenanyagot használnak, addig az immunkromatográfias gyors tesztek csak monoklonális ellenanyaggal dolgoznak. Főleg

laboratóriumokban végzik ezeket a vizsgálatokat, de a gyorseszteket otthon és/vagy az iparban a technológia különböző lépéseinél, minőség-ellenőrzési feladatoknál is alkalmazzák.

Az élelmiszerek gluténtartalom analízisében az elmúlt 10 évben nagy előrelépés történt, ami glutént/gliadint felismerő ellenanyagon alapult. Kezdetben poliklonális ellenanyagot használtak a gliadin altípusok kimutatására. Később SKERRIT and HILL (1990) kifejlesztettek egy érzékenyebb, ω -gliadin ellenanyag alapú módszert, amely különösen a hőstabil gliadin frakciók felismerésére irányult. A kereskedelmi kitek (a méréshez szükséges vegyszerek és anyagok együttese) többsége ezt az ellenanyagot használja. A módszer gyengesége, hogy az ω -mobilitású frakció (6-20%) egy aránylag kis részét teszi ki az összes prolamintartalomnak, mely a különböző gabonafajtákban változhat (DENERY-PAPINI et al. 1999). Ennek ismeretében mondhatjuk, hogy a Skerrit-féle ELISA teszt nem teljesen következetes. Mivel nem egyforma mértékben ismeri fel az árpa- és a rozs prolaminoikat, a mérések gyakran nem reprodukálhatók. Ennek oka részben az, hogy az egyes gyártók különböző minőségű gliadin preparátumokat használnak kalibrációs standardként.

A hátrányok kiküszöbölésére 28 európai búzafajta gliadinkomponensét tartalmazó ún. Európai Referencia Gliadin Standardot (IRMM-480) készítettek a kitekhez, ami az összehasonlító analízisekhez valamint a kalibrációhoz, belső standardként használható (VAN ECKERT et al. 2006). Ezzel kapcsolatban felmerül az a kérdés, hogy az IRMM-480 vajon megfelelő módon reprezentálja-e az egész földön elterjedt búzafajtákat, így globálisan alkalmazható lesz-e a standardban, vagy csak a Codex szabványtervezet elfogadását követően az európai vonatkozó szabályozásban fog szerepet játszani. A másik előrelépés a MENDEZ et al. (2005) által kifejlesztett, gliadin-epitópokat felismerő R5-ELISA teszt. Az ω -szekalin (rozs prolamino) antigén ellen termeltetett monoklonális R5 ellenanyag a gliadinoikat, szekalinoikat és a hordeinoiket (árpa prolamino) egyforma mértékben, homológ szekvenciákon ismeri fel (VALDÉS et al. 2003, MOTHES and STERN 2003, MENDEZ et al. 2005, STERN 2005, SORELL et al. 1998). Az R5 ellenanyaggal főleg az α -, γ -típusú toxikus gliadin-epitópokat (pepscan) tudjuk kimutatni (OSMAN et al. 2001). Az R5 ellenanyaggal legjobban felismert öt aminosavból álló szekvenciák (pepscan-ok) a következők: QQFPF, QQQFP, LQFPF, QLFPF (KAHLENBERG et al. 2006). Az R5-ELISA-val az érzékenység, a specificitás és a reprodukálhatóság is javult. Az extrahálás könnyítésére ún. koktél-oldatok szolgálnak (250 mM 2-merkapto-etanol, 2 M guanidin hidroklorid koktél PBS-ben) (GARCIA et al. 2005).

A jelenleg kereskedelmi forgalomban levő immun-kiteket a **7. táblázat** mutatja be. Eddig nincs semmi korrelatív információ a kitek hatékonyságáról, azaz arról, hogy a vizsgálatok milyen mértékben segítettek megelőzni a kóros immunológiai reakciókat. A kitek által meghatározható

küszöbértéknél mért kimutatási határérték és a biológiai válasz küszöbértéke között nincs érdemi kapcsolat (FDA 2006).

7. táblázat: Néhány kereskedelmi forgalomban lévő immunanalitikai mérésen alapuló glutén kit

	Cég* /Kit név	Érzékenység gliadin (glutén) ppm
Poliklonális	ImmunoLab GmbH: Gluten ELISA Test	4 (8)
Monoklonális ω-gliadin specifikus	R-Biopharm: Ridascreen Gliadin Prolamin Munkacsoport által validált	1,5 (3)
	R-Biopharm: Ridascreen Fast Gliadin	5 (10)
	Tepnel: Gluten Assay kit AOAC validált	1 (2)
	Tepnel: Gluten Rapid Kit-gyorsteszt	(100-200)
	Diffchamb: Transia Plate-Gluten	5 (10)
Monoklonális R5- ellenanyagra alapozott	Diffchamb: Transia Plate-Prolamins Prolamin Munkacsoport által validált	1,5 (3)
	Operon: Stick Gluten	1,5 (3)
	Ingenasa: IngezimGluten (3.0.GLU.K.2)	1,5 (3)
	R-Biopharm Rida Quick Gliadin-gyorsteszt	2,5

*Ingenasa (spanyol), Diffchamb (svéd), R-Biopharm (német), Tepnel BioSystems (U.K.)

A PCR-en alapuló DNS módszer közvetettsége miatt, allergén (glutén) kimutatásra nehezen kidolgozható, sok optimalizálást igénylő módszer. Kiegészítő, illetve ellenőrző vizsgálat lévén sokan megkérdőjelezik a módszer létjogosultságát. Pontosságára, specifikusságára és jó reprodukálhatóságára azonban egyre nagyobb igény van. A gluténmentesség kimutatására kereskedelmi forgalomban jelenleg a „SureFood Allergen Gluten real-time PCR” (R-Biopharm) kit kapható.

A két típusú módszer alapvető tulajdonságait a **8. táblázatban** hasonlítottam össze.

8. táblázat: ELISA és PCR módszer összehasonlítása glutén kimutatás esetében

	ELISA	PCR
Kimutatás	Gliadin fehérjekeverék	Búza nem kódoló szakaszát, gliadint vagy glutenint kódoló DNS szakaszát
Specifitás	α -, β -, γ -, ω -Gliadin (nyers mintából)	Búzát; α -, β -, γ -, ω -gliadint és HMW-, LMW-glutenint reprezentáló specifikus PCR-termék
Feldolgozás hatására kimutatható	ω -Gliadin (hőkezelés esetén); α -, β -, γ -, ω -gliadin (enzimes kezelés esetén)	Búzát; α -, β -, γ -, ω -gliadint és HMW-, LMW-glutenint reprezentáló specifikus PCR-termék
Kimutatási határ	1,5-2 ppm	5 ppm
Mintaizolálás időigénye	2-3 óra	3-4 óra
Kontamináció veszélye a mérés során	Közepes	Nagy
Mérési időigény	0,5-2 h	2-3 h
Nagyműszer igénye	Kicsi	Nagy

3. CÉLKITŰZÉSEK

A táplálékallergiában szenvedő betegek száma világszerte, így hazánkban is folyamatosan emelkedik. Magyarországon a gabonafehérjék okoznak leggyakrabban allergiás megbetegedéseket. A gabonafélék fogyasztása egyes emberekben kóros immunológiai folyamatokat indíthat el, amelyek következtében a táplálékallergia körébe sorolható betegségek alakulhatnak ki (cöliákia, gabonaallergia). Ebből kiindulva tartottam fontosnak a hazai köztermesztésben lévő gabonák és a belőlük készült termékekben felismerhető allergének vizsgálatát. Munkám célja volt a főbb gabona allergének (beleértve a cöliákia szempontjából fontos prolaminok) kimutatása és mennyiségi meghatározása az élelmiszerek széles spektrumában (pl.: alapanyagok, hőkezelt élelmiszerek, kontaminált gluténmentes élelmiszerek) enzimmel jelzett immunanalitikai módszerek felhasználásával.

A fentiek ismeretében céloom volt:

- Cöliákia és gabonaallergia szempontjából jelentős táplálék allergének összehasonlító vizsgálata a hazai köztermesztésben lévő gabonák és pszeudocereáliák bázisán.
- Immunanalitikai módszerek alkalmazhatóságának vizsgálata glutén-kimutató szempontjából nyers és feldolgozott élelmiszerek modellvizsgálatában.
- Gluténmentes diétába illeszthető, transzglutamináz enzimmel kezelt, csökkentett glutén tartalmú (búza alapú) és glutént nem tartalmazó (sárgaborsó alapú) száraztészta modellek fejlesztése.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteimet a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet Biológia Osztályán, a Szegedi Tudományegyetem Mérnöki Karának Élelmiszermérnöki Intézetében (SZTE MK ÉMI) és a Dunakenyér Sütőipari és Kereskedelmi Rt.-nél végeztem.

4.1. Anyagok

4.1.1. Hazai köztermesztésben lévő gabonák és pszeudocereáliák

A kísérletben felhasznált gabona- és pszeudocereália minták a Gabonatermesztési Kutató Kht.-ból származnak, kivéve az amaránt (*Amaranthus moleros* GK Róza) 2003-as jelölésű mintáját, melyet a Klorofill Bt. bocsátott rendelkezésre (9. táblázat).

9. táblázat: Hazai gabonák és pszeudocereáliák

Fajok	Fajta	Évjárat
Kenyérbúza (<i>Triticum aestivum</i>)	GK Tisza	2004
Spelton búza (<i>Triticum spelta</i>)	ÖKO-10	2004
Durum búza (<i>Triticum durum</i>)	D-78	2004
Kenyérbúza (<i>Triticum aestivum</i>)	GK Cipó	2004
Kenyérbúza (<i>Triticum aestivum</i>)	CY-45 Grandstar	2001
Árpa (<i>Hordeum vulgare</i>), tavaszi	STC I. 22-03	2004
Árpa (<i>Hordeum vulgare</i>), őszi	GK Rezi	2004
Árpa (<i>Hordeum vulgare</i>), őszi	GK Rezi	2005
Csupasz árpa (<i>Hordeum nuda</i>), őszi	C3/05	2005
Csupasz árpa (<i>Hordeum nuda</i>), őszi,	GK Árpád	2005
Rozs (<i>Secale cereale</i>)	Amilo	2004
Rozs (<i>Secale cereale</i>)	Rapid	2004
Rozs (<i>Secale cereale</i>), őszi	GK Wibro	2004
Rozs (<i>Secale cereale</i>)	Matador	2004
Rozs (<i>Secale cereale</i>)	Gamet	2004
Tritikálé (<i>Triticosecale</i> sp.), tavaszi	Kargo	2004
Tritikálé (<i>Triticosecale</i> sp.), tavaszi	EMBR 18	2004
Tritikálé (<i>Triticosecale</i> sp.), tavaszi	GK korai	2004
Tritikálé (<i>Triticosecale</i> sp.), tavaszi	Wanad	2004
Tritikálé (<i>Triticosecale</i> sp.), tavaszi	GK Idus	2004
Csupasz zab (<i>Avena nuda</i>), tavaszi	GK Zalán	2004
Zab (<i>Avena sativa</i>), tavaszi	GK Iringó	2004
Zab (<i>Avena. sativa</i>), őszi	GK Impala	2004
Zab (<i>Avena sativa</i>), tavaszi	GK Kormorán	2005
Zab (<i>Avena sativa</i>), tavaszi	GK Pillangó	2005
Kukorica (<i>Zea mays</i>)	Sze TC 269	2004
Kukorica (<i>Zea mays</i>)	Ella SC	2004
Kukorica (<i>Zea mays</i>)	Sze SC 352	2004
Kukorica (<i>Zea mays</i>)	Bella TC	2004

Kukorica (<i>Zea mays</i>)	Veronica SC	2004
Rizs (<i>Oryza sativa</i>)	Janka	2003
Rizs (<i>Oryza sativa</i>)	Bioryza	2003
Rizs (<i>Oryza sativa</i>)	Risabell	2003
Rizs (<i>Oryza sativa</i>)	Ábel	2003
Rizs (<i>Oryza sativa</i>)	Oryzella	2003
Amaránt (<i>Amaranthus moleros</i>)	GK Róza	2003
Amaránt (<i>Amaranthus cruentus</i>)	GK Maros	2005
Amaránt (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>)	Edit	2004
Hajdina (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	Hajnalka	2004
Hajdina (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	430 törzs	2003
Hajdina (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	P425 törzs	2004
Hajdina (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	P427 törzs	2004
Hajdina (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	P429 törzs	2004

4.1.2. Kenyérmodell minták és alapanyagok

A kenyérminták és az alapanyagaik a Dunakenyér Sütőipari és Kereskedelmi Rt.-től származtak (10. és 11. táblázat).

10. táblázat: Alapanyagok és kontroll kenyérminták

Gluténmentes kenyér alapanyagok
Rizsliszt
Kukoricakeményítő
Burgonyapehely
Tojáspor
Élesztő
Előre bekevert kenyérpor a gluténmentes kenyér otthoni sütéséhez, mely a receptúrának megfelelő arányban tartalmaz rizslisztet, burgonyapelyhet, kukoricakeményítőt, és tojásport; kereskedelmi forgalomba szánt termék
Szennyezést előíró alapanyagok
Búzaliszt
Rozsliszt
Kontroll kenyérminták
Hagyományos kenyérgyártó üzemben búzalisztből készült, házi jellegű fehérkenyér (+kontroll)
Hagyományos kenyérgyártó üzemben rozslisztből készült kenyér (+kontroll)
A cég elkülönített gluténmentes kenyérgyártó üzemében, az előírt technológia alapján készített gluténmentes kenyér (-kontroll)

11. táblázat: Gluténmentes kenyér gyártása során kiválasztott kontaminációs pontokon, búza-/rozsliszttel szennyezett kenyérmodellek

Kód	Megnevezés	Dagasztó	Sütőforma	Szárító
1.	A cég, elkülönített gluténmentes kenyérgyártó üzemében, az előírt technológia alapján készített gluténmentes kenyér	Tiszta*	Tiszta*	Hagyományos kenyérgyártó üzemben
2.		Tiszta*	Tiszta*	Búza- és rozsliszteket tároló silóban
3.	A cég, elkülönített gluténmentes kenyérgyártó üzemében, gluténmentes technológiával készített, a gyártás során búzaliszttel való szennyezésnek kitett gluténmentes kenyerek	Tiszta	Tiszta	A cég, elkülönített gluténmentes kenyérgyártó üzemében
4.		Tiszta	Szennyezett	
5.		Szennyezett	Tiszta	
6.		Szennyezett	Szennyezett	
7.	A cég, elkülönített gluténmentes kenyérgyártó üzemében, gluténmentes technológiával készített, a gyártás során rozsliszttel való szennyezésnek kitett gluténmentes kenyerek	Tiszta	Tiszta	
8.		Tiszta	Szennyezett	
9.		Szennyezett	Tiszta	
10.		Szennyezett	Szennyezett	

Tiszta*: nincs glutén szennyezés; **Tiszta:** szennyezés után mosott; **Szennyezett:** szennyezés után nem mosott

4.1.3. Száraztészta modellek és alapanyagok

A száraztészta vizsgálati modellek kezelési típusait és összetételét a **12. táblázatban** soroltam fel.

12. táblázat: Száraztészta modellek és alapanyagok

Tésztaipari céliszt-alapanyagok (kereskedelmi forgalomból, 250 – 550 µm szemcseméret)
Búzaliszt <i>Triticum aestivum</i> , Dél Gabona Malomipari Rt., Szeged Búzaliszt <i>Triticum durum</i> , Diamant Malom Kft., Baja Sárgaborsóliszt <i>Pisum sativum</i> , Hunor spp., Balogh Kft., Budapest
Búzaliszt alapú száraztészta modellek
TG-al kezeletlen (0 mg/kg TG) <i>T. aestivum</i> / <i>T. durum</i> tészták (natúr, kontroll) 10 mg/kg TG-al, 30'-60'-150'-ig kezelt <i>T. aestivum</i> / <i>T. durum</i> tészták 20 mg/kg TG-al, 30'-60'-150'-ig kezelt <i>T. aestivum</i> / <i>T. durum</i> tészták 30 mg/kg TG-al, 30'-60'-150'-ig kezelt <i>T. aestivum</i> / <i>T. durum</i> tészták 40 mg/kg TG-al, 30'-60'-150'-ig kezelt <i>T. aestivum</i> / <i>T. durum</i> tészták 50 mg/kg TG-al, 30'-60'-150'-ig kezelt <i>T. aestivum</i> / <i>T. durum</i> tészták 60 mg/kg TG-al, 30'-60'-150'-ig kezelt <i>T. aestivum</i> / <i>T. durum</i> tészták 70 mg/kg TG-al, 30'-60'-150'-ig kezelt <i>T. aestivum</i> / <i>T. durum</i> tészták 80 mg/kg TG-al, 30'-60'-150'-ig kezelt <i>T. aestivum</i> / <i>T. durum</i> tészták 100 mg/kg TG-al, 30'-60'-150'-ig kezelt <i>T. aestivum</i> / <i>T. durum</i> tészták

150 mg/kg TG-al, 30'-60'-150'-ig kezelt <i>T. aestivum</i> / <i>T. durum</i> tésták
200 mg/kg TG-al, 30'-60'-150'-ig kezelt <i>T. aestivum</i> / <i>T. durum</i> tésták
Sárgaborsóliszt alapú száraztészta modellek
TG-al kezeletlen (0 mg/kg TG) sárgaborsó tézta (natúr, kontroll)
50 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt sárgaborsó tézta
70 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt sárgaborsó tézta
100 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt sárgaborsó tézta
120 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt sárgaborsó tézta
140 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt sárgaborsó tézta
150 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt sárgaborsó tézta
180 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt sárgaborsó tézta
200 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt sárgaborsó tézta

Jelölés:

mg/kg TG: transzglutamináz enzim (mg) a liszt tömegére (kg) vonatkoztatva

4.1.4. Humán szérumok

- Allergy Screen Chemiluminescence teszttel (Hitachi Chemical Diagnostic) klinikailag igazolt IgE pozitív búza-allergiás anonim humán hiperimmun szérumok, melyek mérsékelten emelkedett búza-specifikus ellenanyagszintűek voltak.

- Immunofluoreszcens módszerrel pozitív EmA IgA klinikai gyanújával igazolt anonim cöliákias humán szérumok. IgA-hiányos cöliákias betegek esetében tTG alapú ELISA kit (Diagnosticum Rt.) segítségével történt a klinikai igazolás.

A szérumok szűrését a Fővárosi Önkormányzat Madarász u. Gyermekkórház Gasztroenterológiai Központjában végezték. Minden szérum kezeletlen, nem diétázó betegtől származott.

4.1.5. Egyéb anyagok, reagensek

Trim-W elnevezésű α -amiláz inhibitor (Nutricepts, USA)

Gliadin (Sigma)

Anti-gliadin nyúl IgG ellenanyag (Sigma)

Anti-nyúl IgG-kecske IgG, HRPO konjugátum (Sigma)

Anti-humán IgA, HRPO konjugátum (Sigma)

Anti-humán IgE, HRPO konjugátum (Sigma)

Pepszin (Sigma)

α -amiláz (Sigma)

Marha pankréáz α -kimotripszin (Fluka; 74,6 U/mg)

Szója Bowman-Birk tripszin/kimotripszin inhibitor (BBI) (Sigma)

Vízoldékony formátumú, mikrobiális eredetű ACTIVA®STG-M transzglutamináz enzimpreparátum (AJINIMOTO EUROPE SALES GmbH, Hamburg, Németország, enzimaktivitás: 20–30 U/g)

Analitikai tisztaságú oldószerek, egyéb vegyszerek, segédanyagok (Reanal Finomvegyszergyár Rt., Bio-Rad Magyarország Kft., Sigma-Aldrich Kft., Izinta Kft., Analyzer Kft., Tepnel Biosystem, Invitrogen, Millipore, Fluka)

A vizsgálatokhoz felhasznált oldatok összetétele az M2 mellékletben megtalálható.

4.2. Módszerek

4.2.1. A hazai köztermesztésben lévő gabonák és pszeudocereáliák jellemzése

4.2.1.1. Mintaelőkészítés

A mintákat Retsch GRINDOMIX GM200 típusú őrlőberendezéssel megőröltem (15 mp, 5000 rpm, majd 3*20 mp 8000 rpm (puhább mintáknál csak 2*8000 rpm), 80%-os liszthozam), majd finomliszt minőségűre szitáltam (250 µm szemcseméret). Minden minta őrlése után az őrlőberendezés kését és tartályát mosószeres vízzel mostam, majd megszáritottam. A szitát porszívóval tisztítottam, majd szintén mosószeres vízben tisztítottam a keresztszennyeződés elkerülése végett.

4.2.1.2. Fehérjefrakciók előállítása

Albumin és globulin frakciók előállítása

Gabona- illetve pszeudocereália eredetű liszt 1 grammját 4 ml 50 mM Trisz-HCl pufferben (pH 8,5) extraháltam 4°C-on, kevertetés közben 1 órán át. Centrifugálás után (10 perc, 13 000 rpm) az albumin/globulin frakciójú felülúszót (extrakt, jelölése: E) használtam a további vizsgálatokhoz.

α -amiláz inhibitorokban dús fehérjefrakciók előállítása búzamintákból

Búzaliszt illetve Alpha Trim-WTM búza α -amiláz inhibitor készítmény (Nutricepts, Inc.) 1 g-ját 4 ml 50 mM Tris-HCl pufferben (pH 8,5) extraháltam 4°C-on, kevertetés közben 1 órán át, majd lecentrifugáltam (10 perc, 13 000 rpm). Az albumin/globulin frakciójú felülúszót még további két frakcióra bontottam DEAE-cellulóz ioncserélő oszlopon. (A DEAE-cellulóz előállítása az M2 mellékletben megtalálható.) Egy 2 ml-es oszlopot 4 ml desztillált vízben tárolt DEAE-cellulózzal töltöttem fel, majd hagytam ülepedni. A cellulóz réteget 3*5 ml 50 mM Trisz-HCl pufferrel (pH 8,5) mostam kiegyenlítés céljából. Közben az áramlási sebességet beállítottam 0,25-0,5 ml/perc közé eső tartományba. Az oszlop kiegyenlítése után az előállított albumin/globulin frakcióban

gazdag mintát (2,75-2,9 ml) az oszlopra vittem, majd az oszlopon történő átfolyása után 50 mM Trisz-HCl startpufferrel (pH 8,5) eluáltam (1. frakció). A rendszer stabilizálódásáig történt az eluálás. Az oszlopon maradt fehérjéket 0,15 M NaCl tartalmú 50 mM Trisz-HCl pufferrel (pH 8,5) mostam le (2. frakció). A frakciókat spektrofotométerrel követtem nyomon (280 nm-en). A kapott frakciókat a további vizsgálatok előtt membránnal (Millipore Centricon Plus-80 Centrifugal Filter Devices with Ultracel PL membran, vágóérték: 10000 Da) bekonzcentráltam, majd Bradford reagenssel a fehérjetartalmát meghatároztam.

Prolamin frakciók előállítása

Gabona- illetve pszeudocereália liszt 100 mg-ját 1 ml 70%-os etanol-desztillált víz elegyben extraháltam, majd centrifugálás után a felülúszót vittem további vizsgálatokra.

4.2.1.3. Beltartalmi adatok meghatározása

Száranyagtartalom/nedvességtartalom meghatározása

A lisztmintákat 105°C-on tömegállandóságig szárítottam. A tömegvesztéséből számítottam a nedvesség, illetve a száranyagtartalmat. A minták nedvességtartalma az $m[\%] = (a-b) \cdot 100/a$ („a” a nedves minta tömege [g]; „b” a száraz minta tömege [g]; „m” a nedves súly [%]) képletből kiszámítható. Ebből adódóan a száranyagtartalom a $b[\%] = (a-m) \cdot 100/a$ képletből számítható. A mérés három párhuzamosban történt.

Fehérjetartalom meghatározása

A lisztminták fehérjetartalom meghatározása Kjeldahl-módszer szerint Kjel-Foss Automatic 16210 berendezéssel történt (N-tartalom [g]*5,7-es szorzófaktor alkalmazva).

4.2.2. Búza alapú, gluténnal szennyezett- és gluténmentes diétába illeszthető kenyérmodellek előállítása

A Dunakenyér Sütőipari és Kereskedelmi Rt.-nél a hagyományos kenyerek gyártásától jól elkülönített, külön épületben történt a gluténmentes kenyér előállítása. A gliadinmentes kenyér-alapanyagok összekeverése után a tésztagasztás 30°C-on történt. (A dagasztócsésze maximális lisztmennyiséget befogadó képessége 100 kg volt). Ezt követően 500 g nyers tésztát kiolajozott formákba mértem, majd a sütőbe helyeztem. A sütés 220°C-on, 15-20 percig (amíg színt nem kapott), majd 175-180°C-on 90 percig történt. A megsült kenyereket hosszú ideig hűtöttem (6-8 óra a nagy nedvességtartalom miatt), ventilátor alkalmazása mellett (**8. ábra**).



8. ábra: Gluténmentes kenyérgyártás folyamatábrája

A szándékosan gluténnal szennyezett, gluténmentes kenyérgyártás technológiájával készült kenyérmodellek közül két minta esetében a szennyezés, a gyártás végén lévő szárításkor történt. Az egyik mintát egy hagyományos kenyérgyártó üzemben, a másikat pedig egy búza- és rozsliszteket tároló silóban szárítottam. A többi gluténnal való szennyezésnek kitett mintánál 2 kritikus ponton (dagasztóban, sütőformában) külön-külön, vagy egyszerre búza-/rozsliszttel történt a szennyezés. A szennyezés után vagy csak a dagasztót, vagy csak a sütőformát, vagy egyformán mindkettőt mosással tisztítottam, vagy hagytam szennyezetten.

Az elkészült kenyérmintákat másnap feldaraboltam, majd egy alumínium lapon szétterítve egy hétig szobahőmérsékleten szárítottam. A megszáradt kenyérdarabokat Retsch GRINDOMIX GM200 típusú őrlőberendezéssel megőröltem, valamint a darabos alapanyagokat dörzsmozsárban aprítottam.

4.2.3. Szárasztészta modellek előállítása és jellemzése

4.2.3.1. Búza - és sárgaborsó alapú tészták előállítási technológiája

A kísérleti tészta modellek előállítása a Szegedi Tudományegyetem, Mérnöki Karának, Élelmiszermérnöki Intézetében (SZTE MK ÉMI) valósult meg. A transzglutamináz enzim-preparátumokból víz hozzáadásával állítottam be a kívánt enzimkoncentrációt (búza alapú tésztamodellek esetében: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 150, 180, 200 mg TG/kg liszt; sárgaborsó alapú tésztamodellek esetében: 50, 70, 100, 120, 140, 150, 180, 200 mg/kg liszt). A hozzáadott víz mennyiségét (220 ml) úgy állítottam be, hogy a minták nedvességtartalma 40%-os legyen. Majd az 500-500 g tésztaipari céllisztekhez folyamatos 10 perces keverés közben hozzáadtam az elkészített enzim-oldatokat. A kontroll tésztamodellhez (natúr tészta) enzimet nem adagoltam. Az enzimesen kezelt tészta szerkezetének kialakítását NUDELMEISTER háztartási tésztagéppel (Nudel- und Teigmaschine, Edition Johann Lafer, Hohenheim, Németország) végeztem (**9. ábra**). Az enzimes kezelés (pihenési idő) a tésztagépben, zárt rendszerben történt (búza alapú tésztamodellek esetében 30, 60, illetve 150 percig; sárgaborsó alapú tésztamodellek esetében 60 percig) szobahőmérsékleten. Az enzim inaktiválására a nyers tésztákat 5 percig, 70°C-os szárítószekrénybe tettem. Az enzimes hatásidő lejártával, a géppel 200 mm hosszú és 1 mm

széles hosszúmetélt készült a gép 5. nyújtási fokozatán, vágási profiljának megfelelően. A nyers tésztát szűrőpapírra helyezve 39°C hőmérsékleten 89% relatív páratartalmú szárítószekrénybe helyeztem. 24 órás szárítás után szobahőmérsékleten tovább szárítottam 48 órán keresztül. (Minden tészta modell két sorozatban készült). A szárított tésztamintákból őrleményt (200-450 μm) állítottam elő Lab Mill 1QC-114 (Labor MIM, Hungary) típusú őrlőberendezésen, majd lisztméretű szemcsékké szitáltam át (<250 μm).



9. ábra: NUDELMEISTER háztartási tésztagép a tészták enzimes kezelésére, gyúrására, nyújtására, és vágására

4.2.3.2. Fehérjefrakciók előállítása (FEILLET et al. 1977)

A transzglutamináz enzimmal előállított tésztákból a fehérjefrakciók (búza alapú tészták esetén: víz/só-, alkohol- és sav/lúgoldható frakció; sárgaborsó alapú tészták esetén: víz/só- és sav/lúgoldható frakció) kivonására FEILLET et al. (1977) módszerét alkalmaztam módosított formában. A tésztaőrlemény 0,6 g-ját 4 ml 0,5 M NaCl-oldatban (pH 6,8) 1 órán át, mágneses keverővel kevertettem. Ezután centrifugálással (20 perc, 6000 rpm) a felülúszóban lévő víz- és sóoldható frakciót (albumin/globulin frakció) megkaptam. A maradékot 3 ml 68%-os etil-alkoholban extraháltam mágneses keverő jelenlétében, 2 órán át. Az extrakció végén a szuszpenziót centrifugáltam (20 perc, 6000 rpm), majd a kapott alkohololdható fehérjékben dús felülúszót félretettem, a maradékot, pedig ismételten, 2 ml 68%-os etil-akoholban 1 órán át, mágneses keverővel kevertettem. A centrifugálás (20 perc, 6000 rpm) után kapott felülúszót az előbb félretett felülúszóhoz öntöttem. Ezzel megkaptam az alkohololdható frakciót (gliadin frakció). A maradékot tovább oldottam 4 ml β -merkaptó-etanol tartalmú borát-pufferben (pH 10), 1 óra kevertetés mellett. Az extraktumot centrifugálva, a felülúszóban megkaptam a sav/lúgoldható frakciót (glutenin frakció). Mindegyik frakciót később liofilizáltam és ebben a formában használtam fel a további vizsgálatokra.

4.2.3.3. Főzési és érzékszervi tulajdonságok jellemzése

Tésztafőzés (KARÁCSONYI 1970)

A tészta 10 grammját 200 ml csapvízben (pH 6,8) főztem meg (1200 W teljesítményű elektromos főzőlapon), majd a megfőtt tészta (amelyiknek közepén történő átvágásánál nincs lisztes maradék) felületét Büchner tölcséres vákuumpumpa segítségével 100 ml langyos vízzel lemostam.

Főzési veszteség számítása (KARÁCSONYI 1970)

A tésztafőzés során kapott főző- és öblítővíz mennyiségét egyesítettem, majd 105°C-on tömegállandóságig bepároltam. A tészta főzési vesztesége kiszámítható az $F [\%] = a \cdot 100 / m$ („F” a főzési veszteség [%], „a” a bepárolt főző- és öblítővíz maradék mennyisége [g], „m” a szárasztészta tömege [g]) képletből. A mérések 3 párhuzamosban történtek. Az adatok matematikai statisztikai módszerekkel történő kiértékelése Anova analízissel valósult meg $P=0,05$ szignifikancia szinten (SVÁB 1983).

Felvett víz mennyiségének számítása

A megfőzött tésztát csapvízzel leöblítettem, majd 20°C-ra történő lehűtése után a nedves tömegét mértem. A szárasztészta felvett vízmennyisége kiszámítható a 4.2.1.3. pontban leírt képlet alapján. A mérések 3 párhuzamosban történtek. Az adatok matematikai statisztikai módszerekkel történő kiértékelése Anova analízissel valósult meg $P=0,05$ szignifikancia szinten (SVÁB 1983).

Érzékszervi minősítés (MSZ 20500/3-1986)

A főtt tésztakészítmények érzékszervi minősítését egy 3 tagú bizottság végezte. Négy tulajdonságot (külső megjelenés, illat, íz, állomány) 0-5 pont között pontoztak. Az értékeléshez eltérő súlyzófaktort ír elő a szabvány. A pontszámokat képletbe helyettesítve súlyozott átlagot ($\Sigma = \text{külső megjelenés pontszáma} \cdot 1,1 + \text{illat pontszáma} \cdot 0,7 + \text{íz pontszáma} \cdot 0,9 + \text{állomány pontszáma} \cdot 1,3$) számítottam. A maximum súlyozott átlag pontszáma 20. (Ha $\Sigma > 18$ akkor a tészta első osztályú; ha 16-18 az érték akkor másodosztályú; ha $\Sigma < 18$ akkor nem hozható forgalomba; ha bármely tényező 0, akkor értékelhetetlen a tészta a főzési minőséget illetően.)

4.2.3.4. Beltartalmi adatok meghatározása

Száranyagtartalom meghatározása

A meghatározás a 4.2.1.3. pontban leírtak alapján történt a tésztaalapanyagok esetében.

Fehérjetartalom meghatározása

A tésztaalapanyagokat, illetve a tésztamodellek oldható frakcióit szárazra pároltam, majd mikro-Kjeldahl eljárással roncsoltam és Tecator Kjeltec Auto 1030 Analyzer készülék segítségével a minták fehérjetartalmát meghatároztam (N-tartalom [g]*5,7 szorzófaktort alkalmazva). A minták fehérjetartalmát az összes fehérjetartalom százalékában (%) számítottam ki.

4.2.4. Elektroforetikus módszerek

4.2.4.1. Fehérjék elválasztása SDS-PAGE-val „kész” gradiens gélen

A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását NuPAGE Novex 4-12% Bisz-Trisz akrilamid tartalmú gyárilag előállított gradiens gélben (Invitrogen), antioxidánst és jelzőfestéket tartalmazó MES SDS futtató-pufferrel (Invitrogen) végeztem, X cell Sure Lock futtató kádat (Invitrogen) alkalmazva, beállított paraméterek ($U=200$ V konstans, $I_{\text{Kezdeti}}=110-125$ mA, $I_{\text{Végő}}=70-80$ mA, futtatás ideje= 35 perc) mellett. A mintákat redukáló ágenst tartalmazó LDS mintaoldó-pufferben (Invitrogen) oldottam, majd 5 percig forraltam a mintafelvétel előtt.

4.2.4.2. Fehérjék elválasztása SDS-PAGE-val 15%-os öntött gélen

A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását akrilamid és biszakrilamid tartalmú 15%/6%-os elválasztó-/gyűjtőgélben, Trisz-SDS-glicin tartalmú futtató-pufferrel végeztem Bio-Rad Mini-PROTEAN 3 Cell készüléket (BioRad power PAC1000 feszültségadó készülékkel) alkalmazva, beállított paraméterek ($U= 200$ V konstans; $I=54$ mA, $P=11$ W, futtatás ideje=65 perc) mellett. A mintákat Trisz-SDS-glicerín- β -merkaptó-etanol tartalmú mintaoldó-pufferben oldottam, majd 5 percig forraltam a mintafelvétel előtt. A gél zsebeibe a minták felvitele előtt futtató-pufferben oldott brómfenolkék jelzőfestéket pipettáztam.

4.2.4.3. Fehérjék elválasztása natív-PAGE-val 10%-os öntött gélen

A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását akrilamid és biszakrilamid tartalmú 10%-os gélben, Trisz-glicin tartalmú futtató-pufferrel végeztem Bio-Rad Mini-PROTEAN 3 Cell készüléket (BioRad power PAC1000 feszültségadó készülékkel) alkalmazva, beállított paraméterek ($U= 200$ V konstans, $I=47$ mA, $P=9$ W, futtatás ideje=65 perc) mellett. A mintákat Trisz-glicin-szacharóz tartalmú mintaoldó-pufferben oldottam. A gél zsebeibe a minták felvitele előtt futtató-pufferben oldott brómfenolkék jelzőfestéket pipettáztam.

4.2.4.4. Fehérjekimutatás

Az elektroforézis befejezése után a szeparált fehérjéket 20 percig fixáltam 20% triklór-ecetsav (TCA) oldatban. A maradék TCA eltávolításához háromszor 10 percig rázattam a géleket PAGE-mosó oldatban. Ezután 10 percig Coomassie Brilliant Blue R-250 festékoldatban rázattam a gélt, majd 6 perc után 10% ecetsav-oldattal távolítottam el a háttérben maradt felesleges festéket.

4.2.5. Antigén–specifikus poliklonális ellenanyag előállítás, tisztítás (HARBOE and INGILD 1973)

Előállítás

Az antigénnel szemben normál szisztémás immunizálási protokollnak megfelelően magyar vadas nyulakban poliklonális ellenanyagot termeltettem *subcutan* immunizálással. Az oltóanyag egy-egy arányban tartalmazta az antigént és az adjuvánst (komplett és inkomplett adjuváns), melyben a beállított antigéntartalom 25 µg/kg élőtömeg volt. Ezzel a keverékkel immunizáltam az állatokat többszöri, a lapockák közti vastagabb bőrbe történő injektálással a 0., 14., 28., és a 42. napon. A kontroll szérumot immunizálás előtt, a szérumpróbákat 8-10 nappal az emlékeztető oltások után a marginális vénából vettem. A vérminták titerét indirekt ELISA-val ellenőriztem (lásd 4.2.6.1.). A megfelelő titer esetén a nyulakat altatásban kivéreztettem, a levett vért pedig szobahőmérsékleten megaltattam.

Antigén-specifikus nyúl-IgG frakció kisózásos tisztítása

A megalvadt hiperimmun szérumokat másnap lecentrifugáltam (10 perc, 25°C, 5000 rpm). Ezután a centrifugálással kapott nyers savóhoz, 1:1 arányban telített ammónium-szulfát oldatot (pH 7,4) adtam, lassú kevertetés mellett, szobahőmérsékleten. A kevertetést mágneses keverő segítségével két órán át folytattam, majd a szuszpenziót lecentrifugáltam (20 perc, 5000 rpm). A felülúszót előntöttem, a kapott csapadékot pedig a nyers savó eredeti térfogatának fele-mennyisége arányában PBS-pufferben (pH 7,4) feloldottam. Ezután az így meglévő, PBS-pufferben oldott savómennyiséggel végeztem el az ammónium-szulfátos kicsapást, majd a centrifugálást és megismételtem a PBS-pufferben való visszaoldást. A visszaoldott csapadékot (IgG-frakciót) desztillált vízben kifőzött dializáló hártába öntöttem, majd PBS-pufferrel szemben 2*24 órán át dializáltam az ammónium-szulfát eltávolítása végett. Az ellenanyagot felhasználásig 100 µl-es adagokban -20°C-on tároltam.

4.2.6. ELISA technikák (TIJSEN 1985)

Az ELISA mikrotiter lemez rázatásához STAT Fax 2200 rázó-inkubáló készüléket, az eredmények leolvasásához ELISA Automatikus Mikrotiterlemezt leolvasó ELISA spektrofotométert (Dynatech MR 7000, Dynatech Laboratories Ltd., U.K.) alkalmaztam. A mintaelőkészítésnél a fehérjék rázatva extrahálásához az IKA-SCÜTTLER MTS 4 rázógépet használtam.

4.2.6.1. Antigén-specifikus poliklonális ellenanyag alapú indirekt ELISA tisztított ellenanyagok munkahígításának megállapítására

Az ELISA mikrotiter-lemez (Analyzer) küvettáit az antigén (gliadin, α -amiláz inhibitor) törzsoldatából 0,05 M kötőpufferben (pH 9,6) készített hígításának (5 $\mu\text{g/ml}$) 100 $\mu\text{l/lyuk}$ mennyiségével érzékenyítettem. Egy éjszakán át történő inkubálás (4°C) után a lemez mérőhelyeit 3*300 $\mu\text{l/lyuk}$ mennyiségű mosópufferrel (pH 7,4) mostam, majd a szabad kötőhelyeket 200 $\mu\text{l/lyuk}$ fedőpufferrel (pH 7,4) blokkoltam 37°C-on történő, 1 órás inkubálással. Ismételt mosást követően az elsődleges ellenanyag (anti-gliadin nyúl IgG, anti- α -amiláz inhibitor nyúl IgG) 0,15 M foszfát-pufferben (PBS-oldat, pH 7,4) felvett tova futó hígításait (100 $\mu\text{l/lyuk}$) két ismétlésben, a lemez mérőhelyeire mértem és a lemezt inkubáltam (37°C, 1 óra). Ismételt mosást követően az immunkomplexet a másodlagos enzimmel jelölt ellenanyag (anti-nyúl IgG kecske IgG, HRPO konjugátum) PBS-oldatban felvett hígításaival (100 $\mu\text{l/lyuk}$) inkubáltam (37°C, 1h). A lemezeket ismét mostam, majd 100 $\mu\text{l/lyuk}$ OPD/H₂O₂ (pH 5,0) szubsztrát-oldattal inkubáltam (5 perc). A reakciót 50 $\mu\text{l/lyuk}$ inhibitor-oldattal (4N H₂SO₄) leállítottam és a kialakult szín abszorbanciáját PBS pufferrel készített vak-oldattal szemben, $\lambda=492$ nm-en, 630 nm referenciaszűrő mellett ELISA spektrofotométerrel mértem. A munkahígítás a maximális lekötés kb. 75%-nál volt.

4.2.6.2. Gliadin specifikus poliklonális ellenanyag alapú kompetitív indirekt ELISA a gliadintartalom meghatározására

Mintaelőkészítés során 100 mg mintát ill. gliadin standard-et 1 ml 70%-os etanolban extraháltam fél órás rázatás közben. A szuszpenziót lecentrifugáltam (5000 rpm, 15 perc), majd a gliadin tartalmú felülúszó 0,15 M PBS-pufferben (pH 7,4) történt hígítását (búza és tritikálé mintáknál, valamint a búza alapú száraztészta modelleknél 1:100, 1:500; 1:1000, a többi gabonánál és pszeudocereáliánál, a sárgaborsó alapú száraztészta modelleknél, kenyérmintáknál 1:2, 1:5, 1:10) használtam fel a kompetitív indirekt ELISA-hoz. A mintaelőkészítés után a mikrotiter lemez (Analyzer) mérőhelyeit a standard antigén 2 mg/ml-es törzsoldatából 0,05 M kötőpufferben (pH 9,6) készített hígításának (5

µg/ml) 100 µl/lyuk mennyiségével érzékenyítettem. Egy éjszakán át történő inkubálás (4°C) után a mérőhelyeket 3×250 µl/lyuk mosó-pufferben (pH 7,4) mostam, majd a szabad kötőhelyeket 250 µl/lyuk fedő-pufferrel (pH 7,4) történő inkubálással fedtem (37°C, 1 óra). Ismételt mosást követően, az anti-gliadin nyúl IgG PBS-oldatban felvett hígítását (1:5000, 50 µl/lyuk) és az antigén standard-sor tízszeres tova futó hígításait (10^{-3} - 10^3 µg/ml) vagy az antigént tartalmazó minták PBS-oldatban felvett megfelelő hígítását (50 µl/lyuk), két ismétlésben a lemez mérőhelyeire mértem és a lemezt inkubáltam (37°C, 1 óra). Ismételt mosást követően az immunkomplexet anti-nyúl-IgG kecske-IgG HRPO konjugátum mosópufferben felvett munkahígításával (1:50 000, 100 µl/lyuk) inkubáltam (37°C, 1 óra). A lemezeket ismét mostam, majd 100 µl/lyuk OPD/H₂O₂ szubsztrát-oldattal (pH 5,0) inkubáltam (5 perc). A reakciót 50 µl/lyuk inhibitor-oldattal (4N H₂SO₄) állítottam le és a kialakult szín abszorbanciáját PBS-pufferrel szemben, $\lambda=492$ nm-en, 630 nm referenciaszűrő mellett ELISA spektrofotométerrel mértem. Az eredmények meghatározása a kalibrációs görbe lineáris regressziója alapján történt.

A rendszer érzékenysége ≥ 1 ppm gliadin, a kimutatási határa 1-100 ppm közötti (gliadinra vonatkoztatva), a reprodukálhatósága /CV(%)<10% .

4.2.6.3. ω -gliadin-specifikus monoklonális ellenanyag alapú direkt szendvics ELISA (Tepnel) a gliadintartalom meghatározására

A vizsgálatokat a Gluten Assay Kit (Tepnel BioSystems, 802002Y) „High Sensitivity Assay” protokollja alapján végeztem. A kit érzékenysége ≥ 1 ppm glutén, a kimutatási határa 10-200 ppm között van (gluténre vonatkoztatva), a reprodukálhatósága /CV(%)<10%, a specificitása búza gliadinra 100%, durum búza gliadinra 40-60%, tritikáléra és rozsra 110-130%, árpára 4-8%. A mintaelőkészítés során 100 mg mintát 1 ml 40%-os etanol-desztillált víz elegyben extraháltam, fél óráig rázatva, szobahőmérsékleten. A szuszpenziót lecentrifugáltam (5000 rpm, 15 percre), majd a gliadin tartalmú felülúszó 1:50, 1:500, 1:20 000 hígító folyadékokban történt hígítását használtam fel a direkt szendvics ELISA vizsgálatokhoz. A mintaelőkészítés után a monoklonális ω -gliadin ellenanyaggal érzékenyített ELISA mikrotiter lemez mérőcelláiba 100 µl-t pipettáztam a vizsgálati minták, vagy gluténnal szennyezett keményítő kontroll minták, valamint gliadin standard minták hígítófolyadékokban felvett hígításaiból, majd a lemezt rázatva inkubáltam (szobahőmérséklet, 60 perc) az immunkomplex kialakításához. A keletkezett komplex kimutatására 100 µl peroxidáz enzimmel jelzett monoklonális anti- ω -gliadin egér IgG₁ ellenanyag konjugátumot adtam, majd rázatva inkubáltam a rendszert (szobahőmérséklet, 30 perc). A színreakciót 100 µl TMB kromogén és hidrogénperoxid tartalmú szubsztrát-oldattal, szobahőmérsékleten alakítottam ki (30 perc). Az

enzimreakciót 50 µl stop-oldattal állítottam le. A kialakult szín abszorbanciáját a kit hígító pufferével szemben, $\lambda=450$ nm-en, 630 nm referenciaszűrő mellett ELISA spektrofotométerrel mértem. Minden inkubációs lépést megelőzően a reagens felesleget pufferes mosással (3*250 µl) távolítottam el. A mintákat 2 párhuzamos ismétlésben mértem, a mérést kétszer megismételtem.

4.2.6.4. Gliadin-epitóp specifikus monoklonális R5 ellenanyag alapú gyorseszteszt (Operon) gliadintartalom meghatározására

A vizsgálatokat a Stick gluten kit (Operon) protokollja alapján végeztem. A mintaelőkészítés során 100 mg mintát 1 ml 60%-os etanol-desztillált víz elegyben extraháltam, fél óráig rázatva, szobahőmérsékleten. Utána lecentrifugáltam (5000 rpm, szobahőmérséklet), majd a felülúszót PBS-pufferben (pH 7,4) tízszeresére hígítottam. Ezután a tesztcsíkot belehelyeztem, majd 5 perc elteltével leolvastam az eredményt. A teszt érzékenysége >1 ppm gliadin (0,1 mg gliadin/100 g élelmiszer), specificitása búzára, árparra és rozsra vonatkozik. Az 1 ppm fölötti gliadin-mennyiséget a tesztcsíkon pirosra színeződött vonal jelezte. A mellette lévő kontroll (kék vonal) a teszt működőképességére utalt.

4.2.7. Immunblott technikák

4.2.7.1. Gradiens gélen elválasztott fehérjék immunblottja

A fehérjék molekulatömegük szerinti szétválasztása után a fehérje-alegységek 0,2 µm pórusméretű PVDF membránra (Invitrogen) transzfer-pufferrel történő elektroforetikus átblottolása Novex X Cell IITM Blot Module (Invitrogen) nedves rendszerű készülékkel történt, beállított paraméterek ($U=30$ V konstans, $I_{Kézdeti}=170$ mA, $I_{Végso}=110$ mA blottolás ideje: 1 óra) mellett, a membránpapírhoz tartozó gyártói protokoll alapján. (A protokoll szerint a blottolás előtt a PVDF membránt 30 percig metanolban, majd 30 mp-ig desztillált vízben, ezt követően pedig néhány percig 50 ml transzfer-pufferben kell áztatni. A szűrőpapírokat transzfer-pufferben kell áztatni. A szendvics elrendezés a blottkészülékben (alulról felfelé haladva) a következő: 3 db. átnedvesített szűrőpapír, membrán, gél, 3 db. átnedvesített szűrőpapír).

4.2.7.2. Öntött gélen elválasztásztott fehérjék immunblottja

A fehérjék molekulatömegük szerinti szétválasztása után a fehérje-alegységek 0,45 µm pórusméretű PVDF membránra (Millipore) transzfer-pufferrel történő elektroforetikus átblottolása BIO-RAD Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell félszáraz rendszerű készülékkel történt, beállított

paraméterek ($U=0,25\text{ V}$, $I=0,08\text{ mA/cm}^2$, blottolás ideje: 1 óra) mellett, a membránpapírhoz tartozó gyártói felhasználási útmutató szerint. (A protokoll szerint a megfutatott gélt 15 percig katód-pufferben kell áztatni. A blottolás előtt a membránt 10 másodpercig metanolban, majd 2 percig desztillált vízben, majd 5 percig anód II.-pufferben kell átnedvesíteni. 2 db. szűrőpapírt anód I.-pufferben -, 1 db. szűrőpapírt anód II.-pufferben -, 3 db. szűrőpapírt katód-pufferben kell átnedvesíteni. A szendvics elrendezés a blottkészülékben (alulról felfelé haladva) a következő: 2 db. anód I.-pufferben átnedvesített szűrőpapír, 1 db. anód II.-pufferben átnedvesített szűrőpapír, membrán, gél, 3 db. katód-pufferben átnedvesített szűrőpapír).

4.2.7.3. Fehérjeátvitellel rögzített immunreaktív fehérjék azonosítása

Blottolás után a membránt 1 óráig 1%-os BSA fedőpufferben blokkoltam rázatás közben. A fehérjék blokkolása után a membránt háromszor, 10 percig PBS-oldattal mostam. Mosás után a membránt PBS-oldatban megfelelően hígított elsődleges antitest-oldatban inkubáltam 1 éjszakán át, szobahőmérsékleten. Másnap háromszor 10 percig mostam a membránt PBS-oldattal. Mosást követően a membránt PBS-oldatban megfelelően hígított másodlagos, enzimmel jelölt ellenanyag-oldatban (konjugátum) rázattam 1,5 órán keresztül. Az inkubáció után a membránt háromszor 10 percig PBS-pufferrel mostam, majd a 4-kloro-naftol szubsztrát-oldat hozzáadásával előhívtam az immunreaktív fehérjesávokat. A reakciót desztillált vízzel állítottam le. Az előhíváshoz felhasznált oldatok összetétele az M2 mellékletben megtalálható.

A blottok kiértékelése SynGene GeneTools (File version: 3.07.03 - Serial No. 13228*10873*merckhu*mpcs SynGene Laboratories) programmal történt.

4.2.8. Fehérjeazonosítás folyadékkromatográfiás-tandem tömespektrometriás (LC-MS/MS) módszerrel

A minták 15%-os öntött gélen SDS-PAGE-val történő fehérje elválasztása (lásd 4.2.4.2. pontban), és detektálása után (lásd 4.2.4.4. pontban) a festett gélt desztillált vízben 2-3 napig mostam. Utána a gélből a vizsgálni kívánt fehérjesávokat kivágtam és 1%-os ecetsavban, hűtőszekrényben tároltam.

A gélminták LC-MS/MS technikával történő beazonosítását a Szegedi Tudomány Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében végezték. A mintaelőkészítés során a gélmintákat 0,1 M NH_4HCO_3 -pufferrel (20 perc), majd acetonitrillel (20 perc) mosták, a gélek elszíntelenedéséig. A kérdéses mintáknál ez 3 ciklust jelentett. Ezután a gélminták redukálását 10 mM DTT-oldattal (30 perc, 56°C) -, majd mosását (10 perc) először 0,1 M NH_4HCO_3 -pufferrel (pH 8,8), másodszor pedig acetonitrillel (10 perc) végezték. Ezt követően a gélmintákat 50 mM jódiacetamid-oldatban 45 percig, szobahőmérsékleten, sötétben alkíllálták. Alkíllálás után a gélmintákat 0,1 M NH_4HCO_3 -puffer:

bidesztillált víz 1:1 arányú elegyével 10 percig, majd acetonitrillel 10 percig mosták, ezután 20 percig liofilizálták. A liofilizált mintákat tripszin-oldattal 30 percig telítették jégen, majd 0,1 M NH_4HCO_3 -puffer: bidesztillált víz 1:4 arányú elegyét a gélhez adva 37°C-n (kb. 16 óra) egy éjszakán át emésztették. A reakció leállítására 70 μl 5% hangyasav-oldattal történt. A peptideket 3*50 μl 50% acetonitril/5% hangyasav-oldattal ismételt 20 percig extrahálták, majd a mintákat SpeedVac vákuum-centrifugán oldószermentesítették. A mintákat 0,1% hangyasav-oldatban újból feloldották, majd LC-MS/MS módszerrel AGILENT 1100 készüléken analizálták, beállított paraméterek (LC-oszlopok: Zorbax 300SB-C18, 5 μm , 5x0,3 mm; Zorbax 300SB-C18, 3,5 μm , 150x0,075 mm; oszlopra történő mintafelvétel: 5 μl) mellett. Az MS/MS adatok kiértékelése SpektrumMill inhouse szerver keresőjével NCBI-nr Plant adatbázisból történt.

4.2.9. Szerin proteázok és α -amiláz inhibitorok jelenlétének igazolása

4.2.9.1. Szója eredetű α -kimotripszin enzimgátlás natív poliakrilamid gélben (PUSZTAI et al. 1988)

A minták víz- és sóoldható frakciójának tripszin inhibitor aktivitás vizsgálatához a mintákat 10%-os natív poliakrilamid gélben futtattam (lásd 4.2.4.3. pont), majd a géleket tripszin inhibitorra megfestettem.

Gélfestés tripszin inhibitorra

A tripszin inhibitor festéshez a géleket, megfelelően hígított 0,5 M foszfát-pufferben oldott α -kimotripszin standard oldatban inkubáltam 30 percig, 43°C-on. Ezt követően desztillált vízzel alaposan leöblítettem azokat, majd naftilészter/o-dianizidin oldattal festettem. A megfestődött gél 1%-os ecetsavval öblítettem. A minták tripszin-inhibitor tartalmát a világos háttérű (rózsaszín) gélben fehér színű foltok jelezték.

4.2.9.2. Búza eredetű α -amiláz enzimgátlás natív poliakrilamid gélben (HENSON and STONE 1988)

A minták víz/sóoldható frakciójának α -amiláz inhibitor aktivitásának vizsgálatához HENSON and STONE (1988) módszerét, kisebb módosítással adaptáltam. A mintákat 10%-os natív poliakrilamid gélben futtattam (lásd 4.2.4.3. pont), majd a géleket α -amiláz inhibitorra megfestettem.

Gélfestés α -amiláz inhibitorra

Az α -amiláz inhibitor festéshez a géleket, megfelelően hígított α -amiláz standard oldatban (40 mM Trisz, 1 mM CaCl_2 , pH 8,0) inkubáltam 20 percig, szobahőmérsékleten. Ezt követően a géleket 1%-os keményítő oldatban (40 mM Trisz, 1 mM CaCl_2 , pH 8,0) áztattam szobahőmérsékleten. Desztillált vizes öblítést követően káliumjodidos jód oldattal festettem. A megfestődött gél desztillált vízzel öblítettem. A minták α -amiláz inhibitor tartalmát a világos háttérű (halványsárga) gélben kék színű foltok jelezték.

4.2.9.3. α -amiláz inhibitor aktivitás (MURAO et al. 1981)

1,5 ml búza eredetű α -amiláz-oldatot és 0,5 ml 0,4 mg/ml inhibitor-oldatot (vizsgált fehérjeoldat) elegyítettem, majd 37°C-on 5 percig inkubáltam. (Kontroll minta esetében 1,5 ml α -amiláz-oldatot és 0,5 ml desztillált vizet elegyítettem, illetve vak próbánál 2 ml desztillált vizet használtam, majd 37°C-on szintén 5 percig inkubáltam) Ezután hozzáadtam 2 ml 1,5% keményítő-oldatot tartalmazó 0,1 M Trisz-HCl puffert (pH 7,0), majd alaposan összekevertem és 10 percig 37°C-on inkubáltam. A reakció leállítására 5 ml 1:5 arányú 0,5 N HCl-0,5 N ecetsav-oldatot adtam. A reakció végoldat 0,1 ml-éhez 5 ml 0,005% jóddoldatot adtam, majd 20 percig, szobahőmérsékleten állni hagytam. Az abszorbanciát 660 nm-en leolvastam.

A mintákat, a kontrollt, és a vak próbákat egyidejűleg kellett elkészíteni, és mérni.

Az inhibitor aktivitást az alábbi képlet alapján számoltam ki:

$$\text{Inhibitor aktivitás (\%)} = (\text{minta-kontroll}) / (\text{vak-kontroll}) * 100$$

4.2.10. Pepszines emésztés membránon

A mintákat 15%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattam (lásd 4.2.4.2. pont), majd a gélről a fehérjéket 0,45 μm -es PVDF membránra átblottoltam (lásd 4.2.7.2. pont), majd ezt követően a membránt 0,32%-os pepszin-oldatban (FAO/WHO 2001a) 37°C-on rázatva inkubáltam 0, 30 és/vagy 60 percig. A pepszines emésztés után a membránt háromszor, 10 percig PBS-pufferrel (pH 7,4) mostam, majd 1 óráig 1%-os BSA fedőpufferben blokkoltam ráztatás közben. A blokkolást követően a további munkafolyamat megegyezett a 4.2.7.3. pontban leírtakkal.

5. EREDMÉNYEK

A vizsgálataimat két szálon vittem, módszertani és technológiai szálon.

Módszertani feladatként fontosnak tartottam a cöliákiás - és a gluténre érzékeny gabonaallergiás betegek részére szóló gluténmentesség deklarálását megalapozó széleskörű vizsgálatokat. A betegek diétájának alapja a gluténmentes étrend, melynek valódi gluténmentességéről biztosítékra van szükségünk. A jelenlegi szabályzat szerint a gluténmentes élelmiszerek egyrészt búzából, egyéb *Triticum* fajokból (rozs, árpa), zabból, vagy ezek hibridjeiből egy vagy több alkotót nem tartalmazó olyan élelmiszerek, amelyek gluténtartalma nem több, mint 20 mg/kg; másrészt búzából, egyéb *Triticum* fajokból (rozs, árpa), zabból, vagy ezek hibridjeiből egy vagy több alkotót tartalmazó olyan élelmiszerek, melyekből a glutén kivonásra került, és az így kapott maradvány gluténtartalma nem több, mint 20 mg/kg. Maga a glutén búzából, rozsból, árpából, zabból, ezek hibridjeiből és a belőlük készült termékekből származó olyan fehérjefrakció, amely nem oldódik vízben és 0,5 M sóban. A glutén két frakciója a gluteninek és a 40-70%-os alkohollal oldható gliadinok. A törvény azt is kimondja, hogy az élelmiszerekből való glutén kimutatásának immunanalitikai alapon (ELISA) kell nyugodnia, és a kimutatás határértékének minimum 10 ppm-nek kell lennie.

Ezen fogalmak tudatában felmerül a kérdés, hogy a törvénykezés valóban biztosítékot ad-e a termék tényleges gluténmentességéről. A törvény nem egyértelmű:

- a gluténtartalom mérése gliadin-meghatározáson alapszik, pedig a glutén oldhatósági alapon történő meghatározásában más gluteninből származó toxikus komponensek is beleérthetők
- a gliadin kimutatására több kereskedelmi kit is rendelkezésre áll (monoklonális, poliklonális ellenanyag alapú), melyben a gliadinok kioldása sem pontosan leszabályozott
- az ajánlott módszerek között prioritást kapott a monoklonális R5 ellenanyag bázisú ELISA módszer, mely az α , β , γ -gliadinokból származó öt aminosavból álló peptidekre (epitópokra) specifikus
- nem tudjuk tehát, hogy mit kell detektálnunk pontosan: a gliadint, egy gliadin-alegységet, vagy egy gliadin-epitópot

Mindezek mellett a gabonaallergiások számára nem feltétlen a glutén (gliadin) a toxikus allergénkomponens (pl. az oldható fehérjék körébe tartozó α -amiláz inhibitorok, nsLTP-k, szerpinek), ezért más allergének vizsgálatával is kiemelten foglalkoztam.

A fehérje alapú módszerek másik problémája, hogy a technológiai kezelés gyakran jár hőkezeléssel, melynek során a fehérjék konformáció vesztésével kell számolnunk. Módszertani szempontból ez olyan problémát vet fel, hogy az antigén és az ellenanyag közötti affinitás romlik, ezért a módszer érzékenysége lényegesen csökken. Kenyérmodell segítségével vizsgáltam a hőkezelés hatását a kimutatás érzékenységére.

Száraztészta modelljén gluténmentes diétába illeszthető élelmiszerek választékbővítése céljából csökkentett gluténtartalmú termék és gluténmentes termékkör fejlesztésének megalapozásához vizsgáltam, hogy a kontamináció és a keresztreaktivitás milyen befolyással van a kimutatásra.

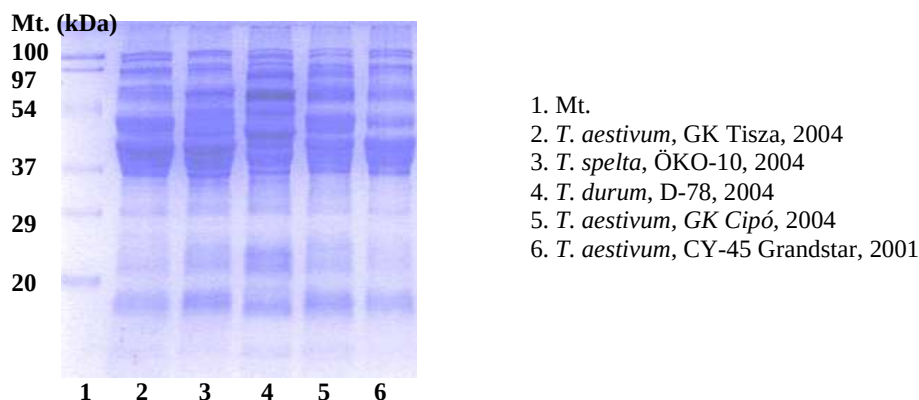
5.1. Hazai gabonák és pszeudocereáliák allergén kockázata

A cöliákia és a gabonaallergia az egyik legelterjedtebb betegség a világon, beleértve hazánkat is. Éppen ezért e betegségeket kiváltó allergének vizsgálata a mai napig fontos kutatási területté vált. Kutatásaimat a hazai búza allergének és a velük keresztreakáló gabonafehérjék vizsgálatára fókuszáltam. Törekedtem arra, hogy a búzán kívül olyan gabonákat, illetve pszeudocereáliákat is vizsgáljak, amelyek a búzával együtt szintén a cöliákia kiváltói (búzával keresztreakálók: tritikálé, rozs, árpa, zab) lehetnek, illetve amelyek nem okoznak klinikai tüneteket a cöliákiás betegekben (búzával nem-keresztreakálók: amaránt, hajdina, kukorica, rizs). Minden vizsgálatba vont hazai gabonában illetve pszeudocereáliában célom volt nemcsak a cöliákiás-, hanem a gabonaallergiás betegekben potenciálisan klinikai tüneteket kiváltó fehérjék monitorozása.

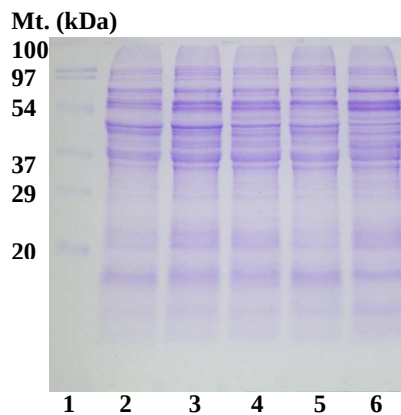
5.1.1. Gabonák és pszeudocereáliák búza allergén/keresztallergén profiljának *in vitro* vizsgálata

5.1.1.1. Gabonák/pszeudocereáliák főbb fehérjefrakcióinak összehasonlítása

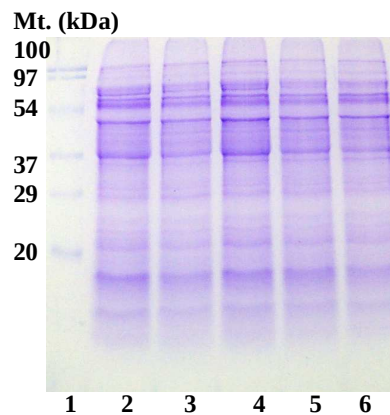
Fajtánként öt, amaránt esetében három gabona, illetve pszeudocereália lisztmintáiban egylépéses fehérje extrakciót követve, SDS-PAGE-val vizsgáltam a főbb fehérjefrakciók megoszlását (**10., 11., 12. ábrák**).



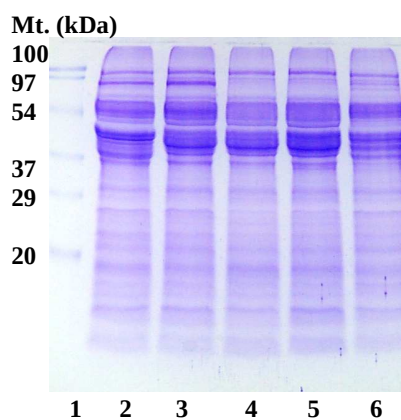
10. ábra: Különböző búzák fehérjeinek SDS-PAGE-val történő elválasztása



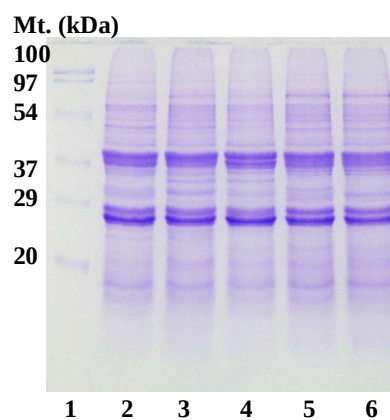
a. Tritikálé



b. Rozs



c. Árpa



d. Zab

11. ábra: Búzával keresztreagáló gabonák SDS-PAGE-val történő elválasztása

a.

1. Mt.
2. Tritikálé (*Triticosecale* sp.), tavaszi, Kargo, 2004
3. Tritikálé (*Triticosecale* sp.), tavaszi, EMBR 18, 2004
4. Tritikálé (*Triticosecale* sp.), GK korai, 2004
5. Tritikálé (*Triticosecale* sp.), Wanad, 2004
6. Tritikálé (*Triticosecale* sp.), GK Idus, 2004

b.

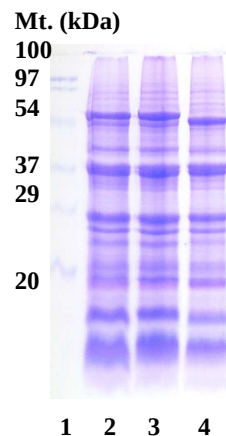
1. Mt.
2. Rozs (*Secale cereale*), Amilo, 2004
3. Rozs (*Secale cereale*), Rapid, 2004
4. Rozs (*Secale cereale*), GK Wibro, 2004
5. Rozs (*Secale cereale*), Matador, 2004
6. Rozs (*Secale cereale*), Gamet, 2004

c.

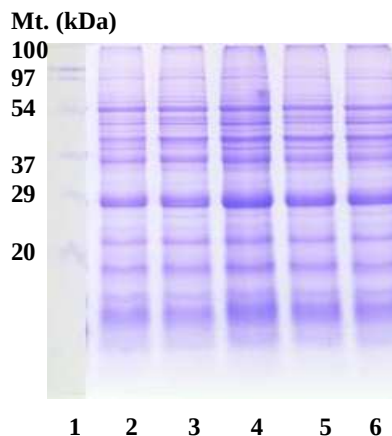
1. Mt.
2. Árpa (*Hordeum vulgare*), tavaszi, STC I. 22-03, 2004
3. Árpa (*Hordeum vulgare*), őszi, GK Rezi, 2004
4. Árpa (*Hordeum vulgare*), őszi, GK Rezi, 2005
5. Csupasz árpa (*Hordeum nuda*), őszi, C3/05, 2005
6. Csupasz árpa (*Hordeum nuda*), őszi, GK Árpád, 2005

d.

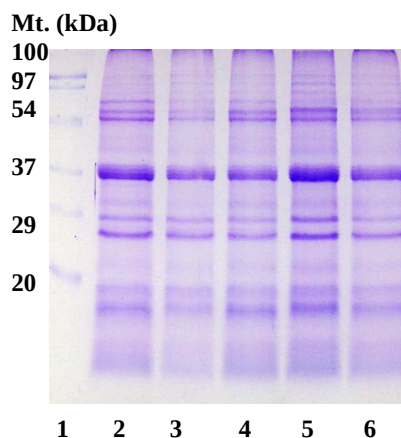
1. Mt.
2. Csupasz zab (*Avena nuda*), tavaszi, GK Zalán, 2004
3. Zab (*Avena sativa*), tavaszi, GK Iringó, 2004
4. Zab (*Avena sativa*), őszi, GK Impala, 2004
5. Zab (*Avena sativa*), tavaszi, GK Kormorán, 2005
6. Zab (*Avena sativa*), tavaszi, GK Pillangó, 2005



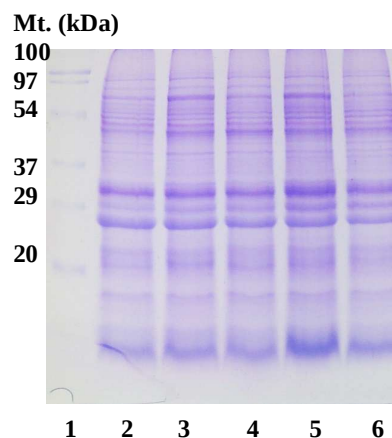
a. Amaránt



b. Hajdina



c. Kukorica



d. Rizs

12. ábra: Búzával nem-keresztreagáló gabonák/pszeudocereáliák SDS-PAGE-val történő elválasztása

a.

1. Mt.
2. Amaránt (*Amaranthus moleros*), GK Róza, 2003
3. Amaránt (*Amaranthus cruentus*), GK Maros, 2005
4. Amaránt (*Amaranthus hypochondriacus*), Edit, 2004

b.

1. Mt.
2. Hajdina (*Fagopyrum esculentum*)
3. Hajdina (*Fagopyrum esculentum*), 430 törzs, 2003
4. Hajdina (*Fagopyrum esculentum*), P425 törzs, 2004
5. Hajdina (*Fagopyrum esculentum*), P427 törzs, 2004
6. Hajdina (*Fagopyrum esculentum*), P429 törzs, 2004

c.

1. Mt.
2. Kukorica (*Zea mays*), Sze TC 206, 2004
3. Kukorica (*Zea mays*), Ella SC, 2004
4. Kukorica (*Zea mays*), Sze SC 352
5. Kukorica (*Zea mays*), Bella TC, 2004
6. Kukorica (*Zea mays*), Veronica SC, 2004

d.

1. Mt.
2. Rizs (*Oryza sativa*), Janka, 2003
3. Rizs (*Oryza sativa*), Bioryza, 2003
4. Rizs (*Oryza sativa*), Risabell, 2003
5. Rizs (*Oryza sativa*), Ábel, 2003
6. Rizs (*Oryza sativa*), Oryzella, 2003

Jól látható, hogy a különféle gabonafajták SDS-PAGE-val elválasztott fehérjefrakciói, fajtánként jellemzően eltérő mintázatot mutattak. A különböző fajták fehérje-eloszlásának különbözősége illetve kismértékű hasonlósága az egymáshoz való rokonsági kapcsolatuk alapján is magyarázható (lásd 2.6. pontban). Jól látható, hogy a búzával keresztreagáló, szintén a Triticeae nemzetségbe tartozó tritikálé, rozs, árpa a búzához közel hasonló molekulatömegű fehérjesávokkal rendelkezett. Ezekhez képest az előzőekkel azonos alcsaládba (Pooideae), de más nemzetségbe (Aveneae) tartozó zab kisebb molekulatömegű intenzív sávokat tartalmazott. A búzával nem-keresztreagáló gabonák közül a kukorica és a rizs fehérje-mintázata a velük azonos rendbe (Poaceae) tartozó zabhoz hasonlított a legjobban. A taxonómiai távoli rokonságban lévő amaránt és hajdina fajták fehérjei ugyan az erősebb intenzitású sávjaikban hasonlítottak a zabhoz, de a teljes fehérje-összetételüket tekintve nagymértékben különböztek.

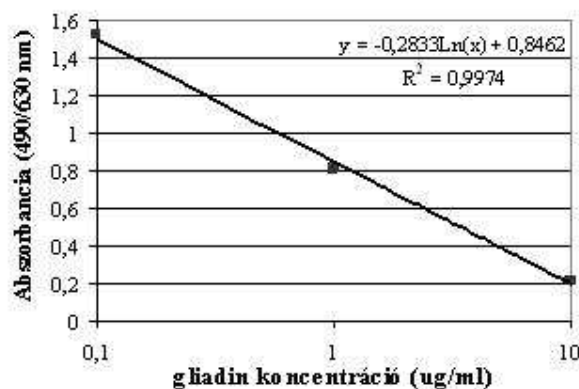
Az adott gabona/pszeudocereália fajtákon belül a fajok fehérje-mintázata közel azonos, csak kismértékű különbség figyelhető meg.

A búzaminták fehérjei elsősorban a 30 kDa és 100 kDa közötti molekulatömeg-tartományban adtak sűrű intenzív sávokat. A búzához hasonlóan a tritikálé, a rozs és az árpa esetében is, a fehérjesávok a 30-100 kDa molekulatömeg közé estek, és a búzához képest csak kevesebb frakcióra váltak szét. A zab legintenzívebb sávjai a 26-27 kDa és a 34-38 kDa tartományban mutatkoztak. Az amaránt fehérjekomponensei az egész tartományon (10-100 kDa között) szinte egyenletesen oszlottak el. Kiemelkedően intenzív sávjai a 27, 35, 58 kDa-nál találhatók. A hajdina fehérje-mintázata, összetétele és mennyisége hasonlóságot mutatott az amarántéval. A fő intenzív sávok szintén a 27, 35, 58 kDa-nál találhatók. A kukorica fő intenzív sávjai 25 kDa-nál és 31 kDa-nál, míg a rizs intenzív sávjai a 28, 31, 36, 55, 63 és 76 kDa-nál láthatók.

5.1.1.2. Gliadintartalom meghatározása kompetitív indirekt ELISA-val

A gluténmentes élelmiszerek ellenőrzésére gliadin-specifikus immunanalitikai módszereket ajánl a szabályozás, ezért kompetitív indirekt típusú gliadin-specifikus ELISA-t adaptáltam, abból a célból, hogy meghatározzam a hazai búzafajtákban, a búzával keresztreagáló prolamínokban és a nem-keresztreagáló gabonákban, illetve pszeudocereáliákban található gliadintartalmat.

A gliadin kalibrációs görbe lineáris (0,1-10 µg/ml) tartományában (**13. ábra**) mért eredmények szerint a gliadin-specifikus poliklonális ellenanyag csak a búza és a tritikále mintákban ismerte fel a gliadint. A rozs, árpa, zab, kukorica, rizs, amaránt és hajdina mintában nem találtam aktivitást. Az egyes mintákban mért gliadintartalmat és a kapott értékek szórásait a **13. táblázat** tartalmazza. A mintákat három párhuzamosban mértem a lemezre, a mérést kétszer ismételt meg.



13. ábra: Standard görbe gliadintartalom meghatározására kvantitatív kompetitív indirekt ELISA-val mérve

13. táblázat: Poliklonális anti-gliadin nyúl IgG ellenanyaggal felismert gliadintartalom

Minták	Gliadintartalom (mg/100 mg liszt)	Szórás (mg/100 mg liszt)
búza (<i>Triticum aestivum</i>), GK Tisza, 2004	4,174	0,9
búza (<i>Triticum spelta</i>), ÖKO-10, 2004	3,944	0,69
búza (<i>Triticum durum</i>), D-78, 2004	1,624	0,43
búza (<i>Triticum aestivum</i>), GK Cipó, 2004	2,489	1,2
búza (<i>Triticum aestivum</i>), CY-45Q, 2001	2,512	0,33
tritikálé (<i>Triticosecale</i> sp.), tavaszi, Kargo, 2004	1,853	0,41
tritikálé (<i>Triticosecale</i> sp.), tavaszi, EMBR 18, 2004	4,677	2,52
tritikálé (<i>Triticosecale</i> sp.), tavaszi, GK korai, 2004	4,017	1,00
tritikálé (<i>Triticosecale</i> sp.), tavaszi, Wanad, 2004	2,416	0,73
tritikálé (<i>Triticosecale</i> sp.), tavaszi, GK Idus, 2004	4,406	0,68

5.1.1.3. α -amiláz inhibitor nyúl IgG ellenanyag előállítása

A cöliákiás betegek számára a gluténmentes étrend az egyetlen diéta. Számukra elengedhetlen az élelmiszerek gliadinmentességének kimutatása. A gabonaallergiások számára ugyanakkor jelentősége lehet a szintén prolamin szupercsaládba tartozó α -amiláz inhibitor fehérjék kimutatásának, mivel a gliadinokon túl ezek is előidézhetnek tüneteket.

Anti- α -amiláz inhibitor nyúl IgG ellenanyag nem kapható kereskedelmi forgalomban, így a vizsgálat elvégzése céljából szükség volt az előállítására. Az immunizáláshoz antigénként a kereskedelmi forgalomban kapható búza eredetű α -amiláz inhibitor (TrimW, Nutricepts) használtam. Mivel az α -amiláz inhibitor készítmény kb. 10%-os tisztasági foka nem volt megfelelő az immunizáláshoz, azt egy új eljárással nagyobb tisztaságúra dúsítottam az egyéb anyagok leválasztásával DEAE-cellulóz anioncserélő kromatográfiával a 4.2.1.2. pontban megadott módszer szerint. Az elválasztással kapott két frakció α -amiláz inhibitor aktivitását MURAO et al. (1981)

által megadott protokoll alapján határoztam meg. A kiindulási TrimW α -amiláz inhibitor aktivitáshoz képest (10%) a dúsítással megnőtt az α -amiláz inhibitor aktivitás mindkét frakcióban. Az 1. frakció 67%, a 2. frakció 95%-os aktivitást mutatott. Mivel a 2. frakció nagyobb enzimaktivitással rendelkezett és egyben tisztasága is megfelelt az immunizálási követelményeknek, HARBOE and INGILD (1973) által kidolgozott szisztémás immunizálási protokollnak megfelelően, nyúlban a tisztított α -amiláz inhibitorra specifikus poliklonális ellenanyagot állítottam elő.

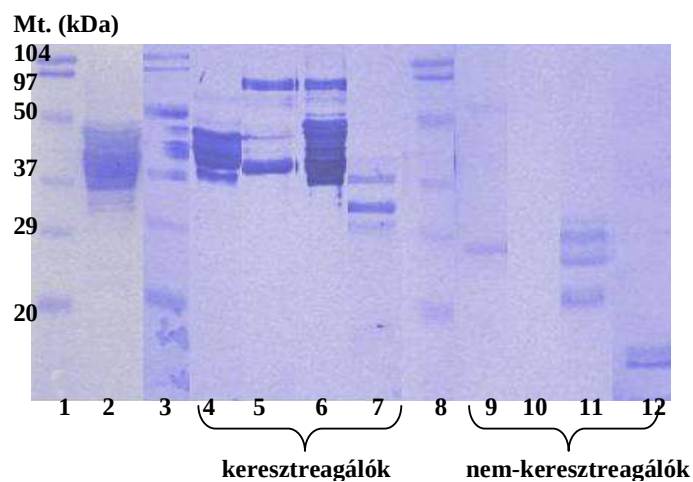
5.1.1.4. A gabonák és pszeudocereáliák gliadin és α -amiláz inhibitor specifikus ellenanyaggal szemben mutatott antigenitásának vizsgálata

A búza két fő allergéncsoportja a gliadinok (α -gliadinok 40 kDa, ω 5-gliadinok 65 kDa) és az α -amiláz inhibitorok (0.53 15 kDa, CM3 14 kDa, amely tetramer forma esetén 60 kDa) (www.informall.eu.com). Funkciójuk szerint a gliadinokhoz tartozó ω 5-gliadin kivételével a vizsgált allergének az α -amiláz/tripszin inhibitor családba tartoznak.

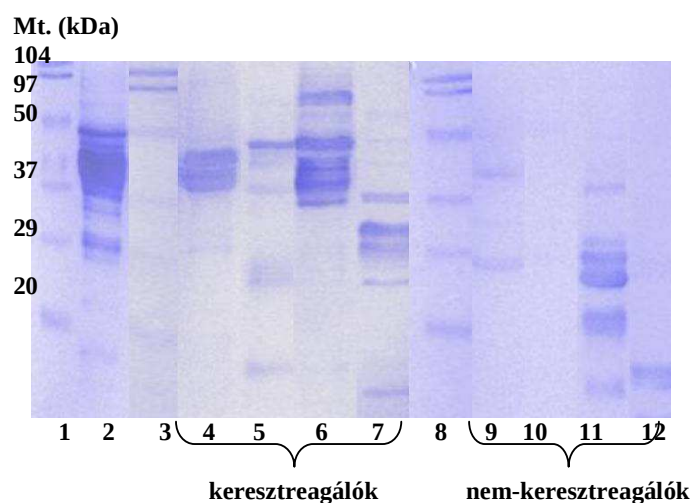
A két fő allergén csoportra fókuszálva, immunblott technika segítségével az elektroforézissel szétválasztott és elektroforetikusan membránra átblottolt fehérjéknek a búza gliadin (**14/a. ábra**) és a búza α -amiláz inhibitor (**14/b. ábra**) ellen kifejlesztett antitestekkel szemben mutatott reaktivitást mértem búzában, valamint a búzával keresztreagáló- és nem-keresztreagáló gabonákban, pszeudocereáliákban.

A különböző gabonafélék (búza, árpa, rozs, tritikálé, zab, kukorica) igen eltérő sávokban mutattak különböző intenzitású reaktív sávokat. Az amaránt és a hajdina csak nagyon kis mértékben mutattak keresztaktivitást. Ezzel a vizsgálattal módomban volt a gabonafélék és a pszeudocereáliák (amaránt, hajdina) elkülönítésére a búza gliadin -, a búza α -amiláz inhibitor - illetve a velük keresztreagáló többi fehérjefrakció jelenléte vagy hiánya alapján.

Összehasonlítva a két ellenanyaggal végzett immunblott ábrákat, jól látható, hogy az anti-gliadin nyúl IgG és anti- α -amiláz inhibitor nyúl IgG ellenanyagok közel azonos molekulatömeg tartományban ismertek fel fehérjéket. Az antigének hasonló immunaffinitása azzal magyarázható, hogy a gliadinok többsége, funkciójuk szerint szintén az α -amiláz/tripszin inhibitor szupercsaládba tartozik (www.informall.eu.com). A kapott eredmények alapján belátható, hogy az adott mintában lévő célfehérjék így kevésbé azonosíthatók. Ebből azt a következtetést vontam le, hogy a gliadin és az α -amiláz inhibitor antigének vizsgálatához az egylépcsős fehérje kioldás helyett többlépcsős extrakcióra van szükség.



a. anti-gliadin nyúl IgG ellenanyaggal szemben mutatott reaktivitás



b. anti- α -amiláz inhibitor nyúl IgG ellenanyaggal szemben mutatott reaktivitás

14. ábra: Gabonák és pszeudocereáliák anti-gliadin nyúl IgG és anti- α -amiláz inhibitor nyúl IgG ellenanyagokkal felismert fehérje antigénjeinek immunblottjai

a./b.

1. Mt.
2. Búza (*Triticum aestivum*), GK Cipó, 2004
3. Mt.
4. Árpa (*Hordeum vulgare*), tavaszi, STC I. 22-03, 2004
5. Rozs (*Secale cereale*), Amilo, 2004
6. Tritikálé (*Triticosecale* sp.), tavaszi, EMBR 18, 2004
7. Csupasz zab (*Avena nuda*), tavaszi, GK Zalán, 2004
8. Mt.
9. Amaránt (*Amaranthus cruentus*), GK Maros, 2005
10. Hajdina (*Fagopyrum exculentum*), 430 törzs, 2003
11. Kukorica (*Zea mays*), Ella SC, 2004
12. Rizs (*Oryza sativa*), Bioryza, 2003

5.1.2. Gabonák és pszeudocereáliák víz/só- és alkohololdható fehérjefrakcióinak vizsgálata

Mivel nehéz elkülöníteni, hogy az alkalmazott poliklonális ellenanyagok mely oldhatósági frakcióban lévő allergén fehérjéket tudják felismerni, ezért az oldható fehérjéket két fő allergént (α -amiláz inhibitor, gliadin) tartalmazó frakcióra szeparáltam, azaz 50 mM-os Trisz-HCl pufferben (pH 8,5) oldható víz/só- és 70%-os etanol oldható frakcióra. A fehérjék poliklonális ellenanyagokkal felismert reaktivitását mindkét frakcióban monitoroztam. A későbbiekben, e két frakció gabonaallergiás és cöliákiás hiperimmun szérumokkal szemben mutatott reaktivitását vetettem össze korábbi eredményeimmel az alábbiak szerint.

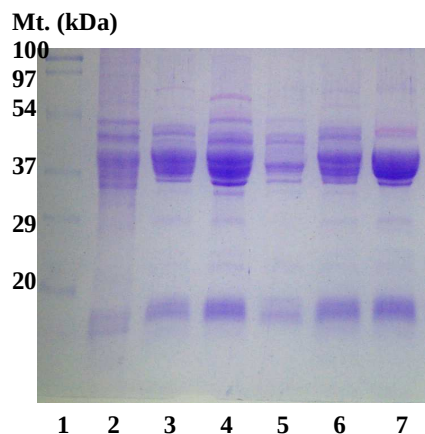
Mivel a gabonaallergia IgE mediált reakció, ezért a prolaminok IgE reaktivitását gabonaallergiás anonim betegszérumokkal is megvizsgáltam. A cöliákia esetében az anti-gliadin IgA ellenanyagok emelkedett szintje jelző értékű lehet, ezért vizsgáltam a prolaminok cöliákiás anonim betegszérumokkal szemben mutatott IgA reaktivitását. A vizsgált fehérjéket SDS-poliakrilamid gélen szeparáltam, majd PVDF membránra átblottoltam, ezután a rendelkezésemre bocsátott gabona-pozitív vagy cöliákiás anonim betegszérumok felhasználásával immunblotton azonosítottam az IgE vagy IgA keresztreaktív csoportokat.

5.1.2.1. Gabonák és pszeudocereáliák alkohololdható frakciónak vizsgálata

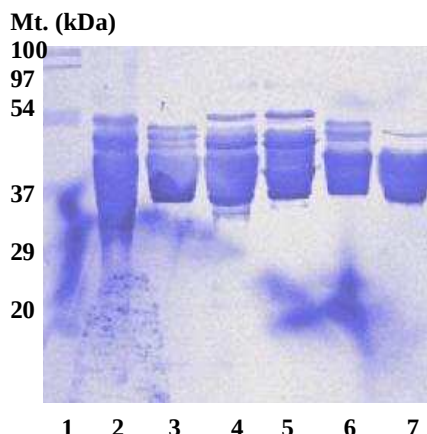
A vizsgált minták 70%-os etanollal extrahált fehérjefrakcióit SDS-PAGE-val elválasztottam, majd a fehérjék antigenitás vizsgálatát anti-gliadin nyúl IgG ellenanyaggal szemben végeztem.

A hazai búzafajták alkohololdható fehérjefrakciói a **15/a. ábrán**, míg a gliadin-specifikus ellenanyaggal felismert fehérje antigének immunblottja a **15/b. ábrán** látható. A gliadin antigének a 37-54 kDa közötti molekulatömeg tartományban találhatók, búzafajtánként kismértékben eltérő eloszlásban, melyeket a gliadin-specifikus poliklonális ellenanyag minden esetben felismert.

A búzával keresztreakáló és nem-keresztreakáló gabonák/pszeudocereáliák alkohololdható fehérjefrakcióit a **16/a. ábra**, a gliadin-specifikus ellenanyaggal keresztreakáló fehérje antigének mintázatát, pedig a **16/b. ábra** mutatja be. A vizsgált minták közül az amaránt, a hajdina és a rizs nem tartalmaz 70%-os alkoholban oldható prolaminoikat. A búzával keresztreakáló gabonák és a kukorica alkohololdható fehérje-mintázatai eltérnek. A rozs-, tritikálé- és az árpa prolamin fehérjéinek többsége hasonló molekulatömeg tartományban található (37-54 kDa); míg a zab esetében a 29-37 kDa között lévő fehérjék -, a kukorica esetében, pedig a 26-29 kDa-nál lévő fehérjesávok alkotják a 70%-os alkoholban oldható fehérjéket.



a.

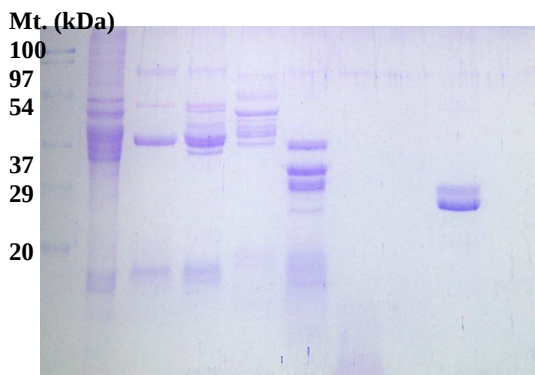


b.

15. ábra: Búzafajták alkohololdható fehérjefrakcióinak SDS-poliakrilamid gélen történő elválasztása (a.) és immunblottja anti-gliadin nyúl IgG ellenanyaggal szemben (b.)

a./b.

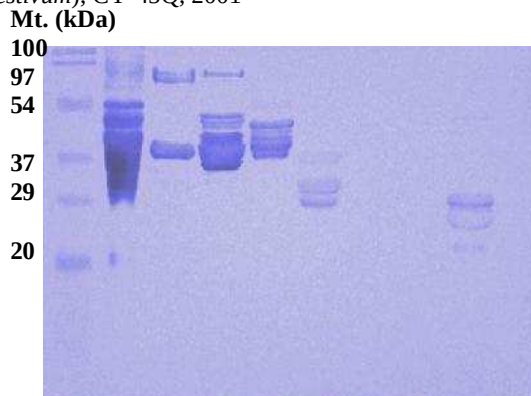
1. Mt.
2. búza gliadin (Sigma)
3. búza (*Triticum aestivum*), GK Tisza, 2004
4. búza (*Triticum spelta*), ÖKO-10, 2004
5. búza (*Triticum durum*), D-78, 2004
6. búza (*Triticum aestivum*), GK Cipó, 2004
7. búza (*Triticum aestivum*), CY-45Q, 2001



keresztreagálók

nem-keresztreagálók

a.



keresztreagálók

nem-keresztreagálók

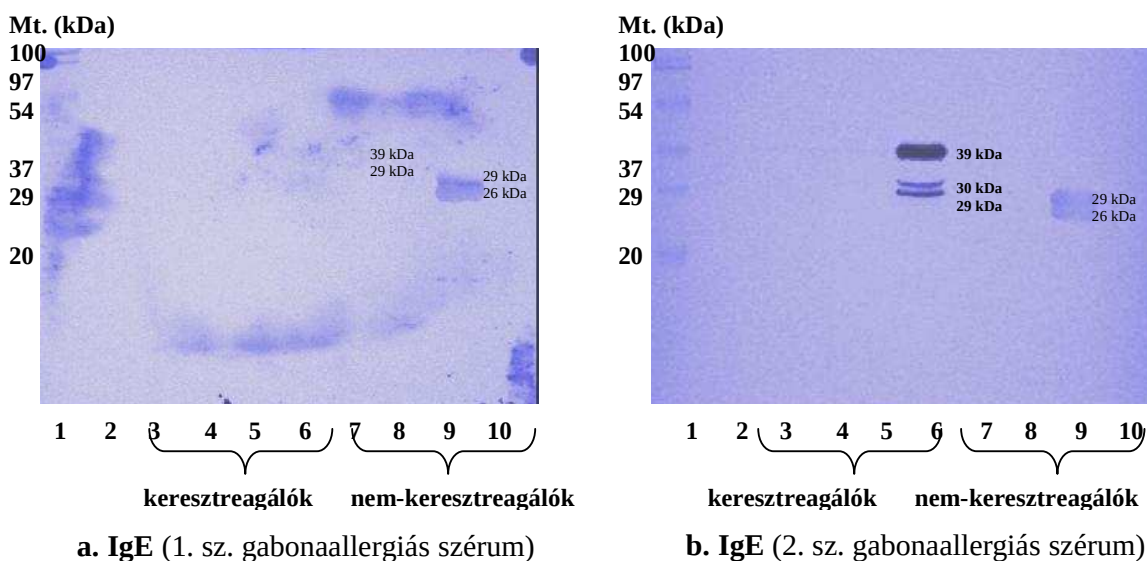
b.

16. ábra: Búzával keresztreagáló és nem-keresztreagáló gabonák és pszeudocereáliák alkohololdható fehérjefrakcióinak SDS-poliakrilamid gélen történő elválasztása (a.) és immunblottja anti-gliadin nyúl IgG ellenanyaggal szemben (b.)

a./b.

1. Mt.
2. Búza gliadin (Sigma)
3. Rozs (*Secale cereale*), Amilo, 2004
4. Tritikálé (*Triticosecale* sp.), tavaszi, EMBR 18, 2004
5. Árpa (*Hordeum vulgare*), tavaszi, STC I. 22-03, 2004
6. Csupasz zab (*Avena nuda*), tavaszi, GK Zalán, 2004
7. Amaránt (*Amaranthus cruentus*), GK Maros, 2005
8. Hajdina (*Fagopyrum exculentum*), 430 törzs, 2003
9. Kukorica (*Zea mays*), Ella SC, 2004
10. Rizs (*Oryza sativa*), Bioryza, 2003

A hazai búzafajták alkohololdható fehérjéinek gabonaallergiás szérumokkal szembeni IgE immunreaktivitását vizsgálva megállapítottam, hogy a rendelkezésemre álló szérumok nem adtak IgE-reaktív sávokat gliadinokkal. Ezen gabonaallergiás szérumokkal vizsgáltam a búzával keresztreakgáló és nem-keresztreakgáló gabonák/pszeudocereáliák keresztreaktivitását is. Mivel a különböző szérumokkal kapott IgE-specifikus immunblottok nem mutattak széles variabilitást, ezért eredményeimet csak két, reprezentatív szérummal készült immunblott ábrával szemléltetem (17. ábra). Erős keresztreaktivitást kaptam a kukorica alkohololdható zein-fehérjéire (26-29 kDa), és egy gyenge reakciót a zab avenin-fehérjéire (29-39 kDa). A 2. számú gabonaallergiás szérum a minták alkohololdható frakciói közül a zab 29, 30 és 39 kDa-os fehérjéinél, a kukorica 26 és 29 kDa-os fehérjéinél adott erős IgE keresztreaktivitást; míg a rozsnál, a tritikálénál, az árpánál az IgE-reaktivitás csak egy-egy, nagyon halvány fehérjesávban (39 kDa-nál) volt tapasztalható.

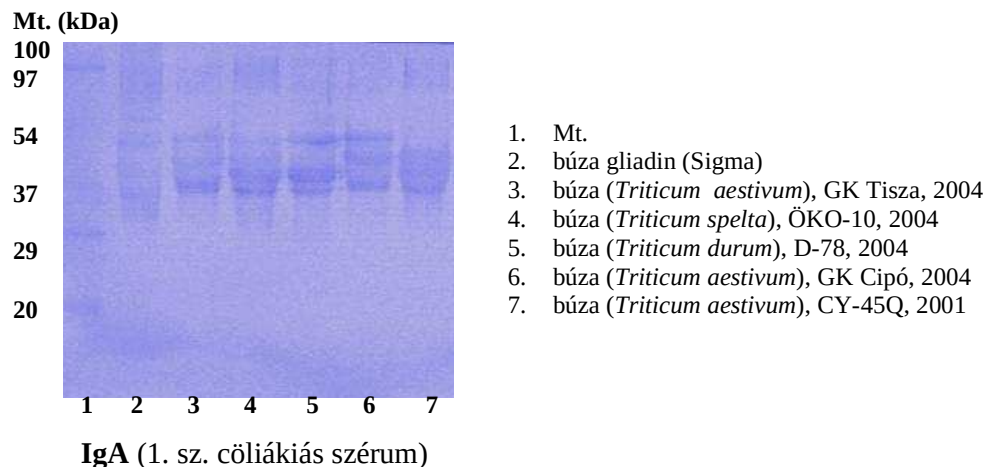


17. ábra: Búza és búzával keresztreakgáló/nem-keresztreakgáló gabonák/pszeudocereáliák alkohololdható fehérjefrakcióinak SDS-poliakrilamid gélen történő szeparálását követő IgE-specifikus immunoblottjai gabonaallergiás humán szérumokkal szemben

a./b.

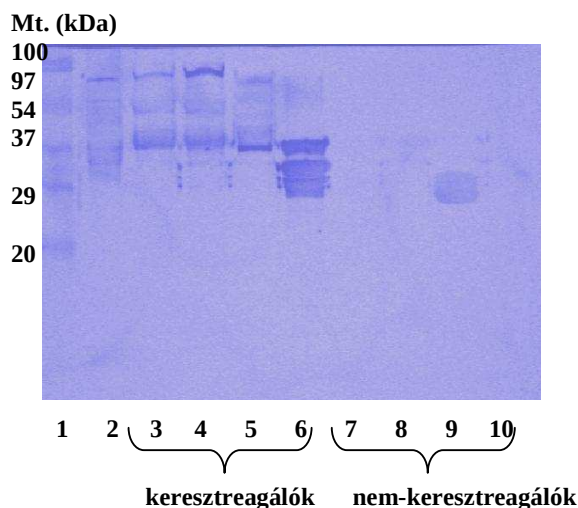
1. Mt.
2. Búza gliadin (Sigma)
3. Rozs (*Secale cereale*), Amilo, 2004
4. Triticálé (*Triticosecale* sp.), tavaszi, EMBR 18, 2004
5. Árpa (*Hordeum vulgare*), tavaszi, STC I. 22-03, 2004
6. Csupasz zab (*Avena nuda*), tavaszi, GK Zalán, 2004
7. Amaránt (*Amaranthus cruentus*), GK Maros, 2005
8. Hajdina (*Fagopyrum esculentum*), 430 törzs, 2003
9. Kukorica (*Zea mays*), Ella SC, 2004
10. Rizs (*Oryza sativa*), Bioryza, 2003

A hazai búzafajták alkohololdható fehérjéinek cöliákiás betegszérumokkal felimert IgA-specifikus immunblott képét a **18. ábra** mutatja. A vizsgálatba vont cöliákiás humán szérumok mindegyike a 37-54 kDa tartományban mutatott erős IgA-reaktív immunmintázatot, melyet az 1. számú cöliákiás szérummal reprezentálók.

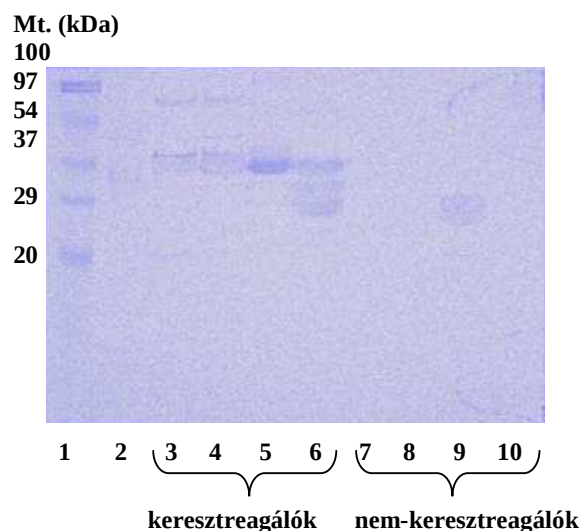


18. ábra: Búzafajták alkohololdható fehérjefrakcióinak cöliákiás humán szérummal szemben mutatott IgA-reaktivitásának immunblottja

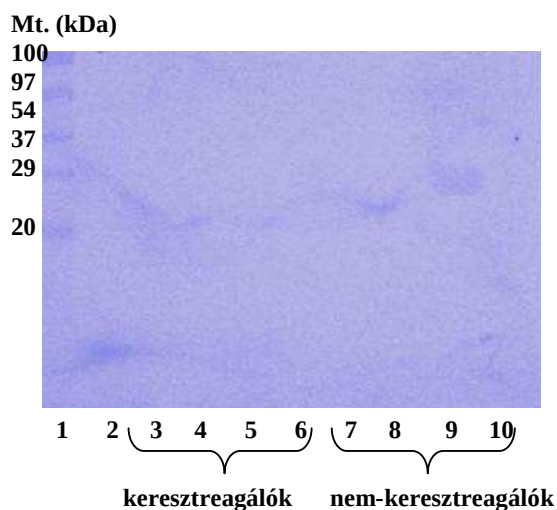
A búzával keresztreagáló és nem-keresztreagáló gabonák/pszeudocereáliák alkohololdható fehérjéinek cöliákiás betegszérumokkal szemben mutatott IgA-keresztreaktivitását a **19/a.,b.,c.,d. ábrák** szemléltetik. A rendelkezésemre álló cöliákiás szérum többsége (2, 3, 4. számú cöliákiás szérumok) a mintákban lévő szinte mindegyik prolamin fehérjével reagált. Kivételt képezett az 5. számú cöliákiás szérum, amely csak a kukoricában talált IgA-reaktív sávokat. Meglepő eredménynek tartom, hogy a kukorica is mutatott cöliákiás betegszérumokkal szemben IgA-reaktivitást, pedig a cöliákiás betegek diétájába javasolt gabonák közé tartozik. A jelenlegi ismeretek alapján ugyan klinikai tüneteket, bélboholy károsodást nem okoztak a kukorica zein fehérjéi, de mivel a cöliákia patomechanizmusa még nem teljesen ismert, szükséges lenne ezen reaktív fehérjék további vizsgálata.



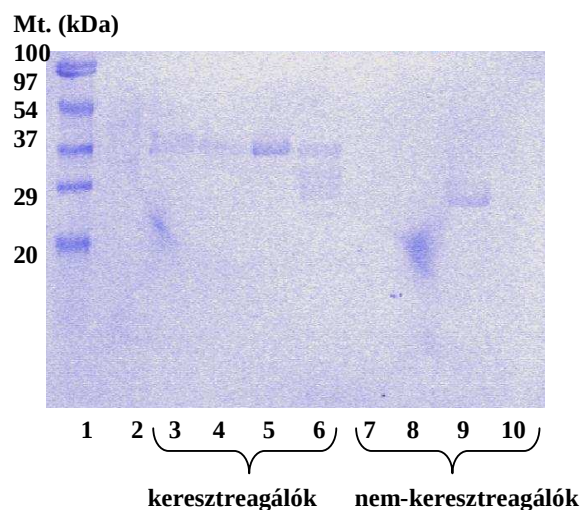
a. IgA (2. sz. cöliákiás szérum)



b. IgA (3. sz. cöliákiás szérum)



c. IgA (5. sz. cöliákiás szérum)



d. IgA (5. sz. cöliákiás szérum)

19. ábra: Búza és búzával keresztreagáló/nem-keresztreagáló gabonák/pszeudocereáliák alkohololdható fehérjefrakcióinak SDS-poliakrilamid gélen történő szeparálását követő cöliákiás humán szérummal szemben mutatott IgA-reaktivitásának immunblottja

a./b./c./d.

1. Mt.
2. Búza gliadin (Sigma)
3. Rozs (*Secale cereale*), Amilo, 2004
4. Triticálé (*Triticosecale* sp.), tavaszi, EMBR 18, 2004
5. Árpa (*Hordeum vulgare*), tavaszi, STC I. 22-03, 2004
6. Csupasz zab (*Avena nuda*), tavaszi, GK Zalán, 2004
7. Amaránt (*Amaranthus cruentus*), GK Maros, 2005
8. Hajdina (*Fagopyrum exculentum*), 430 törzs, 2003
9. Kukorica (*Zea mays*), Ella SC, 2004
10. Rizs (*Oryza sativa*), Bioryza, 2003

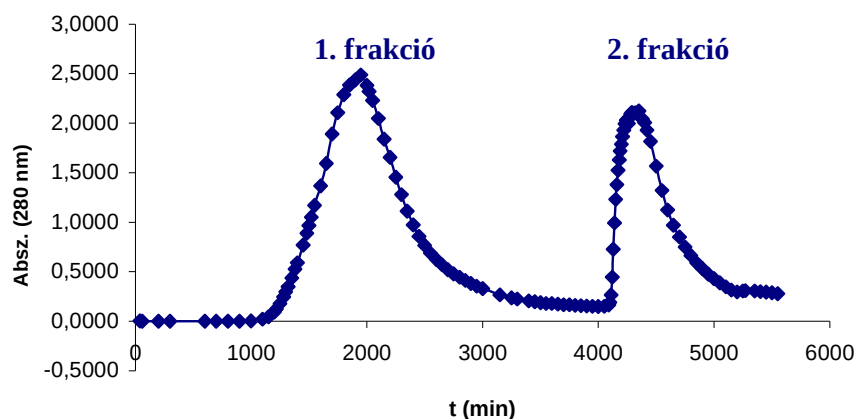
5.1.2.2. Búzák víz- és sóoldható frakcióinak α -amiláz inhibitorban való feldúsítása

Az α -amiláz inhibitor szupercsaládba tartozó búzafehérjék különösen gyakori allergének a gabonaallergiás betegek körében, ezért célszerűnek láttam a víz- és sóoldható frakció ezen fehérjékre irányított alaposabb vizsgálatát.

A búza α -amiláz inhibitorok, gabonaallergiás szérumokkal való célirányos felismeréséhez, kereskedelmi forgalomból származó, α -amiláz inhibitor minta (TrimW) analógiáján, a víz- és sóoldható búzafehérje-frakciót α -amiláz inhibitorban dúsítottam. A WEISS et al. (1993) által bevezetett, módosított albumin/globulin kioldás (50 mM Trisz-HCl puffer (pH 8,5) a 0,15 M NaCl-os Osborne-féle kioldás helyett) DEAE-cellulóz kromatográfia kidolgozását tette lehetővé.

A pufferben oldott fehérje töltését a fehérje izoelektromos pontja és a puffer pH-ja közötti különbség határozta meg. A fehérje ionok szétválasztásában nagy jelentőségűek a különböző kémiai módosításokkal ioncserélő sajátosságúvá tett cellulóz származékok; ezek a lecserélhető iontól függően lehetnek anion-, illetve kationcserélők. Az egyik leggyakrabban használt anioncserélő a DEAE-cellulóz (Diethyl-Amino-Etil-cellulóz), ahol az anioncserélő tulajdonságot a szálak felületén elhelyezkedő dietil-amino-etil-csoportok kölcsönözik a cellulóznak. Így a DEAE-cellulóz az alkalmazott puffer pH-jánál kisebb izoelektromos pontú fehérjéket (amelyek tehát negatív töltést hordoznak) megköti. Az ionerősség vagy a pH fokozatos változtatásával a fehérje anionok elektromos töltésük erősségétől függően szekvenciálisan elválhatnak. WEISS et al. (1993) által a pH 5,0 és pH 9,0 izoelektromos pont között 2D-ben elválasztott víz- és sóoldható búzafehérjék közül az IgE ellenanyaggal felismert α -amiláz inhibitorok a pH 4-8,5 izoelektromos pont között helyezkedtek el. Ennek megfelelően a puffer pH-ját 8,5-re állítottam be. Az alkalmazott pufferes extrahálással egyben az elektroforetikus- és a kromatográfiás elválasztás kompatibilitását biztosítottam. Emellett törekedtem az extrahálás reprodukálhatóságára, melyet a minták megfelelő homogenitásával (lisztek szemcsemérete: 250 μ m), térfogatarányával, a hőmérséklet és az időtartam pontos betartásával értem el.

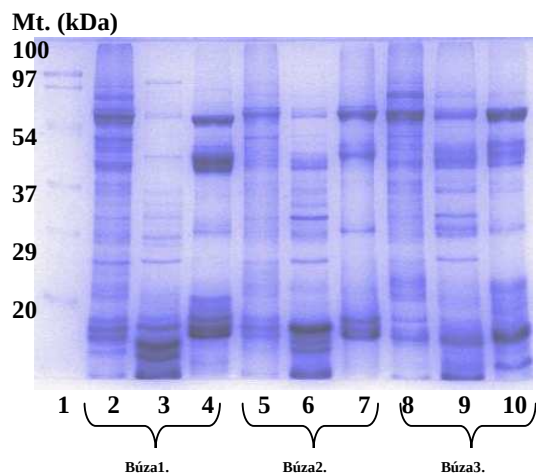
Az elválasztással kapott kromatogrammok reprezentatív képét a **20. ábra** mutatja. Minden minta esetében két csúcsban lejelölt frakciót kaptam, azaz az 50 mM Trisz-HCl startpufferrel (pH 8,5) eluált, oszlopon meg nem kötődött frakciót (1. frakció), és a 15 mM NaCl-tartalmú 50 mM Trisz-HCl pufferrel (pH 8,5) eluált, oszlopon megkötött frakciót (2. frakció).



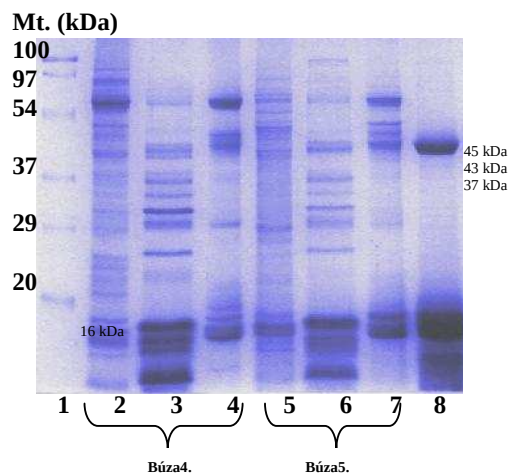
20. ábra: Búzák víz- és sóoldható frakciójának DEAE-cellulóz ioncserélő oszlopon történő α -amiláz inhibitorokban dús frakcióinak spektrofotométeres nyomonkövetése

5.1.2.3. Gabonák és pszeudocereáliák víz- és sóoldható frakcióinak vizsgálata

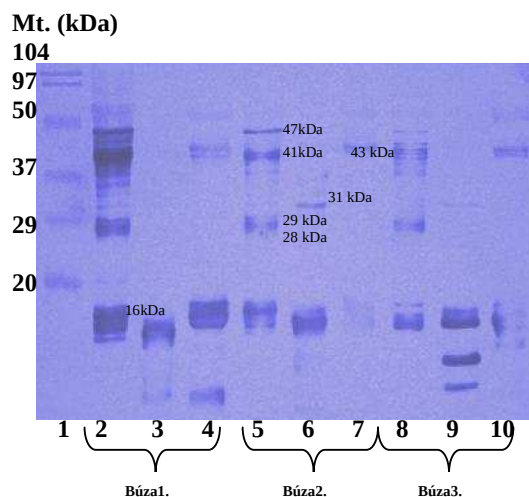
A búzafajták α -amiláz inhibitorban dúsított fehérjefrakcióinak, valamint a kontrollként használt TrimW-2. frakciónak SDS-PAGE-val történő elválasztását a **21/a.,b. ábrákon**, míg a búzával keresztreagáló és nem-keresztreagáló gabonák és pszeudocereáliák 50 mM Trisz-HCl pufferben (pH 8,5) oldható fehérjéinek SDS-PAGE képét a **22/a. ábrán** szemléltetem. Az oldható fehérje komponensek minden búzaminta esetében kitöltötték a teljes molekulatömeg-tartományt (10-97 kDa). A kontrol α -amiláz inhibitor készítmény (TrimW)-2. frakciója viszont a 9-16 kDa közötti tartományban öt -, a 37-45 kDa közötti tartományban, pedig három fehérjesávot mutatott. A szeparált fehérjéket PVDF membránra történő elektroforetikus átblottolásuk után TrimW-2. frakcióra specifikus nyúl IgG ellenanyaggal reagáltattam. A búzafajták α -amiláz inhibitorokban dús frakcióiban kimutatható reaktív fehérjék immunblott képét a **21/c.,d. ábrák** -, míg a búzával keresztreagáló és nem-keresztreagáló gabonák, pszeudocereáliák reaktivitását a **22/b. ábra** mutatják be.



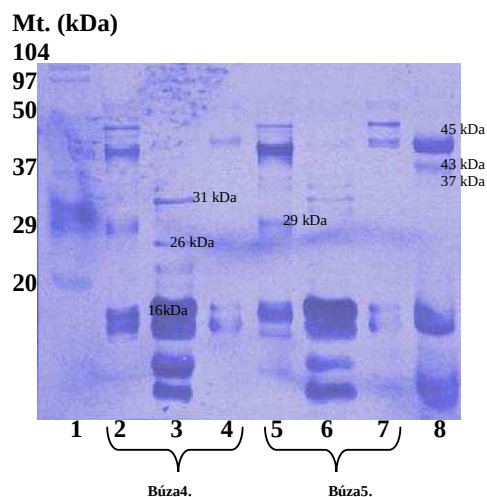
a.



b.



c.



d.

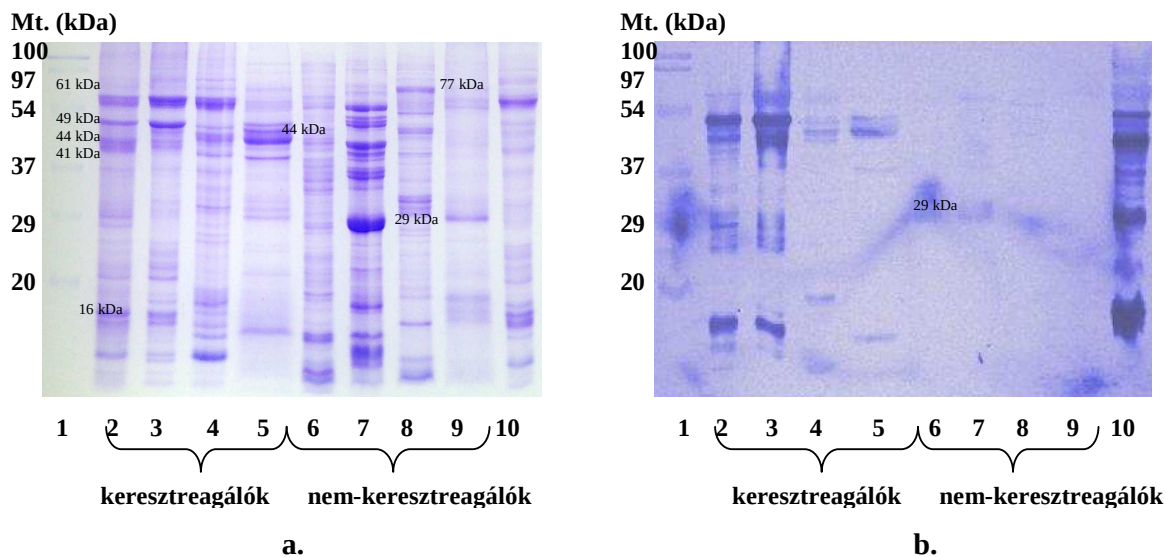
21. ábra: Búzafajták víz/sóoldható fehérjefrakcióinak SDS-poliakrilamid gélen történő elválasztása (a./b.) és immunblottja anti-TrimW-2. frakció nyúl IgG ellenanyaggal szemben (c./d.)

a./c.

b./d.

1. Mt.
2. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - extrakt
3. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - 1. frakció
4. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - 2. frakció
5. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 - extrakt
6. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 - 1. frakció
7. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 - 2. frakció
8. *T. durum*, D-78, 2004 - extrakt
9. *T. durum*, D-78, 2004 - 1. frakció
10. *T. durum*, D-78, 2004 - 2. frakció

1. Mt.
2. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - extrakt
3. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 1. frakció
4. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 2. frakció
5. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- extrakt
6. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- 1. frakció
7. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- 2. frakció
8. TrimW-2. frakció



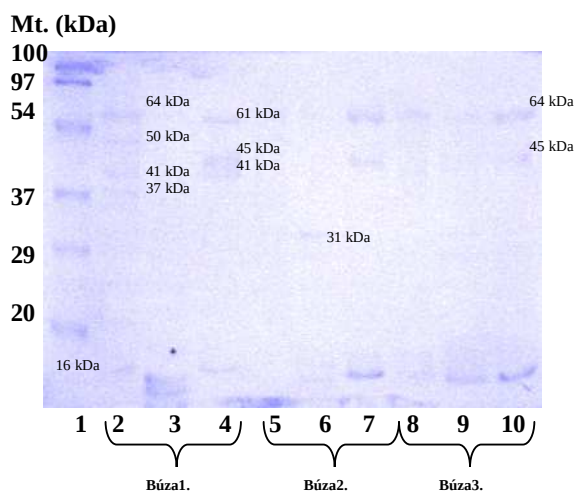
22. ábra: Búzával keresztreagáló és nem-keresztreagáló gabonák, valamint pszeudocereáliák víz/sóoldható fehérjefrakcióinak SDS-poliakrilamid gélen történő elválasztása (a.) és immunblottja anti-TrimW-2. frakció nyúl IgG ellenanyaggal szemben (b.)

a./b.

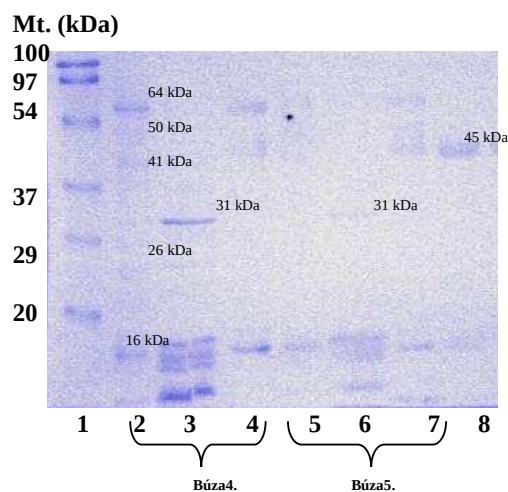
1. Mt.
2. Rozs (*Secale cereale*), Amilo, 2004
3. Tritikálé (*Triticosecale* sp.), tavaszi, EMBR 18, 2004
4. Árpa (*Hordeum vulgare*), tavaszi, STC I. 22-03, 2004
5. Csupasz zab (*Avena nuda*), tavaszi, GK Zálán, 2004
6. Amaránt (*Amaranthus cruentus*), GK Maros, 2005
7. Hajdina (*Fagopyrum esculentum*), 430 törzs, 2003
8. Kukorica (*Zea mays*), Ella SC, 2004
9. Rizs (*Oryza sativa*), Bioryza, 2003
10. Búza (*Triticum aestivum*), GK Cipó, 2004

A búzafajták víz/sóoldható extraktjainak és azok α -amiláz inhibítort tartalmazó két frakciójának különböző anoním, egyedi gabonaallergiás humán szérumokkal vizsgált IgE-specifikus immunblottjait a **23/a., b., c., d. ábrákon** foglaltam össze.

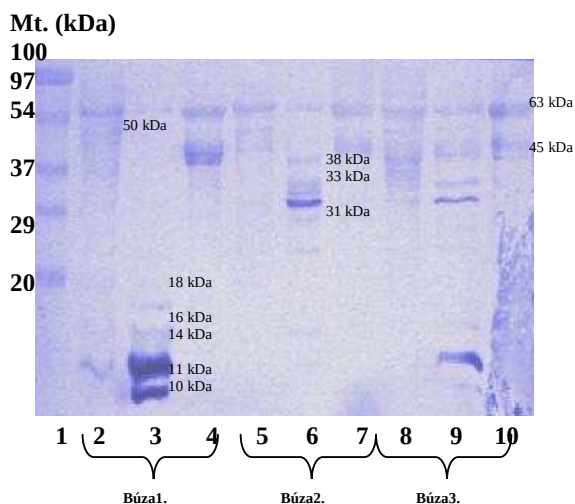
A **23/a.,b. ábrákon** jól látható, hogy a rendelkezésemre álló 1. számú búzaallergiás szérummal a „TrimW-2. frakció”-ban két fő IgE-reaktív sáv különült el (16 kDa, 45 kDa). A szérum minden hazai búzafajta só/víz oldható 1. frakciójában erős IgE-specifikus immunreaktív fehérjesávot adott 31 kDa-nál és a 13-16 kDa közötti fehérjéknél. Minden vizsgált búzafajta víz/sóoldható 2. frakciójában a szérum a 45 kDa és 63 kDa, valamint a 13-16 kDa közötti fehérjéknél talált jellemzően IgE-reaktív csoportot. Minden búzafajtánál megállapítható, hogy a szérum IgE ellenanyaga az 1. és 2. frakcióban talált fehérjéket az extrakt frakciókban is többnyire felismerte.



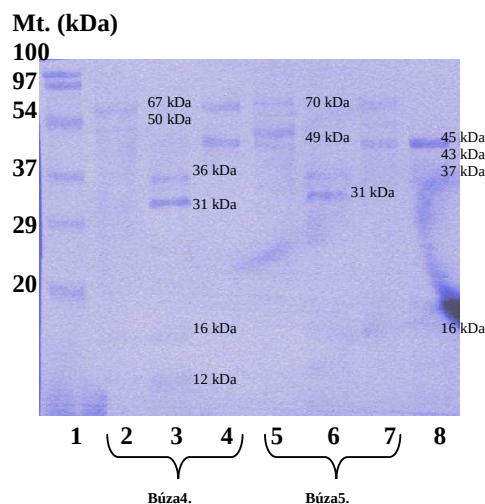
a. IgE (1. sz. gabonaallergiás szérum)



b. IgE (1. sz. gabonaallergiás szérum)



c. IgE (2. sz. gabonaallergiás szérum)



d. IgE (2. sz. gabonaallergiás szérum)

23. ábra: Búzafajták víz/sóoldható fehérjefrakcióinak SDS-poliakrilamid gélen történő szeperálását követő gabonaallergiás humán szérumokkal szemben mutatott IgE-reaktivitásának immunblottjai

a./c.

1. Mt.
2. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - extrakt
3. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - 1. frakció
4. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - 2. frakció
5. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 - extrakt
6. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 -1. frakció
7. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 - 2. frakció
8. *T. durum*, D-78, 2004 - extrakt
9. *T. durum*, D-78, 2004 -1. frakció
10. *T. durum*, D-78, 2004 -2. frakció

b./d.

1. Mt.
2. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - extrakt
3. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 1. frakció
4. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 2. frakció
5. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- extrakt
6. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- 1. frakció
7. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- 2. frakció
8. TrimW-2. frakció

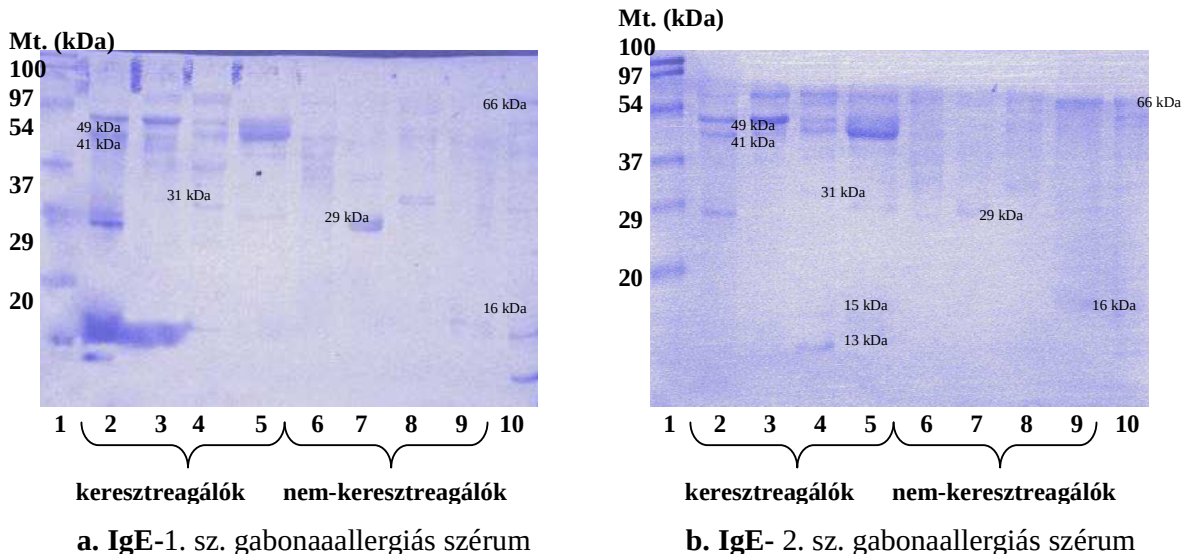
A **23/c.,d. ábrákon** jól látható, hogy a rendelkezésemre álló 2. számú búzaallergiás szérum a „TrimW-2. frakció”-ban egy 16 kDa-os IgE-reaktív fehérjét, valamint a 37-45 kDa közötti tartományban három IgE-reaktív fehérjét talált. A szérum a búzafajtákat tekintve, mind az extraktban, mind az 1. és 2. frakcióban a 29-85 kDa közötti fehérjékkel adott IgE-specifikus reaktivitást. Minden minta esetében a legintenzívebb IgE-reaktív sávok a 10-16 kDa között, 31, 37, 45, 63 kDa-nál fordultak elő.

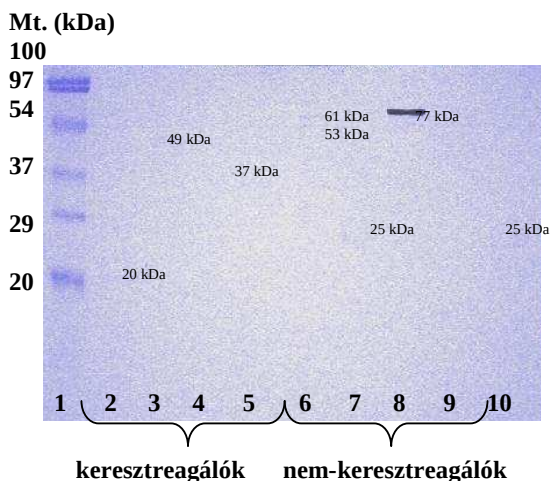
A búzával keresztreagáló és nem-keresztreagáló gabonák, pszeudocereáliák víz/sóoldható extraktjainak egyedi gabonaaallergiás humán szérumokkal azonosított IgE-reaktív fehérjei a **24/a.,b.,c. ábrákon** láthatók.

Az 1. számú gabonaaallergiás szérum a búzával keresztreagáló gabonák víz/sóoldható frakciójában talált erősen sávozott IgE-reaktív csoportokat, de felismert reaktív csoportokat az elvileg nem keresztreagáló gabonákban és pszeudocereáliákban is (**24/a. ábra**). Az IgE-reaktív fehérjék főleg a 29-54 kDa közötti tartományban szétszórtnak találhatók.

A 2. számú gabonaaallergiás szérum szintén a 29-54 kDa-os tartományban talált intenzív IgE-reaktív fehérjéket a minták víz/sóoldható frakciójában (**24/b. ábra**).

A 3. számú gabonaaallergiás szérum, mely egyetlen vizsgált búzával keresztreagáló és nem-keresztreagáló minta prolamin fehérjéjére sem adott választ, a víz/sóoldható fehérjékre reagált, bár nagyon gyengén. A szérum a tritikálé, amaránt, búzaminták víz/sóoldható frakciójában gyenge reaktivitást, míg a kukorica víz/sóoldható frakciójában igen erős IgE-reaktív fehérjecsoportot talált (**24/c. ábra**). Ezt a szérumot gyenge búza pozitívnak diagnosztizált háttérinformációval kaptam, ami a sávok gyenge intenzitásában meg is mutatkozott.





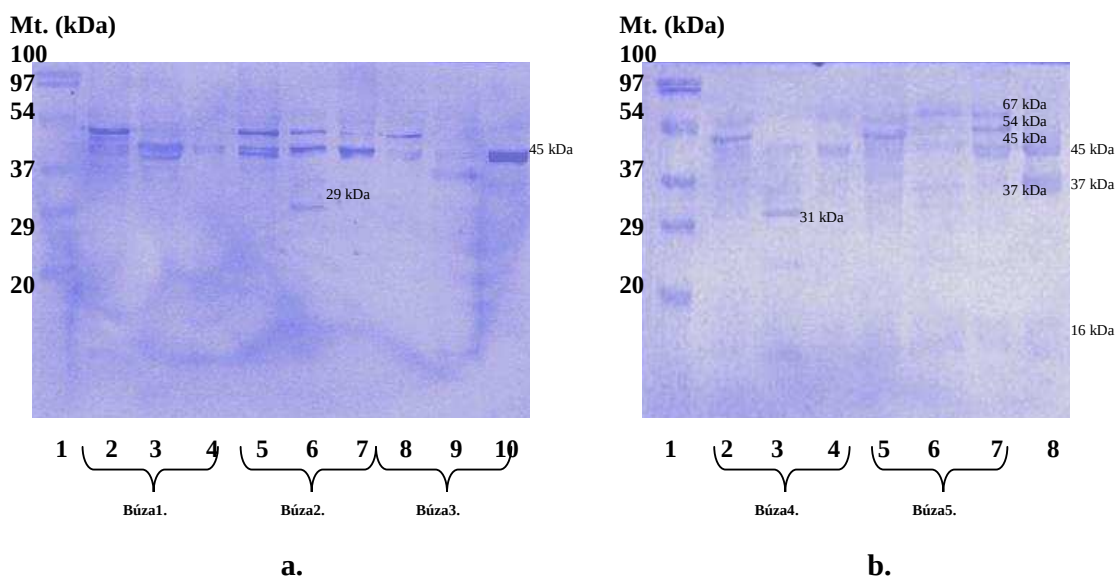
a./b./c.

1. Mt.
2. Rozs (*Secale cereale*), Amilo, 2004
3. Triticálé (*Triticosecale* sp.), tavaszi, EMBR 18, 2004
4. Árpa (*Hordeum vulgare*), tavaszi, STC I. 22-03, 2004
5. Csupasz zab (*Avena nuda*), tavaszi, GK Zalán, 2004
6. Amaránt (*Amaranthus cruentus*), GK Maros, 2005
7. Hajdina (*Fagopyrum exculentum*), 430 törzs, 2003
8. Kukorica (*Zea mays*), Ella SC, 2004
9. Rizs (*Oryza sativa*), Bioryza, 2003
10. Búza (*Triticum aestivum*), GK Cipó, 2004

c. IgE- 3. sz. gabonaallergiás szérum

24. ábra: Búza és búzával keresztreagáló/nem-keresztreagáló gabonák/pszeudocereáliák víz/sóoldható fehérjefrakcióinak SDS-poliakrilamid gélen történő szeparálását követő gabonaallergiás humán szérumokkal szemben mutatott IgE-reaktivitásának immunblottjai

A hazai búzafajták víz/sóoldható extraktjainak, és azok 1., 2. frakcióinak cöliákiás betegszérumokkal szembeni IgA-reaktivitását a **25. ábra** prezentálja. Új eredmény, hogy a cöliákiás szérumok a prolamin frakcióban lévő fehérjéken kívül a víz/sóoldható fehérjékkel is reagálnak. Minden cöliákiás betegszérum a búzák víz/sóoldható fehérjéi közül főként a 37-54 kDa közötti IgA reaktív fehérjéket ismerte fel hol erősebben, hol gyengébben.



25. ábra: Búzafajták víz/sóoldható fehérjefrakcióinak SDS-poliakrilamid gélen történő szeparálását követő cöliákiás humán szérummal szemben mutatott IgA-reaktivitásának immunblottja (1. sz. cöliákiás szérum)

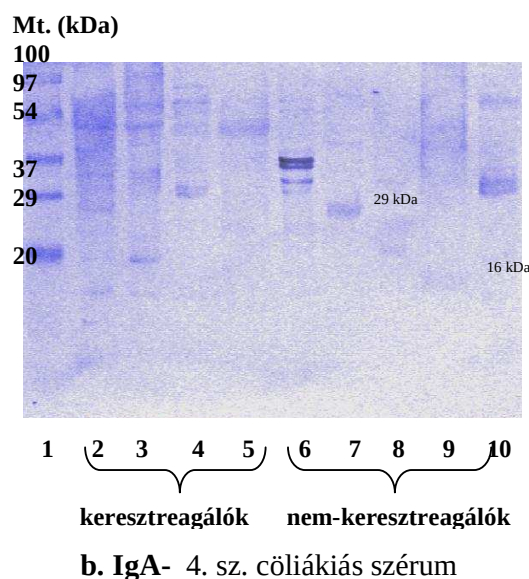
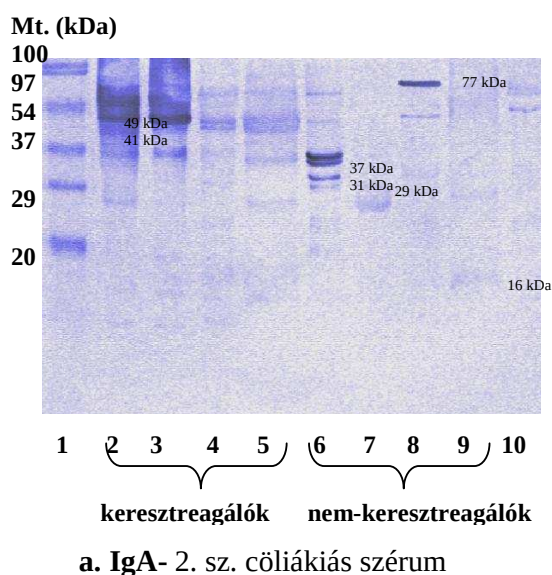
a.

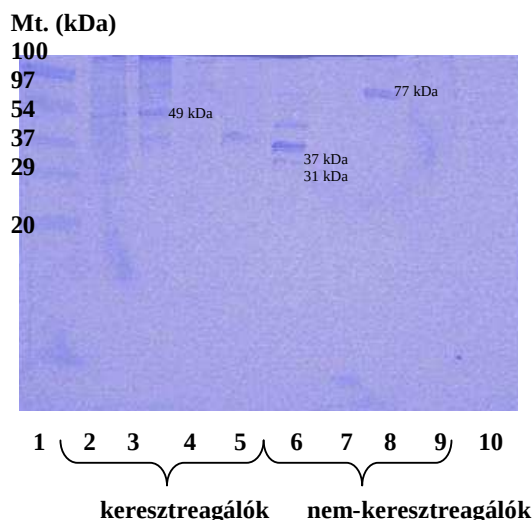
1. Mt.
2. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - extrakt
3. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - 1. frakció
4. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - 2. frakció
5. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 - extrakt
6. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 -1. frakció
7. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 - 2. frakció
8. *T. durum*, D-78, 2004 - extrakt
9. *T. durum*, D-78, 2004 -1. frakció
10. *T. durum*, D-78, 2004 -2. frakció

b.

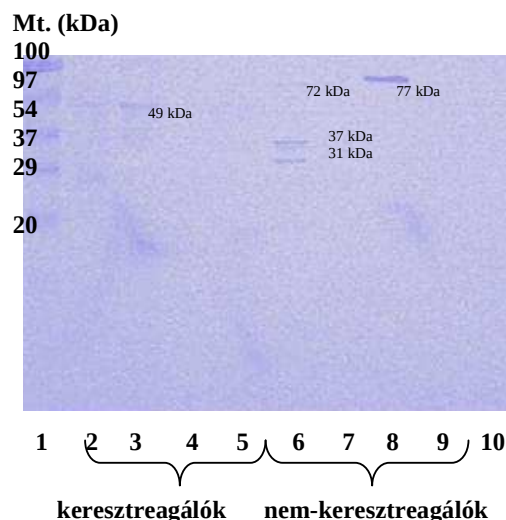
1. Mt.
2. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - extrakt
3. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 1. frakció
4. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 2. frakció
5. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- extrakt
6. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- 1. frakció
7. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- 2. frakció
8. TrimW-2. frakció

A búzával keresztreagáló és nem-keresztreagáló gabonák, pszeudocereáliák víz/sóoldható extraktjainak cöliákiás egyedi betegszérumokkal végzett IgA-reaktivitás vizsgálatának eredményei a **26/a.,b.,c.,d. ábrákon** láthatók. Cöliákiás betegszérumokkal történő vizsgálat során a búzával keresztreagáló és nem-keresztreagáló gabonáknál, pszeudocereáliáknál tapasztaltam IgA-reaktivitást. A szérumok többsége (pl. 2., 4. sz. cöliákiás szérum) a vizsgált minták mindegyikével erősen sávozott IgA reakciót mutatott (**26/a.,b. ábrák**). Kivételt képezett az 5. számú cöliákiás szérum, amelyik főleg rozsszal, tritikáléval, amaránttal és kukoricával reagált (**26/d. ábra**), illetve a 3. sz. cöliákiás szérum, amelyik rozsszal, tritikáléval, árpával és zabbal reagált (**26/c. ábra**). Nem várt eredménynek minősült, hogy a cöliákiás diétából nem kizárt amaránt és hajdina fehérjék a cöliákiás szérumokkal IgA-reaktivitást mutattak. Ez felhívja a figyelmet arra, hogy szükség van ezen fehérjék további vizsgálataira, mivel választ kell kapni arra, hogy ezek okozhatnak-e klinikai tüneteket egyes cöliákiás betegeknél a gliadinnal való keresztreaktivitásuk miatt.





c. IgA- 3. sz. cöliákiás szérum



d. IgA- 5. sz. cöliákiás szérum

26. ábra: Búza és búzával keresztreagáló/nem-keresztreagáló gabonák/pszeudocereáliák víz/sóoldható fehérjefrakcióinak SDS-poliakrilamid gélen történő szeparálását követő cöliákiás humán szérumokkal szemben mutatott IgA-reaktivitásának immunblottjai

a./b./c./d.

1. Mt.
2. Rozs (*Secale cereale*), Amilo, 2004
3. Tritikálé (*Triticosecale* sp.), tavaszi, EMBR 18, 2004
4. Árpa (*Hordeum vulgare*), tavaszi, STC I. 22-03, 2004
5. Csupasz zab (*Avena nuda*), tavaszi, GK Zalán, 2004
6. Amaránt (*Amaranthus cruentus*), GK Maros, 2005
7. Hajdina (*Fagopyrum esculentum*), 430 törzs, 2003
8. Kukorica (*Zea mays*), Ella SC, 2004
9. Rizs (*Oryza sativa*), Bioryza, 2003
10. Búza (*Triticum aestivum*), GK Cipó, 2004

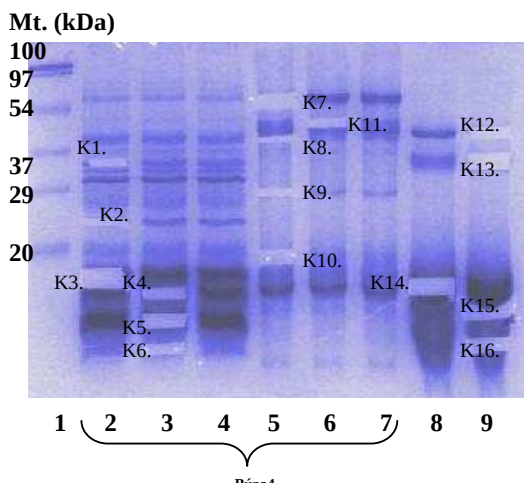
5.1.3. Víz- és sóoldható frakció IgE-reaktív fehérjéinek azonosítása

folyadékkromatográfiás-tandem tömespektrometriás (LC-MS/MS) módszerrel

A víz/sóoldható frakciókban a különböző gabonaallergiás szérumokkal leggyakrabban felismert IgE-specifikus immunreaktív fehérjék azonosítását LC-MS/MS módszerrel végeztem. A **27. ábrán** a beazonosításra küldött fehérje mintákat tüntettem fel.

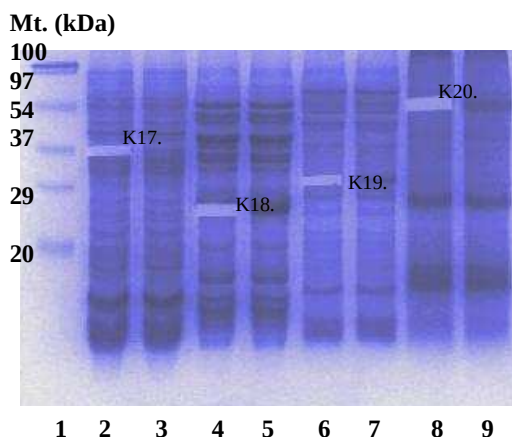
A búzák esetében a „*T. aestivum*, GK Cipó, 2004” minta immunreaktív fehérjéi kerültek vizsgálatra. Azért választottam ezt, mivel minden olyan molekulatömeg-tartományban tartalmazott gabonaallergiás anonim humán szérumokkal szemben IgE –reaktív fehérje csoportokat, melyek más búzafajtáknál is felismerésre kerültek. Az α -amiláz inhibitor készítmény (TrimW)-2. frakciójára

specifikus poliklonális ellenanyag specificitását szintén vizsgáltam az IgE-reaktív fehérjék függvényében. Továbbá a búzával keresztreagáló és nem-keresztreagáló gabonák/pszeudocereáliák extraktjaiból 1-1 nagyon gyakori és intenzív sáv került azonosításra. A vizsgálatokat a Szegedi Tudomány Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében végezték.



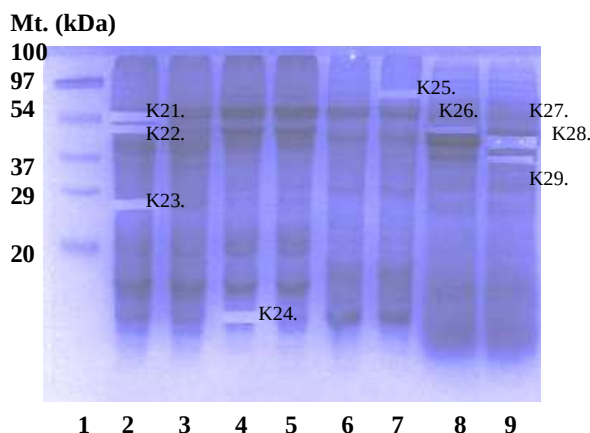
a. búza

- a.
1. Mt.
 - 2.-4. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 1. frakció
K1 34 kDa, K2 24 kDa, K3 16 kDa, K4 15 kDa, K5 13 kDa, K6 10 kDa
 - 5.-7. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 2. frakció
K7 67 kDa, K11 50 kDa, K8 45 kDa, K9 29 kDa, K10 19 kDa
 - 8.-9. TrimW-2. frakció
K12 45 kDa, K13 37 kDa, K14 16 kDa, K15 14 kDa, K16 12 kDa



b. búzával nem-keresztreagálók

- b.
1. Mt.
 - 2.-3. Amaránt (*Amaranthus cruentus*), GK Maros, 2005
K17 36 kDa
 - 4.-5. Hajdina (*Fagopyrum exculentum*), 430 törzs, 2003
K18 25 kDa
 - 6.-7. Kukorica (*Zea mays*), Ella SC, 2004
K19 29 kDa
 - 8.-9. Rizs (*Oryza sativa*), Bioryza, 2003
K20 52 kDa



c. búzával keresztreagálók

- c.
1. Mt.
 - 2.-3. Rozs (*Secale cereale*), Amilo, 2004
K21 64 kDa, K22 48 kDa, K23 26 kDa
 - 4.-5. Tritikálé (*Triticosecale* sp.), tavaszi, EMBR 18, 2004
K24 12 kDa
 - 6.-7. Árpa (*Hordeum vulgare*), tavaszi, STC I. 22-03, 2004
K25 79 kDa
 - 8.-9. Csúspasz zab (*Avena nuda*), tavaszi, GK Zalán, 2004
K26 49 kDa, K27 46 kDa, K28 43 kDa, K29 38 kDa

27. ábra: Víz/sóoldható frakciók azonosításra kiválasztott fehérjéi

Az NCBI-nr Plant adatbázis alapján azonosított fehérjék mérési adatait a 14. táblázat tartalmazza. Az MS-MS adatok SpectrumMill inhouse szerver lekeresőjével lettek kiértékelve az

NCBI_{nr}.kerat: keratin szennyezések kizárására létrehozott adatbázis (az NCBI_{nr} 2006.08.15-i adatbázisából létrehozva) valamint az NCBI_{nr} Plant adatbázis felhasználásával.

A lekeresés során 1,6 Da pontosság lett megengedve a prekursor ionra, és 0,6 Da a fragmensekre. A lekeresés a lehetséges keratinszennyezések kizárására az NCBI_{nr}.kerat adatbázisban kezdődött; a szennyezés az eredmények között nem szerepel. A célfaj fehérjeinek keresése az NCBI_{nr} plant adatbázisban történt. (Az adatbázisban nem szerepelnek amaránt, hajdina, rozs, tritikálé, árpa és zab speciális faj-fehérjék, ezért ezeknél a faj neve nincs kiemelve.) Az eredmények között azok a fehérjék szerepelnek, melyekben a peptidtalálatok pontszáma a legalább jó (>10) érték felett van, valamint az ezek összegéből kapott fehérjetalálat pontszáma legalább 20 (min. 2 peptid/fehérje). Mellékelve láthatók azok a jó minőségű peptidtalálatok is, melyek csak magukban nem elegendők az adott fehérje magyarázatára, de a spektrum minősége alapján a fehérje jelenléte nem zárható ki. A 14. táblázatban a keratin találatok nem szerepelnek, és ugyancsak hiányoznak azok a minták, melyeknek nem volt a kritériumoknak megfelelő találat. A homológ fehérjék felsorolása az (Acc. # List) oszlopban található.

Az 1D gélen lévő K 1-14-es jelöléssel ellátott búzafehérjesávokból, több peptid által beazonosított allergén fehérjék a következők: xilanáz inhibitor prekursor, xilanáz inhibitor, α -amiláz inhibitor (monomer, dimer, CM17 fehérje prekursor), szerpin, tritin, GSP1 fehérje, 5a2 fehérje, LTP1 prekursor, ns-LTP prekursor, béta-amiláz, manganáz-szuperoxid dizmutáz, peroxidáz és egy kukorica ubiquitin-nel hasonló búzafehérje. Az egy peptidtalálat alapján beazonosított fehérjék, pedig a következők voltak: peroxidáz, PR4, 15 kDa-os fehérje, WSCI proteináz inhibitor, avenin-féle prekursor, szerpin, és egy *Arabidopsis thaliana* EDA 18-hoz hasonló búzafehérje.

Irodalmi adatoknak megfelelően, a vizsgálatok is bizonyították az α -amiláz inhibitorok, és a szerpinek allergén tulajdonságát. Mindezek mellett a többi említett fehérjét pedig az irodalomban eddig nem ismertetett, új allergénként azonosítottam. Mások által azonosított fehérjékhez képest az eltérés talán a búzanövények különbözőségéből, a beteg populáció heterogenitásából, és a különböző fehérje-azonosítási módszerek alkalmazásából adódhatott.

Az α -amiláz inhibitor készítmény (TrimW)-2. frakciójában azonosításra került 37-45 kDa közötti fehérjék szerpinek, a 12-16 kDa közötti fehérjék pedig α -amiláz inhibitorok és HMW glutenin alegységek voltak, az irodalmi adatoknak megfelelő molekulatömeg tartományban (WEICHEL et al. 2006a,b). A TrimW-2. frakció ellen nyúlban előállított IgG ellenanyag készlete szintén reagált ezekkel a fehérjékkel. A búzával keresztreagáló és nem-keresztreagáló gabonák, pszeudocereáliák közül csak a rozsban (K22) és a zabban (K28) volt búza szerpinhez hasonló fehérje azonosítva.

14. táblázat: Folyadékkromatográfiás-tandem tömegspektrometriás (LC-MS/MS) analízis eredményei

run Name	group Num	num Spectra	num Peps Unique	score Unique	% Coverage	protein mw	protein pl	species	acc. number	accession number list	entry name
K 1	7	2	2	33.07	5	40221.4	8.41	<i>Triticum aestivum</i>	62996368	62996368 23954367 56201272 56201270 62996372 47824814 62996370	xylanase inhibitor precursor
	8	2	2	21.26	19	15162.5	5.59	<i>Triticum aestivum</i>	65993829	65993829 65993925 65993781 65993731 65993709 65993898 108597921 54778503 108597903 56480630 66841026	dimeric alpha-amylase inhibitor
	6	4	4	53.72	12	43118.5	5.60	<i>Triticum aestivum</i>	871551	871551 1885350	serpin
	4	5	5	72.80	16	33212.8	8.66	<i>Triticum aestivum</i>	20804336	20804336 66766322	xylanase inhibitor protein I
	5	5	5	56.08	34	16628.5	7.45	<i>Triticum aestivum</i>	2894148	2894148	monomeric alpha-amylase inhibitor
	3	7	6	82.95	24	29613.0	9.69	<i>Triticum aestivum</i>	391929	391929	tritin
K 3	2	8	6	84.17	43	16628.5	7.45	<i>Triticum aestivum</i>	2894148	2894148	monomeric alpha-amylase inhibitor
	1	9	7	118.09	79	13253.4	5.73	<i>Triticum aestivum</i>	54778507	54778507 54778511 65993941 65993807 65993852 65993756 65993829 65993781 108597921 66841026 65993925 54778503 65993872 65993731 108597903 56480630 54778505 65993709 65993898	0.19 dimeric alpha-amylase inhibitor
K 4	1	11	7	113.81	79	13253.4	5.73	<i>Triticum aestivum</i>	54778507	54778507 54778511 65993941 65993807 65993852 65993829 65993781 108597921 66841026 65993756 65993731 108597903 56480630 65993925 54778503 65993872 65993709 65993898 54778505	0.19 dimeric alpha-amylase inhibitor
	2	17	7	111.14	50	16628.5	7.45	<i>Triticum aestivum</i>	2894148	2894148	monomeric alpha-amylase inhibitor
K 5	6	2	2	24.38	32	8524	6.56	MAIZE	P69319	P69319	Ubiquitin - Zea mays (Maize)
	3	6	3	46.84	22	18170.9	6.27	<i>Triticum aestivum</i>	61656785	61656785 9957230 60652208 60652212 663263 60652210 607202 607200 60652220 60652214 60652226 607198 60652224 60652218	GSP-1 Grain Softness Protein
	4	3	3	46.18	31	10439.3	8.38	<i>Triticum aestivum</i>	66840998	66840998	5a2 protein
	2	14	4	67.07	31	12257.3	8.72	<i>Triticum aestivum</i>	25777824	25777824 56713115	lipid transfer protein 1 precursor
K 6	2	5	3	46.17	34	9833.1	8.70	<i>Triticum aestivum</i>	84617211	84617211 84617213 84617219	type 2 non specific lipid transfer protein precursor
K 7	3	2	2	30.42	4	55180.3	4.88	MAIZE	P55005	P55005	Beta-amylase (EC 3.2.1.2) (1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase) - Zea mays (Maize)
run Name	group Num	num Spectra	num Peps Unique	score Unique	% Coverage	protein mw	protein pl	species	acc. number	accession number list	entry name
K 8	4	3	3	43.07	5	43118.5	5.60	<i>Triticum aestivum</i>	871551	871551 1885350	serpin
	1	4	4	65.32	10	43311.6	5.45	<i>Triticum aestivum</i>	5734506	5734506 1885346	serpin
K 10	1	4	4	54.72	31	19320.0	6.78	<i>Triticum aestivum</i>	125663927	125663927 1654387 1621627 62131095 3676839 1174391	manganese superoxide dismutase
K 12	1	16	10	169.98	29	43118.5	5.60	<i>Triticum aestivum</i>	871551	871551 1885350 1885346 5734506 5734504	serpin
K 13	1	20	12	194.66	35	43118.5	5.60	<i>Triticum aestivum</i>	871551	871551 5734504 1885350 1885346 5734506	serpin
K 14	2	16	5	74.41	39	15989.6	5.07	<i>Triticum aestivum</i>	21711	21711	CM 17 protein precursor
	1	9	6	103.85	60	15046.4	4.99	<i>Triticum aestivum</i>	65993731	65993731 108597903 56480630 65993872 54778507 54778511 65993709 65993829 65993781 108597921 66841026 65993941 65993807 65993925 54778503 65993898 65993852 65993756 54778505	dimeric alpha-amylase inhibitor
K 15	6	2	2	20.00	2	77889.8	8.63	<i>Triticum aestivum</i>	68161134	68161134 14329763 110341796 29569237 6684164 14329759 22090 62548385 62548383 39599016 39599020 140169817 24474920 24474926	high molecular weight glutenin subunit 1By15
	4	7	4	57.78	29	15989.6	5.07	<i>Triticum aestivum</i>	21711	21711	CM 17 protein precursor
	1	5	5	84.59	48	15046.4	4.99	<i>Triticum aestivum</i>	65993731	65993731 108597903 56480630 65993872 65993941 65993807 54778507 54778511 65993709 65993829 65993781 108597921 66841026 65993756 65993852 65993925 65993898 54778503 54778505	dimeric alpha-amylase inhibitor
	3	5	5	70.67	34	16628.5	7.45	<i>Triticum aestivum</i>	2894148	2894148	monomeric alpha-amylase inhibitor

run Name	group Num	num Spectra	num Peps Unique	score Unique	% Coverage	protein mw	protein pl	species	acc. number	accession number list	entry name
K 20	7	2	2	27.29	5	51919.9	5.72	Arabidopsis thaliana	15237947	15237947 15228498 13605559 30686293	UGP (UDP-glucose pyrophosphorylase) UTP:glucose-1-phosphate uridylyltransferase
	9	2	2	24.29	5	59103.7	6.01	MAIZE	P19023	P19023	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14) - Zea mays (Maize)
	5	2	2	32.06	22	15100.7	6.53	Oryza sativa	2944439	2944439 4097100 4097098	globulin 2 precursor
	3	4	3	53.46	10	51731.6	10.82	Oryza sativa	4097102	4097102	globulin-like protein
	2	4	4	54.61	10	47972.8	5.41	ORYSA	90110845	90110845 1169528	Enolase (2-phosphoglycerate dehydratase) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (OSE1)
K 21	3	2	2	32.25	8	48163.0	5.71	MAIZE	P42895	P42895 P26301	Enolase 2 (EC 4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydratase 2) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase 2) - Zea mays (Maize)
	2	2	2	35.66	10	43118.5	5.60	Triticum aestivum	871551	871551 1885350 5734504	serpin
K 22	3	2	2	25.94	7	42148.0	5.49	Arabidopsis thaliana	21536853	21536853 15219412 28172915	PGK (PHOSPHOGLYCERATE KINASE)
	4	2	2	23.00	4	70605.4	5.22	MAIZE	P11143	P11143	Heat shock 70 kDa protein - Zea mays (Maize)
	1	18	7	109.10	23	43118.5	5.60	Triticum aestivum	871551	871551 1885350 5734504 5734506 1885346	serpin
K 23	3	2	2	28.76	13	21332.3	11.50	Triticum aestivum	57471708	57471708	ribosomal protein L18
	1	8	6	88.22	20	43118.5	5.60	Triticum aestivum	871551	871551 1885350 5734504 5734506 1885346	serpin
K 24	4	2	2	27.09	19	10439.3	8.38	Triticum aestivum	66840998	66840998	Sa2 protein
K 25	1	5	5	87.44	9	70605.4	5.22	MAIZE	P11143	P11143 Q24581 P24067	Heat shock 70 kDa protein - Zea mays (Maize)
K 26	6	2	2	23.47	7	47699.3	6.08	Arabidopsis thaliana	15240625	15240625	transaldolase, putative
	4	2	2	28.75	5	43033.2	5.44	Triticum aestivum	1885350	1885350 5734506 1885346	serpin
K 28	4	2	2	35.89	6	38604.4	7.52	MAIZE	P08440	P08440	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme (EC 4.1.2.13) - Zea mays (Maize)
	6	2	2	22.36	8	41204.6	5.75	MAIZE	P80607	P80607	Alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming] (EC 2.4.1.112) (UDP-glucose:protein transglucosylase) (UPTG) (Amylogenin) (Golgi-associated protein se-wap41) - Zea mays (Maize)
	3	2	2	35.91	7	36412.8	6.61	ORYSA	Q42977	Q42977 Q09054 P08735 Q43247	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic (EC 1.2.1.12) (PP38) - Oryza sativa (Rice)
	5	6	2	31.22	5	43033.2	5.44	Triticum aestivum	1885350	1885350 5734506 1885346 871551 5734504	serpin
	2	3	3	38.36	9	35590.1	5.77	MAIZE	Q08062	Q08062	Malate dehydrogenase, cytoplasmic (EC 1.1.1.37) - Zea mays (Maize)
	1	3	3	47.48	9	44507.3	7.75	ORYSA	584706	584706	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic (Transaminase A)

Egy peptiddel azonosított fehérjék

run Name	group Num	num Spectra	num Peps Unique	score Unique	% Coverage	protein mw	protein pl	species	acc. number	accession number list	entry name
K 1	9	1	1	16.12	3	38823.3	8.15	Triticum aestivum	22001285	22001285	peroxidase 1
K 3	3	2	1	13.61	10	13094.5	7.00	Triticum aestivum	6002595	6002595	pathogenesis-related protein 4
	5	2	1	20.40	13	13096.5	6.28	Triticum aestivum	6048567	6048567	PR-4
K 4	6	1	1	14.59	8	18449.4	8.02	Triticum aestivum	607202	607202 607200 61656785 9957230 60652220 60652214 60652226 607198 60652224 60652208 60652212 60652218 663263	15kDa grain softness protein
	7	1	1	19.15	26	8527.0	5.57	Triticum aestivum	19572726	19572726	WSCI proteinase inhibitor
K 6	4	1	1	14.13	8	18427.6	8.42	Triticum aestivum	89143120	89143120	putative avenin-like a precursor
K 7	5	1	1	14.90	8	18449.4	8.02	Triticum aestivum	607202	607202 607200 61656785 9957230 60652220 60652214 60652226 607198 60652224 60652208 60652212 60652218 663263	15kDa grain softness protein
	6	1	1	13.49	7	43033.2	5.44	Triticum aestivum	1885350	1885350	serpin
K 8	5	1	1	13.77	1	89121.5	7.55	Arabidopsis thaliana	3033388	3033388 79567709	EDA18 (embryo sac development arrest 18) protein-binding/ zinc ion binding
K 9	1	1	1	13.35	1	89121.5	7.55	Arabidopsis thaliana	3033388	3033388 79567709	EDA18 (embryo sac development arrest 18) protein-binding/ zinc ion binding
K 17	5	1	1	18.23	5	28617.4	10.72	Zea mays	1917019	1917019 9931636 15236042 7616101 482623405 2662469 15238142 2224751	ribosomal protein S6 RPS6-1
K 18	2	1	1	14.76	5	20966.9	8.15	Arabidopsis thaliana	15241061	15241061 15230011	60S ribosomal protein L18 (RPL18C)
K 19	12	1	1	17.32	6	22758.7	8.80	MAIZE	7387829	7387829	Late embryogenesis abundant protein, group 3 (LEA)
	13	1	1	14.20	5	24919.3	10.28	MAIZE	1172809	1172809	60S ribosomal protein L10 (QM protein homolog)
K 21	5	1	1	16.80	5	30902.2	8.60	Triticum aestivum	32400764	32400764	beta amylase
K 22	5	1	1	15.11	5	30902.2	8.60	Triticum aestivum	32400764	32400764	beta amylase
K 23	4	1	1	14.77	4	36542.0	6.40	MAIZE	Q09054	Q09054 P08735 Q43247 Q42977	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 2 (EC 1.2.1.12) - Zea mays (Maize)
K 24	5	1	1	16.44	5	18170.9	6.27	Triticum aestivum	61656785	61656785 9957230 60652208 60652210 60652212 663263	GSP-1 Grain Softness Protein
	6	1	1	13.43	9	12259.3	8.73	Triticum aestivum	56713115	56713115 25777824	type 1 non-specific lipid transfer protein precursor
K 25	4	2	1	16.38	1	68357.1	5.22	Arabidopsis thaliana	15223533	15223533	ERD2/HSP70T-1 (EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 2) ATP binding
K 26	7	1	1	17.25	3	42148.0	5.49	Arabidopsis thaliana	21536853	21536853 15219412 28172915	PGK (PHOSPHOGLYCERATE KINASE)
	8	1	1	16.98	2	72615.8	5.21	Arabidopsis thaliana	6692103	6692103 15225956 15222606 3335344	F22C12.22
K 29	1	1	1	17.90	3	43033.2	5.44	Triticum aestivum	1885350	1885350	serpin

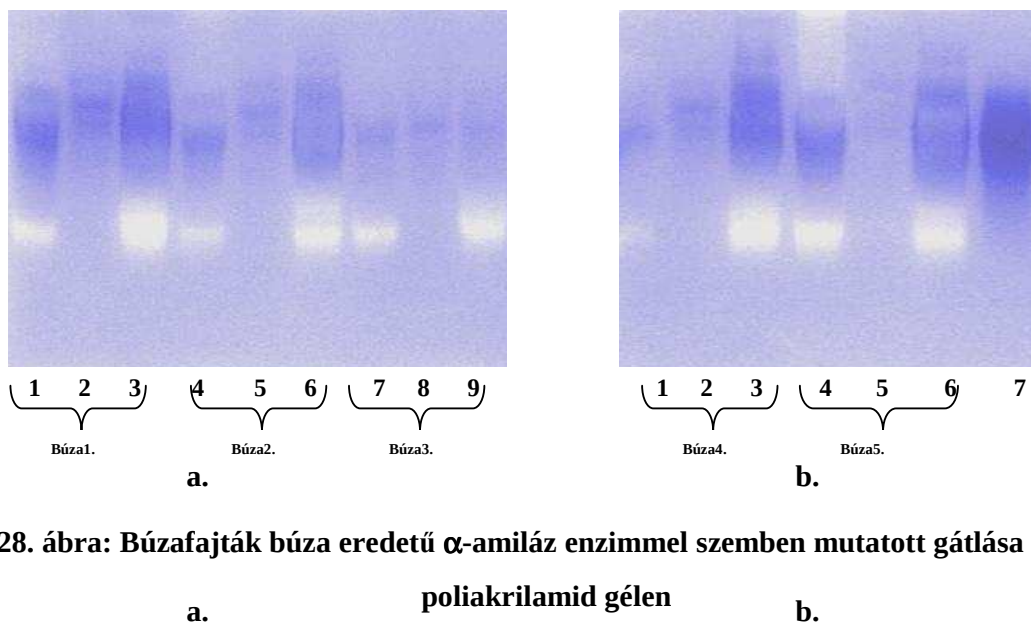
Group number: fehérjék találati csoportja; Num Spectra: az adott peptidre jellemző spektrumok száma; Num Peps Unique: az adott fehérjét meghatározó-különböző-peptidek száma; Score Unique: a fehérje pontszáma (kiértékelő programtól függ a pontozás - ha >15 jól fragmentált, ha 10-15 a fragmentáció jó); % Coverage: az egyedi peptidekkel elért lefedettség %-ban; Protein Mw: a fehérje molekulatömege; protein pI: a fehérje izoelektromos pontja; species: a faj neve; acc. Number: a fehérje azonosító száma; Accession number list: az egyedi peptidekkel azonosítható további homológ fehérjék azonosító számai (a fehérje általában ugyanaz, de a faj lehet más); entry name: a fehérje neve

5.1.4. α -amiláz és szerin proteináz enzim inhibitorok jelenlétének igazolása

Mivel a „*T. aestivum*, GK Tisza, 2004” búzaminta adatbázisban beazonosított fehérjéi között többségben az α -amiláz inhibitorok és a szerin proteináz inhibitorok (szerpinek) szerepeltek, fontosnak tartottam ezen fehérjék enzimaktivitás alapján történő vizsgálatát más hazai búzafajtákban, illetve a búzával keresztreagáló és nem-kesztreagáló gabonákban/pszeudocereáliákban egyaránt. A vizsgálatot natív poliakrilamid gélen végzett fehérje-elválasztás után, búza eredetű α -amilázzal, valamint szója eredetű α -kimotripsinnel szembeni gátlás alapján végeztem.

5.1.4.1. α -amiláz enzim inhibitorok jelenlétének igazolása

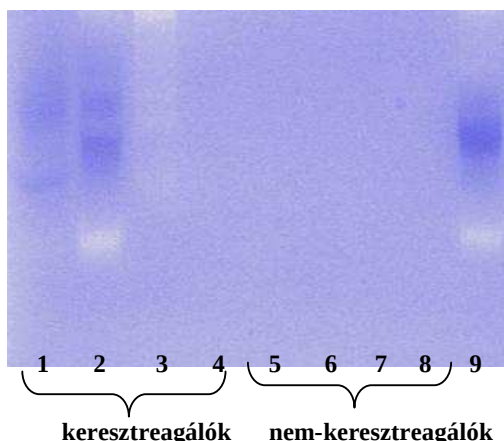
A natív gélen szeparált α -amiláz inhibitor készítmény (TrimW)-2. frakciójában, a hazai búzafajták víz/sóoldható fehérje-extraktumaiban, illetve ez utóbbiak α -amiláz inhibitorban dúsított 1. és 2. frakcióiban az α -amiláz enzim inhibitorok jelenlétének igazolását a **28. ábra** szemlélteti. A búza eredetű α -amiláz enzim gátlása minden búzafajtánál és a kontrollként használt α -amiláz inhibitor készítmény (TrimW)-2. frakciójában is kimutatható volt, mely az α -amiláz inhibitorok jelenlétét támasztotta alá.



1. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - extrakt
2. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - 1. frakció
3. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - 2. frakció
4. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 - extrakt
5. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 -1. frakció
6. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 - 2. frakció
7. *T. durum*, D-78, 2004 - extrakt
8. *T. durum*, D-78, 2004 -1. frakció
9. *T. durum*, D-78, 2004 -2. frakció

1. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - extrakt
2. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 1. frakció
3. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 2. frakció
4. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- extrakt
5. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- 1. frakció
6. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- 2. frakció
7. TrimW-2. frakció

A natív gélen elválasztott búzával keresztreagáló és nem-keresztreagáló gabonák/pszeudocereáliák víz/sóoldható fehérje-extraktumaiban az α -amiláz inhibitorok jelenlétének vizsgálatát a **29. ábra** mutatja be. A rozs és a tritikálé minták nagymértékben, míg az árpa nagyon kis mértékben, de mutatott a búza eredetű α -amiláz enzimmel szemben gátlást, mely ez utóbbiaknál az α -amiláz inhibitor jelenlétét igazolta.

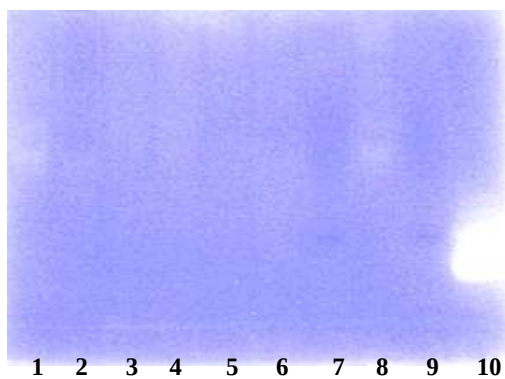


1. Rozs (*Secale cereale*), Amilo, 2004
2. Triticálé (*Triticosecale* sp.), tavaszi, EMBR 18, 2004
3. Árpa (*Hordeum vulgare*), tavaszi, STC I. 22-03, 2004
4. Csupasz zab (*Avena nuda*), tavaszi, GK Zálán, 2004
5. Amaránt (*Amaranthus cruentus*), GK Maros, 2005
6. Hajdina (*Fagopyrum esculentum*), 430 törzs, 2003
7. Kukorica (*Zea mays*), Ella SC, 2004
8. Rizs (*Oryza sativa*), Bioryza, 2003
9. Búza (*Triticum aestivum*), GK Cipó, 2004

29. ábra: Búzával keresztreagáló és nem-keresztreagáló gabonák/pszeudocereáliák búza eredetű α -amiláz enzimmel szemben mutatott gátlása natív poliakrilamid gélen

5.1.4.2. Szerin proteináz inhibitorok jelenlétének igazolása

A natív poliakrilamid gélen szeparált α -amiláz inhibitor készítmény (TrimW)-2. frakciójában, a hazai búzafajták víz/sóoldható fehérje-extraktumaikban, illetve a „*T. aestivum*, GK Cipó, 2004” minta α -amiláz inhibitorban dúsított 1. és 2. frakcióiban marha pankreáz eredetű α -kimotripszin gátlására alkalmas inhibitorok jelenlétét vizsgáltam, melyet a **30. ábra** szemléltet. Kontrollként a szója eredetű Bowman-Birk tripszin/ α -kimotripszin inhibitort (BBI) alkalmaztam. Jól látható, hogy a BBI mellett, minden búzafajtánál és az α -amiláz inhibitor készítmény (TrimW)-2. frakciójánál is kimutatható volt az α -kimotripszin gátlása, mely a szerin proteinázok jelenlétét igazolta.



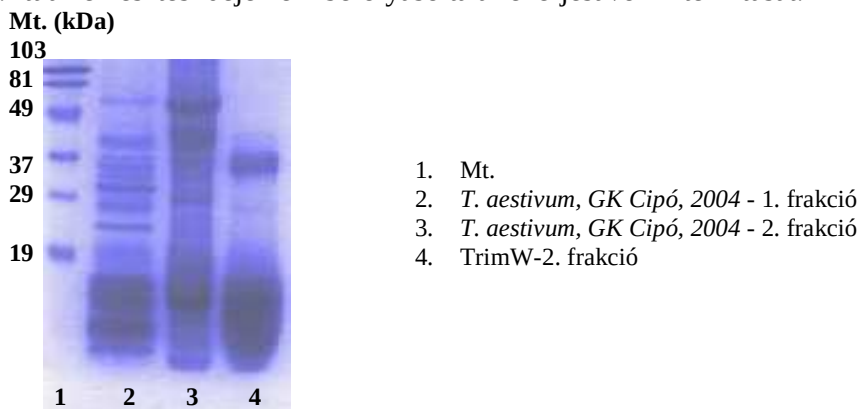
1. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - extrakt
2. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 - extrakt
3. *T. durum*, D-78, 2004 - extrakt
4. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - extrakt
5. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 1. frakció
6. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 2. frakció
7. TrimW-2. frakció
8. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- extrakt
9. TrimW-2. frakció
10. BBI

30. ábra: Búzafajták α -kimotripszinnel szemben mutatott gátlása natív poliakrilamid gélen

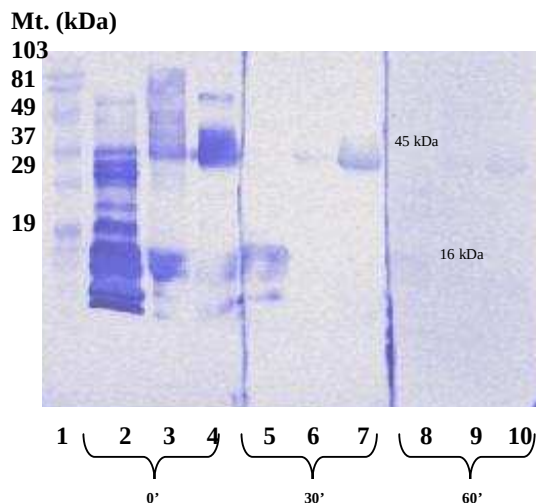
5.1.5. IgE-reaktív fehérjék pepszin rezisztencia vizsgálata immunblott technikával

Az allergén fehérjék egyik jellemzője, hogy ellenállnak a tápcsatorna enzimek (pl. pepszin) emésztésének. Ennek ismeretében a búzában, gabonaallergiára pozitív humán szérumokkal szemben IgE-reaktivitást mutató fehérjéknek pepszin rezisztenciáját vizsgáltam. A pepszines emésztés *in vitro* vizsgálatát az irodalomban eddig még nem közölt módon, SDS-PAGE-val történő szeparálást követően, PVDF membránra átblottolt fehérjéken végeztem. Ehhez a vizsgálathoz is a „*T. aestivum*, GK Cipó, 2004” α -amiláz inhibitorokban dús frakcióit és a kontrollként használt α -amiláz inhibitor készítmény (TrimW)-2. frakcióját használtam fel, hasonlóan az LC-MS/MS vizsgálatokhoz. A PVDF membránra kötött IgE-reaktív fehérjék 30 és 60 perces pepszines emésztését követően a rezisztens fehérjék azonosítását α -amiláz inhibitor készítmény (TrimW)-2. frakciójára specifikus nyúl IgG ellenanyaggal és gabonaallergiás humán anonim szérumokkal végeztem. A SDS-PAGE-val szeparált minták fehérje mintázatát a **31. ábra**, míg a membránra transzformált fehérjék emésztés utáni immunblott eredményét a **32/a.,b. ábrák** mutatják.

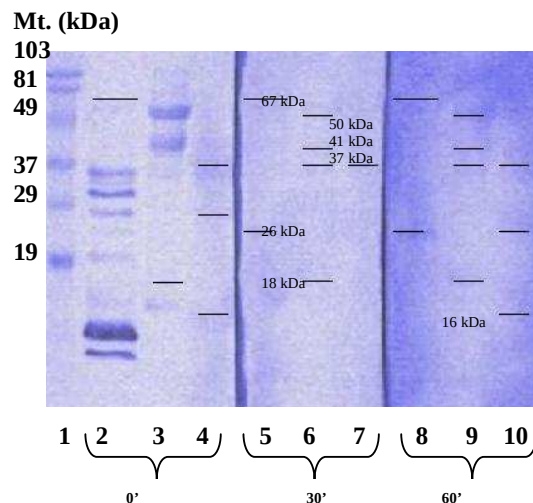
A TrimW-2. frakciójára specifikus poliklonális ellenanyag specificitás-vizsgálata (lásd 5.1.3. pontban) alapján kiderült, hogy mind a búza eredetű α -amiláz inhibitorokat -, mind pedig a szerpineket felismerő IgG típusú ellenanyagkészlettel rendelkezik. Ennek megfelelően az ellenanyag, a szerpineknek megfelelő 45 kDa-os molekulatömegnél, és a 16 kDa-os α -amiláz inhibitoroknál talált reaktív sávokat a búzafrakciókban és az α -amiláz inhibitor készítmény (TrimW)-2. frakciójában (**32/a. ábra**). Ezekben a sávokban a 30 perces emésztés után láthatóan erős intenzitású, míg a 60 perces pepszines kezelés után gyengébb intenzitású, de még jól látható sávokat tapasztaltam. A **32/b. ábrán** jól látható, hogy a gabonaallergiás humán szérum 16, 18, 26, 37, 41, 50, 67 kDa-nál ismert fel pepszines emésztéssel szemben rezisztens immunreaktív fehérjéket. Itt az emésztés ideje nem befolyásolta a fehérjesávok intenzitását.



31. ábra: α -amiláz inhibitorokban dús búzafehérje-frakciók SDS-PAGE-val történő elválasztása



a. α -amiláz inhibitor nyúl IgG



b. gabonaallergiás humán szérum (IgE)

32. ábra: PVDF membránra blottolt fehérjék pepszines emésztése után TrimW-2. frakció-specifikus nyúl IgG ellenanyaggal és gabonaallergiás humán (IgE) szérummal történő azonosítás eredményei

a./b.

1. Mt.
2. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 1. frakció, emésztetlen
3. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 2. frakció, emésztetlen
4. TrimW-2. frakció, emésztetlen
5. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 1. frakció, 30'-es emésztés
6. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 2. frakció, 30'-es emésztés
7. TrimW-2. frakció, 30'-es emésztés
8. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 1. frakció, 60'-es emésztés
9. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 2. frakció, 60'-es emésztés
10. TrimW-2. frakció, 60'-es emésztés

5.2. Gliadin-specifikus ELISA-k alkalmazhatósága gliadinnal szennyezett, illetve gluténmentes diétába illeszthető kenyérmodellekben

A Dunakenyér Sütőipari és Kereskedelmi Rt. engedélyezésével, a vállalat egy kimondottan gliadinmentes kenyér gyártására elkülönített üzemében, gliadinmentes kenyérmodelleket állítottam elő, szándékos glutén szennyezés előidézésével, a 4.2.2. pontban leírtak alapján. E kísérletsorozat célja a gyártás során felmerülő glutén szennyeződés kimutathatóságának vizsgálata volt a hőkezelés előtti nyersanyagoknál és a kész kenyértermékeknél, különböző specificitású és érzékenységgű ELISA-k felhasználásával. A búzaliszttel, illetve rozsliszttel bekerülő szennyezés az előzetesen

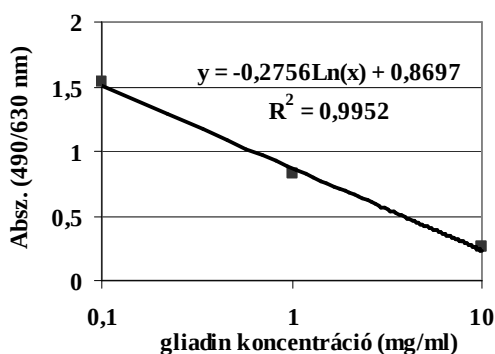
felmért kritikus pontoknál történt, azaz ott, ahol nagy valószínűséggel kerülhet be a glutén, szennyeződés folytán a rendszerbe. Négy ilyen pontot jelöltem ki a technológiai sorban, ahol külső (technológián kívüli) tényezők játszanak szerepet, és ahol a glutén-kontamináció valószínűsége fennáll.

A négy ilyen pont közül az első a nyersanyag forgalom, hiszen a nyersanyagok eredete ugyan nyomon követéssel igazolt, de a szállítás, a rakodás során szennyeződés léphet fel. A második pont a dagasztótál, a harmadik pont pedig a sütőformák tisztításánál volt. Ezek a szennyezések akkor léphetnek fel, ha a dagasztótál vagy a sütőforma egy újabb gyártósor indítása előtt nem az előírásnak megfelelően tisztított. A negyedik kritikus pontot a kenyerek szárítása jelentette, hiszen a nem megfelelő térben való szárítás is okozhat szennyeződést, amit a szárítási idő hossza csak fokozhat.

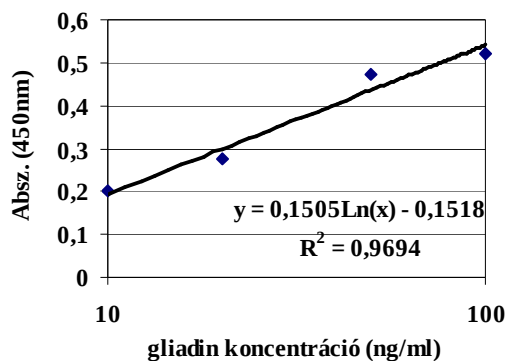
A mesterséges szennyezés modellezését, vagy csak a dagasztótálban, vagy csak a sütőformában, vagy mindkettőben egyszerre végeztem a szennyezés utáni mosások elhagyásával. Ilyen módon, a gyártás során szándékos szennyezéssel nyolc kenyérmodellt állítottam elő (lásd 4.1.2. pontban, 3.-10. minta). Ezenkívül, két gliadinmentes kenyeret a szárítás során szennyeztem búzalisztet/rozslisztet -, valamint belőlük készült kenyereket tároló helyiségekben (lásd 4.1.2. pontban, 1.-2. minta).

A szennyezés kimutatását egy általam kidolgozott poliklonális ellenanyag alapú kompetitív indirekt gliadin-ELISA-val (lásd 4.2.6.2. pontban) és egy kereskedelmi forgalomban kapható monoklonális ellenanyag alapú direkt szendvics ω -gliadin-ELISA-val (Gluten Assay kit, Tepnel; lásd 4.2.6.3. pontban) végeztem. A kiértékelés az adott módszernek megfelelő standard görbék segítségével (33. ábra) történt.

A szennyezett, hőkezelt kenyérminták szennyezettsége nem érte el a gliadin-ELISA érzékenységét (33/a. ábra), ezért a kontamináció ténye nem volt kimutatható.



a. Gliadin-ELISA alapú kalibrációs görbe



b. ω -gliadin-ELISA alapú kalibrációs görbe

33. ábra: Gliadin-specifikus ELISA-k kalibrációs görbéinek lineáris szakasza

A kereskedelmi forgalomban kapható búzalisztból készült házijellegű fehérkenyér kontroll, a félbarna rozskenyér kontroll és a szennyezést előidéző alapanyagok gliadin-specifikus poliklonális ellenanyaggal felismert gliadin mennyisége mérhető volt. A hőkezelt kenyérminták kimutatható gliadintartalma a búzaliszt - és rozsliszt alapanyagokban mért gliadintartalomhoz képest lecsökkent, de még mindig jelentősen meghaladta a gliadinmentes élelmiszereknél kockázat nélkül eltűrhető értéket (15. táblázat).

15. táblázat: Szennyezést előidéző alapanyagok és kontroll kenyérminták gliadintartalma, poliklonális ellenanyag alapú gliadin-ELISA-val mérve

Minta	Gluténtartalom ($\mu\text{g/g}$ minta)	Szórás ($\mu\text{g/g}$ minta)
Búzaliszt	17708	± 190
Rozsliszt	5201	± 173
Fehér búzakenyér (+kontroll)	7746	± 210
Félbarna rozskenyér (+ kontroll)	4723	± 181
Gliadinmentes kenyér (- kontroll)	0,2	$\pm 0,8$

A poliklonális ellenanyag alapú gliadin-ELISA-hoz képest a monoklonális ellenanyag alapú ω -gliadin-ELISA a gliadin komplex hőstabil ω -gliadin frakciójának felismerésére képes. Ezért a monoklonális ellenanyag és a hőstabil ω -gliadin antigén közötti szoros affinitás miatt nagyobb érzékenységgű módszernek minősült. Ugyanakkor a szándékosan szennyezett, hőkezelt gliadinmentes kenyérminták esetén, a monoklonális ellenanyag alapú ω -ELISA érzékenysége szintén elmaradt a kívánttól (33/b. ábra). A gliadinkoncentráció nem, de a szennyezés ténye félkvantitatív módon kimutatható volt ezzel a módszerrel, egy közepesen gluténnal szennyezett (150-400 $\mu\text{g/g}$) keményítő kontroll alapján. Ennek megfelelően, a szándékosan szennyezett, hőkezelt kenyérmodellek gluténtartalma 150 $\mu\text{g/g}$ -nél kisebb mennyiségben, de kimutatható volt. Ugyanakkor a kereskedelmi forgalomban kapható búzalisztból készült házijellegű fehérkenyér és a félbarna rozskenyér kontrollok, valamint a szennyezést előidéző alapanyagok gliadintartalma ezzel a módszerrel nem volt mérhető, a kit méréstartományát erősen meghaladó értékek miatt. A mintaelőkészítésnél alkalmazott kétszázezerszeres hígítás, pedig fals pozitív értéket eredményezett.

5.3. Gliadinok kimutatási lehetősége hőkezelt és funkcionális adalékokkal minőségileg javított élelmiszermatrixban

Kísérleteimet a világ népességének táplálkozásában fontos szerepet betöltő, minőségileg transzglutamináz (TG) enzimmel javított száraztészta modelleken (búza – és sárgaborsó alapú) végeztem. A tojás nélkül készített, koleszterinszegény, de jó minőségű száraztészták iránt fokozatosan növekszik az igény, és ebből következően intenzív kutatások kereszttüzében áll. A transzglutamináz enzim szerkezetmódosító hatása révén került érdeklődési körömbe. E célból TG enzimet használtam adalékanyagként, párhuzamosan biztosítva ezzel a koleszterinmentességet. A TG enzimmentes natúr tésztákhoz képest a TG enzim hozzáadásával készült tésztamodellek érzékszervi és főzési tulajdonságainak vizsgálatán túl a gliadin extrakció szempontjából vizsgáltam az oldható albumin/globulin-, gliadin- és glutenin frakción belüli fehérjék mennyiségi és eloszlásbeli változását, növekvő koncentrációban használt transzglutamináz enzim függvényében. Mivel az érzékszervi és főzési tulajdonság változása az enzim hatására bekövetkező fehérjeszerkezet változásokból adódott, így a megváltozott paramétereket együttesen elemeztem minden egyes tésztamodell esetében. Ezenkívül immunanalitikai vizsgálatokkal (ELISA, immunblott) követtem nyomon, hogy az enzim hatására megváltozott fehérjeszerkezet (pl. sikérszerkezet) befolyásolja-e a gliadin-kimutató érzékenységet.

5.3.1. Búza alapú, transzglutamináz enzimmel minőségileg javított száraztészta modellek jellemzése

Európában a tradicionális tésztatermékeket *T. aestivum* (gyengébb minőségű) és *T. durum* (jobb minőségű) őrleményekből állítják elő. Ezért *T. aestivum* és *T. durum* búzaliszt alapanyagokból víz hozzáadásával, de egyéb adalékanyag (tojás, enzim) hozzáadása nélkül ún. natúr tésztát készítettem. Az alaplisztek és víz, valamint különböző koncentrációban adagolt TG enzim (10-200 mg TG/kg liszt) adagolásával, különböző inkubációs idővel (30-150 perc) tésztamodelleket készítettem (lásd 4.2.3.1. pontban). Az inkubációs időt korlátoztam, mivel a napi termelésben nem megoldható egy hosszabb, több órás várakozási idő. A natúr tésztákat kontroll mintaként használtam, a vizsgálatokról megállapítható következtetések levonására.

A búzaliszt alapú tésztamodellekből FEILLET et al. (1977) által kidolgozott protokoll alapján kisebb módosításokat alkalmazva albumin/globulin, gliadin és glutenin fehérjéket frakcionáltam és használtam az említett vizsgálatokhoz. A **16. táblázatban** foglaltam össze minden elkészített tésztamodell érzékszervi és főzési tulajdonságait, valamint az oldható fehérjefrakcióik mennyiségét jellemző paramétereket, a TG enzim hatására bekövetkező változások nyomon követésére. Mivel az

enzim inkubációs ideje nem volt befolyással egyik paraméterre sem -ellentétben mások munkájával (LARRE et al. 2000, MUJOO and NG 2003)-, így a 60 perces enzimkezeléssel kapott eredmények mellett a 30 és 150 perces enzimkezeléssel kapott eredményeket nem tüntettem fel.

16. táblázat: Transzglutamináz enzimmel előállított *T. aestivum* és *T. durum* liszt alapú tészták jellemzői

Minta (enzim mg/kg)	Enzimes kezelési idő (min)	Érzékszervi jellemző					Főzési jellemző			Oldható fehérje		
		Külső	Illat	Íz	Állomány	Súlyozott átlag	Felvett víz (%)	Főzési veszteség (%)	Albumin+Globulin (%)**	Gladiin (%)**	Glutelin (%)**	
AESTIVUM												
0	0	3	5	5	3	15,20	295,70±3,44	14,00±2,11	14,55±1,55	49,14±2,11	12,41±1,12	
10	60	4	5	5	4	17,60	287,70±5,22*	13,80±1,22	12,44±1,78	30,90±1,22	8,96±0,78	
20	60	4	5	5	4	17,60	254,50±4,12*	10,54±0,89	11,00±0,56	33,21±1,18	8,50±0,52	
30	60	4	5	5	4	17,60	234,56±2,34*	10,20±1,00	10,55±0,56*	33,15±0,98	7,40±0,56*	
40	60	4	5	5	5	18,90	214,65±2,34*	9,50±0,56*	9,51±0,98*	32,96±0,98*	5,89±0,88*	
50	60	5	5	5	5	20,00	202,10±1,98*	6,70±0,67*	9,40±0,78*	30,52±0,88*	5,90±0,78*	
60	60	5	5	5	5	20,00	234,40±5,33*	7,60±1,02*	9,20±0,84*	29,58±0,78*	5,50±0,55*	
70	60	5	5	5	5	20,00	202,20±3,44*	8,20±1,11*	9,30±0,44*	28,52±1,12*	5,00±0,66*	
80	60	5	5	5	4	18,70	228,60±2,45*	7,50±0,54*	9,25±0,56*	26,13±1,23*	4,82±1,12*	
100	60	5	5	5	5	20,00	169,67±1,89*	8,10±3,11*	9,05±0,78*	24,24±1,02*	3,27±0,67*	
150	60	4	5	5	5	18,70	180,50±2,22*	10,20±1,02	9,16±0,82*	22,53±0,99*	2,12±0,67*	
200	60	5	5	5	4	19,35	176,55±5,22*	9,80±1,12	9,17±0,56*	20,12±0,78*	1,96±1,05*	
DURUM												
0	0	4	5	5	4	17,60	255,60±4,55	15,10±1,23	20,88±2,11	58,77±2,11	15,21±2,11	
10	60	5	5	5	5	20,00	241,93±5,66*	12,70±1,45*	18,52±1,45	51,02±0,98*	13,20±1,22	
20	60	5	5	5	5	20,00	217,70±3,44*	10,90±0,67*	17,04±1,33*	52,21±0,89*	10,95±1,12*	
30	60	5	5	5	5	20,00	248,45±4,22*	11,80±0,67*	16,43±1,12*	46,86±1,12*	11,55±0,98	
40	60	5	5	5	5	20,00	209,90±3,45*	10,40±1,33*	17,00±1,22*	41,90±0,89*	8,51±0,67*	
50	60	5	5	5	5	20,00	222,74±5,66*	9,25 ± 0,82*	17,20±1,32*	42,00±1,02*	8,70±0,89*	
60	60	5	5	5	5	20,00	224,18±6,57*	10,21 ± 0,51*	17,30±1,02*	40,90±1,05*	8,50±0,98*	
70	60	5	5	5	5	20,00	222,74±5,66*	9,25 ± 0,82*	17,15±1,03*	42,20±0,99*	8,60±1,12*	
80	60	5	5	5	5	20,00	224,18±6,57*	10,21 ± 0,51*	16,20±1,23*	42,10±1,23*	8,50±1,23*	
100	60	5	5	5	5	20,00	228,52 ± 5,60*	10,20 ± 0,32*	16,22±1,44*	42,13±1,42*	8,53±1,45*	
150	60	5	5	5	5	20,00	234,64 ± 6,20	10,27 ± 0,62*	15,12±1,33*	30,12±1,43*	8,52±1,43*	
200	60	5	5	5	5	20,00	231,26 ± 5,72	10,05 ± 0,45*	14,92±1,12*	40,12±1,98*	7,20±1,22*	

* P=5% -os szignifikancia szinten

** a minta fehérjetartalmának százalékában % (Nx5,7)

A táblázat adatai három párhuzamos mérés számtani átlagát és a szórást tartalmazzák

Az érzékszervi és főzési tulajdonságokat tekintve megállapítottam, hogy már az alapanyag minősége hatással volt a tésztaminőségre. A *T. aestivum* búzaliszt alapanyagból étkezési célra alkalmatlan, gyenge minőségű (ragacsos külső, rossz állomány) natúr tészta készült. A *T. durum* búzaliszt alapanyagból étkezési célra megfelelő, közepes minőségű natúr tészta készült.

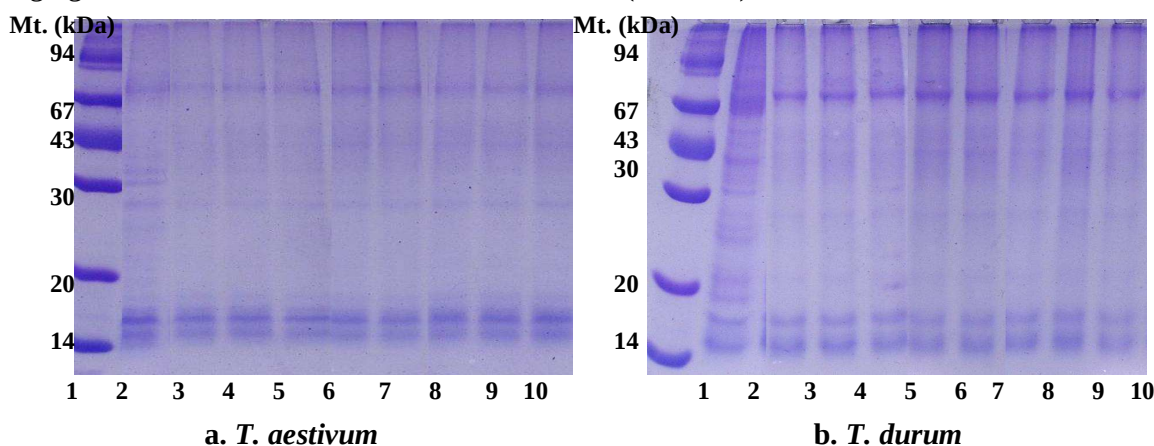
Ugyanakkor már 10 mg/kg TG enzimkezelés a tésztatermékek minőségében jelentős mértékű javulást eredményezett. Az enzimdózis növelésével (0-80 mg/kg) további minőségjavulást értem el az érzékszervi- és a főzési tulajdonságok tekintetében. A főzési tulajdonságokat figyelve minden enzimmel kezelt tésztamodellnél általánosságban megállapítottam, hogy az enzimkoncentráció növelésével a vízfelvétel és a főzési veszteség csökkent, hasonlóan az irodalomban leírtakhoz (PIETRASIK and LI-CHAN 2002). Ez a csökkenés viszont nem volt jelentős, hiszen a vízfelvétel így is elég magas maradt, a főzési veszteség, pedig kellően kicsi. 10-80 mg/kg TG enzimkezelés hatására a *T. aestivum* lisztekben *T. durum* minőségű tésztát lehetett előállítani, ami értékes eredménynek számít, hisz a *T. durum* tészták előállítása az őrlés és a kihozatal miatt hazánkban drágább. A *T. durum* lisztből, pedig rendkívül kiváló minőségű tésztát lehetett készíteni.

Az enzimdózis további növelését (100-200 mg/kg TG) azért tartottam indokoltnak, mivel azt feltételeztem, hogy a fehérje további aggregációjával a szerkezet további javulása várható. Az érzékszervi jellemzőket minősítő pontszámok azonban azt mutatták, hogy a magasabb enzimkoncentráció nem eredményezett lényeges javulást az alacsony enzimkoncentrációval (10-80 mg/kg TG) szemben. Mindkét búzaliszt alapú modell közel maximális, azaz 20 körüli pontszámú minősítést kapott. A főzési tulajdonságok az érzékszervi tulajdonságokhoz hasonlóan alakultak.

Mindezeket összevetve a tészták legjobb érzékszervi és főzési tulajdonságait együttesen biztosító optimális enzimdózisnak *T. aestivum*-ból készült tésztáknál 60 mg/kg liszt, míg *T. durum* alapú tésztáknál a 20 mg/kg liszt enzimkoncentrációt találtam.

A víz/só-, alkohol- és sav/lúgoldható fehérjefrakciók mennyiségében mindkét alapanyaggal készített modellsorozatnál szignifikáns csökkenés következett be az egyre növekvő enzimmennyiség hatására, hasonlóan BAUER et al. (2003) kutatásaihoz. Ez azzal magyarázható, hogy a fehérjefragmentek közötti keresztkötések csökkentették a fehérjék oldhatóságát, ezért nagyobb mennyiségű oldhatatlan frakció keletkezett. A változások jellege hasonló, mértéke azonban a *T. aestivum* illetve *T. durum* tésztáknál eltérő volt. Az irodalom szerint a fehérjék közül a sikérhálóbba tömörülni képes gluténfrakció (glutenin és gliadin) játszik főszerepet a termékszerkezet létrejöttében, de az albuminok és globulinok is résztvesznek az állomány kialakításában (LARRE et al. 2000, BASMAN et al. 2002a,b, BASMAN et al. 2006, GERRARD 2002, BAUER et al. 2003, RASIAH et al. 2005). Eredményeimből ugyanez következtethető. Az enzim hatására bekövetkező változásokat a gluténfrakció mennyiségében WIESER et al. (2005) is vizsgálták 10-80 mg/kg transzglutamináz enzimmel kezelt kenyérmodell mintákon. A komplett gluténtartalmat először 60%-os etanolban, majd redukáló körülmények között (dithioerithritol+urea; 60°C) extrahálták. Utána reverz fázisú HPLC-vel a glutén frakciót gliadin- és glutenin frakcióra választották szét. Megállapították, hogy az enzimkezelés után az oldható gliadinok mennyisége 15%-ra, a gluteninek mennyisége 3%-ra csökkent, mely jól közelíti eredményeimet.

Az egymáshoz kötődni képes fehérjefragmentek keresztkötés révén aggregátumokká fejlődnek, így molekulatömegük megváltozik. Ennek monitorozására SDS-PAGE-val megvizsgáltam a tésztamodellek víz/só-, alkohol- és sav/lúgoldható fehérjéinek molekulatömeg eloszlását (34., 35., 36. ábra). Általánosságban elmondható, hogy minden oldható frakció bizonyos tartományaiban már a 10 mg/kg TG enzimmel kezelt *T. aestivum* és *T. durum* alapú modellek esetében nagymértékű fehérjesáv-szegényedés lépett fel. Emellett néhány fehérje-tartományon belül a fehérjék még enzim kezelés után is változatlan intenzitással megmaradtak. A nagyobb enzimkoncentrációval kezelt tésztamodelleknél (20-200 mg/kg TG) további sávtisztulás nem volt megfigyelhető egyik oldható frakciónál sem. Az enzim inkubációs idejének változtatása sem volt befolyással a fehérjesávok csökkenésére. Az irodalmi adatok szerint az enzim a nagy molekulatömegű (HMW) glutenin-alegységekre hat a legjobban (BAUER et al. 2003, MUJOO and NG 2003), de az alacsony molekulatömegű (LMW) glutenin-alegységek, α -gliadinok vagy akár a víz/sóoldható albuminok/globulinok is megfelelő szubsztrátjai lehetnek (GERRARD et al. 2000, LARRE et al. 2000, ROSELL et al. 2003, WATANABE et al. 1994, CABALLERO et al. 2005, BASMAN et al. 2002b, BONET et al. 2006, KÖKSEL et al. 2001). Eredményeim szerint a víz/sóoldható frakcióban a 17-43 kDa közötti fehérjesávok mennyisége csökkent a natúr tésztához képest, de a 10 mg/kg TG enzimmel kezelt tésztához képest a nagyobb enzimkoncentrációval készített tésztamodelleknél további jelentős sávinintenzitás csökkenés nem jelentkezett, még a 200 mg/kg TG enzimmel kezelt tésztamodelleknél sem (34. ábra).

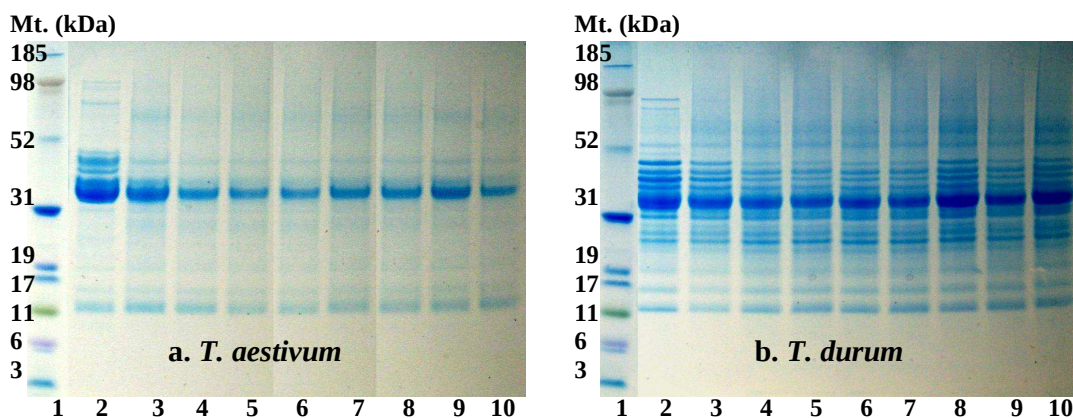


34. ábra: Transzglutamináz enzimmel kezelt búza alapú tésztamodellek víz/sóoldható frakcióinak 15%-os SDS-poliakrilamid gélen történő elválasztása

a./b.

1. Mt.
2. TG-al kezeletlen (0 mg/kg TG) *T. aestivum* / *T. durum* tészta (natúr)
3. 100 mg/kg TG-al, 30'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
4. 100 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
5. 100 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
6. 150 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
7. 150 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
8. 200 mg/kg TG-al, 30'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
9. 200 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
10. 200 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta

Az alkohololdható frakciókban a 10 mg/kg TG enzimmel kezelt tésztáknál a 40-98 kDa közötti fehérjék mennyiségében látható csökkenés a natúr tésztákhoz képest, de a 20-200 mg/kg TG enzimmel kezelt *T. aestivum* és *T. durum* alapú tésztamodelleknél további fehérjesáv-intenzitás változást nem tapasztaltam a 10 mg/kg TG enzimmel kezelt tésztákhoz képest (35. ábra). WIESER et al. (2005) ugyanilyen megállapításra jutottak a 10-80 mg/kg transzglutamináz enzimmel kezelt kenyérmodell mintáik esetében is, hisz ők sem tapasztaltak az SDS-PAGE képen az enzimmel kezelt mintáknál szignifikáns fehérjesáv-változást.

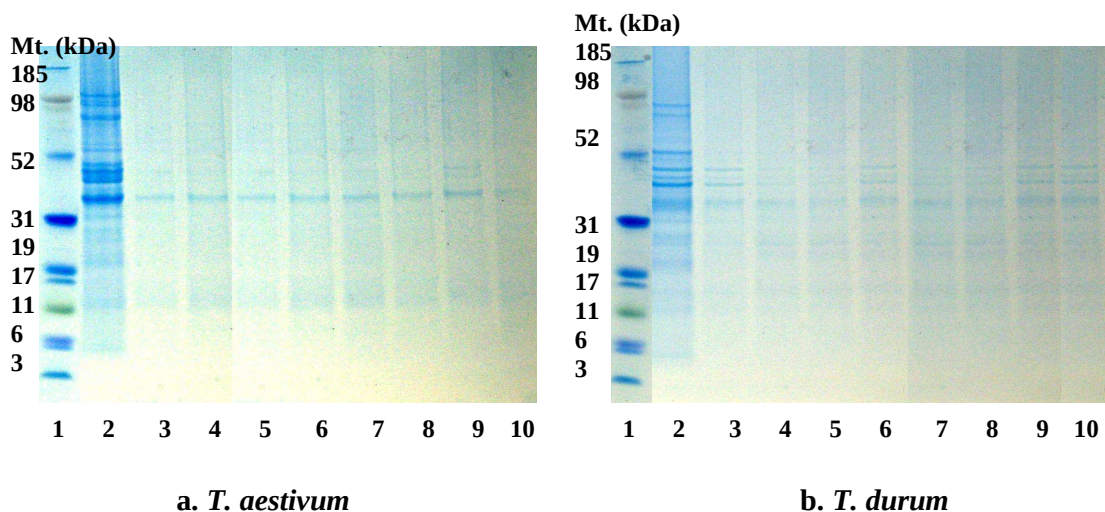


35. ábra: Transzglutamináz enzimmel kezelt búza alapú tésztamodellek alkohololdható frakcióinak gradiens gélen történő elválasztása

a./b.

1. Mt.
2. TG-al kezeletlen (0 mg/kg TG) *T. aestivum* / *T. durum* tészta (natúr)
3. 100 mg/kg TG-al, 30'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
4. 100 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
5. 100 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
6. 150 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
7. 150 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
8. 200 mg/kg TG-al, 30'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
9. 200 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
10. 200 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta

A 36. ábrán jól látható, hogy a sav/lúgoldható fehérjefrakcióban volt a legjelentősebb a változás a natúr tésztákhoz képest, szignifikáns sávintenzitás-csökkenés volt megfigyelhető a HMW glutenin-alegységeknél (40-98 kDa között). GERRARD et al. (2000) is szintén azt a következtetést vonták le, hogy az enzimnek a 60-120 kDa-os tartományban a glutenin-alegységekre volt a legerőteljesebb hatása.



36. ábra: Transzglutamináz enzimmel kezelt búza alapú tézstamodellek sav/lúgoldható frakcióinak gradiens gélen történő elválasztása

a./b.

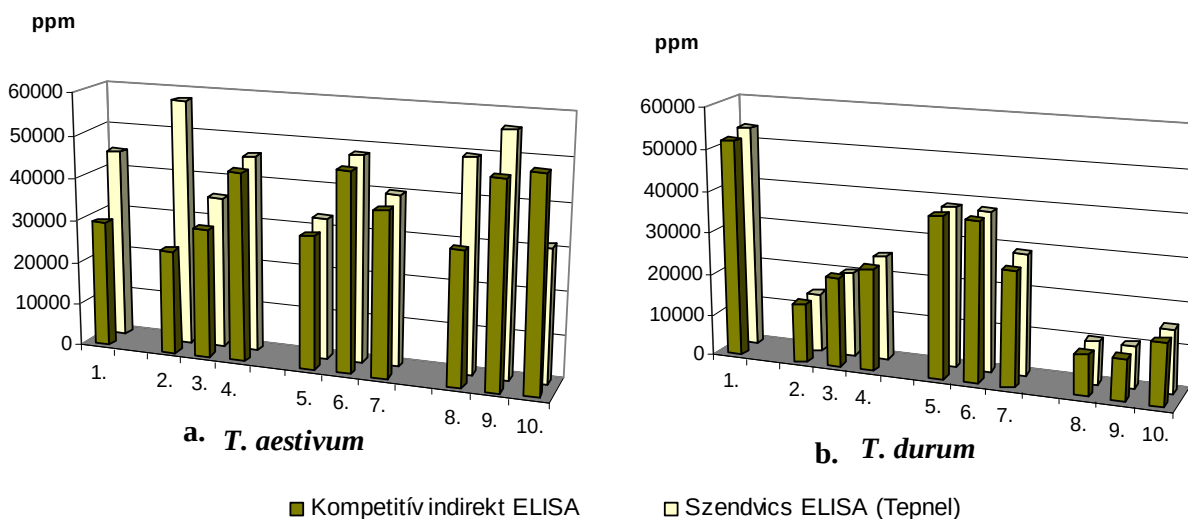
1. Mt.
2. TG-al kezeletlen (0 mg/kg TG) *T. aestivum* / *T. durum* tézsta (natúr)
3. 100 mg/kg TG-al, 30'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta
4. 100 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta
5. 100 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta
6. 150 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta
7. 150 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta
8. 200 mg/kg TG-al, 30'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta
9. 200 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta
10. 200 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta

A 3 frakcióban tapasztalt változásokról levont következtetésem egyeznek GERRARD et al. (2001) következtetéseivel.

Az enzim hatására a glutén szerkezetében bekövetkezett változásokat különböző specificitású ellenanyagokra alapozott immunanalitikai vizsgálatokkal (ω -gliadin-specifikus direkt szendvics ELISA, gliadin-specifikus kompetitív indirekt ELISA, R5 ellenanyag alapú immunkromatográfiás gyorsteszt, gliadin-specifikus ellenanyag alapú immunblott) is nyomon követtem. Mivel a glutén karakterisztikus változásokat idéz elő a cöliákiás betegek bél mukózájában, ezért ezeket a fehérjéket (gliadinok, gluteninek) alaposabban tanulmányoztam. A glutén szerkezetének enzimés módosításával a tézsta allergén jellegét terveztem csökkenteni, illetve megszüntetni. Az enzimés kezelés során a keresztkötések kialakításával az immunreaktív gliadin, valamint a gliadinokkal keresztreagáló glutenin-epitópok csökkenését, megszűnését vártam.

Az ELISA alapú vizsgálatokban a mintaelőkészítés során az alkohololdható gliadinokat extraháltam. Az alkohololdható frakcióból történt a gliadintartalom meghatározása, poliklonális ellenanyag alapú kompetitív indirekt gliadin-ELISA és a ω -gliadin-specifikus direkt szendvics

ELISA (Tepnel) vizsgálatokkal. Bár korábbi vizsgálataimmal igazoltam az alkohololdható frakció csökkenését mindkét alapanyagú tézstamodell rendszer esetében, az extraktumban a várttól eltérően, nem kaptam csökkenést az anti-gliadin nyúl IgG ellenanyaggal felismerhető immunreaktív gliadinok mennyiségében a *T. aestivum* alapú 10-200 mg/kg liszt transzglutamináz enzimmel kezelt tézstamodelleknél, a natúr tézstákhoz képest. Sem a magasabb enzimkoncentráció, sem a hosszabb inkubációs idő nem volt befolyással az anti-gliadin nyúl IgG ellenanyaggal felismerhető immunreaktivitásra. *T. durum* alapú tézstamodelleknél ugyan látható volt a csökkenés, de nem a fokozódó enzim dózis-növeléssel következetesen. Valószínűleg az ellenanyaggal érzékelhető epitópok nem maszkírózódtak el a kialakult keresztkötésekkel. Eredményeim szemléltetésére a 37. ábrát mutatom be.



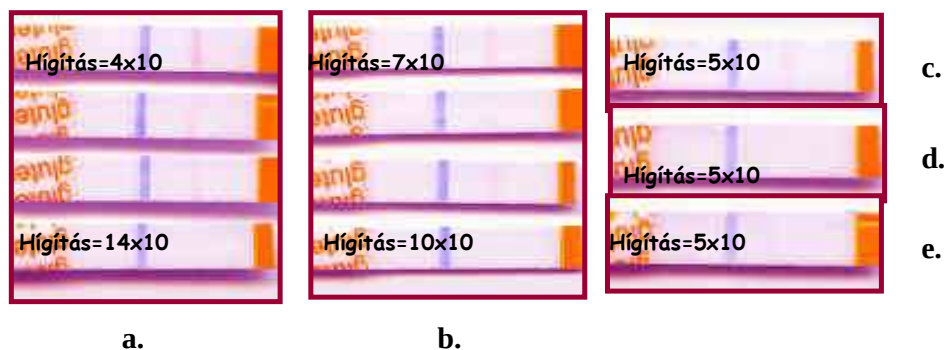
37. ábra: Glutén detektálására szolgáló kompetitív indirekt – és direkt szendvics ELISA-k érzékenységének összehasonlítása transzglutamináz enzimmel kezelt búza alapú tézstamodelleken
a./b.

1. TG-al kezeletlen (0 mg /kg TG) *T. aestivum* / *T. durum* tézsta (natúr)
2. 100 mg/kg TG-al, 30'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta
3. 100 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta
4. 100 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta
5. 150 mg/kg TG-al, 30'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta
6. 150 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta
7. 150 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta
8. 200 mg/kg TG-al, 30'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta
9. 200 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta
10. 200 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tézsta

A mérési módszerek érzékenységét tekintve az eredményekből az látható, hogy a vártak megfelelően a Tepnel kit érzékenyebb volt, mint a poliklonális ellenanyag alapú ELISA módszer.

Az immunkromatográfiás elvű monoklonális R5-ellenanyag alapú módszerrel (Operon Stick Gluten Kit) nem sikerült a gliadintartalmat meghatározni, mivel a minták gliadintartalma kívül esett a kit méréstartományán (2-2000 ppm). A félkvantitatív módszer csak gliadinmentesség

ellenőrzésére lett kifejlesztve, ezért a gliadintartalom meghatározására alkalmazott hígítás miatt kiértékelésre alkalmatlan eredményeket adott. A pozitív eredmény jelenti a mérhető gliadintartalmat, a negatív eredmény, pedig a gliadinmentességet (38. ábra).

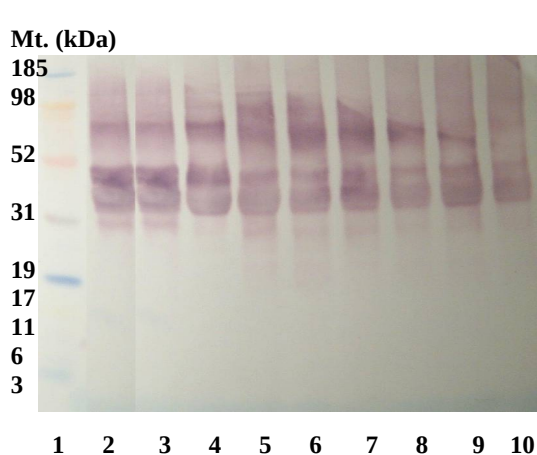


38. ábra: R5-ellenanyag alapú glutén detektálási immungorsteszt (Operon) érzékenységének vizsgálata tesztamodelleken és gluténnel szennyezett kontroll mintákon

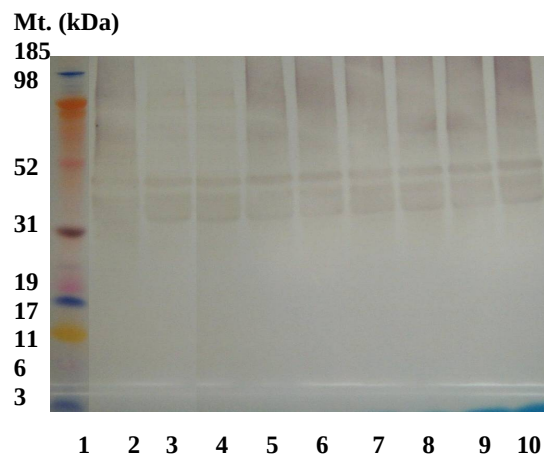
- a, TG-al kezeletlen (0 mg/kg TG-al) *T. durum* tészta (natúr)
- b, 200 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. durum* tészta
- c, erősen gluténszennyezett keményítő kontroll Tepnel kitből (>200 ppm)
- d, közepesen gluténszennyezett keményítő kontroll Tepnel kitből
- e, kis mértékben gluténszennyezett keményítő kontroll Tepnel kitből (<200 ppm)

WIESER et al. (2005) a 10-80 mg/kg transzglutamináz enzimmel kezelt kenyérmodell minták esetében monoklonális R5-ellenanyag alapú szendvics ELISA-val monitorozták a kezelés utáni R5-ellenanyaggal felismert gliadinok mennyiségében bekövetkezett változásokat. A mérhető gliadinok mennyiségében csökkenő változást nem tapasztaltak. R5-ellenanyaggal végzett immunblottal is megerősítették az ELISA-val kapott állításaikat, azaz az immunreaktív sávokban szignifikáns csökkenét nem tapasztaltak. Kivételt képezett a 80 mg/kg transzglutamináz enzimmel kezelt kenyérmodell, ahol bár az immunreaktív sávok nem tűntek el, de intenzitásuk kis mértékben csökkent.

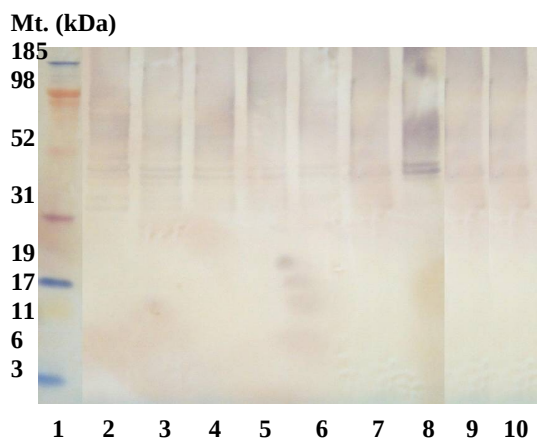
A klinikai tüneteket kiváltó gliadinok és gluteninek immunaktivitásában bekövetkező változásokat cöliákias betegek szérumával való reakcióképesség alapján is vizsgáltam. A 39. ábrán látható, hogy a cöliákias anonim humán szérumok még immunreaktív formában felismerték a frakciókban maradt oldható gliadinok (39/a.,b. ábra) és gluteninek (39/c.,d. ábra) aktivitását.



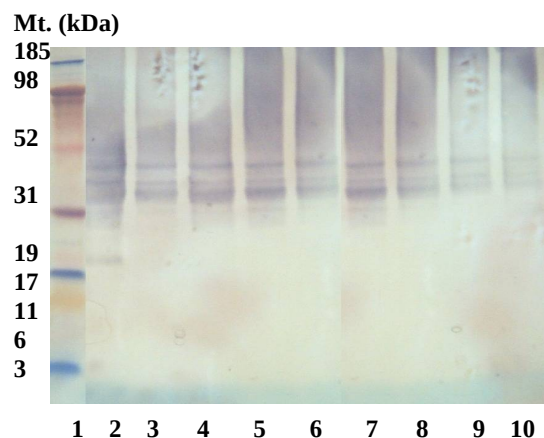
a. *T. aestivum* -alkohololdható frakció



b. *T. durum* -alkohololdható frakció



c. *T. aestivum* –sav/lúgoldható frakció



d. *T. durum* –sav/lúgoldható frakció

39. ábra: Transzglutamináz enzimmel kezelt búza alapú tézstamodellek alkohol- és sav/lúgoldható frakcióinak gradiens gélen történő elválasztást követő cöliákiás humán szérummal vizsgált IgA-specifikus immunblottjai

a./b./c./d.

1. Mt.
2. TG-al kezeletlen (0 mg/kg TG) *T. aestivum* / *T. durum* tészta (natúr)
3. 100 mg/kg TG-al, 30'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
4. 100 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
5. 100 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
6. 150 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
7. 150 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
8. 200 mg/kg TG-al, 30'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
9. 200 mg/kg TG-al, 60'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta
10. 200 mg/kg TG-al, 150'-ig kezelt *T. aestivum* / *T. durum* tészta

Összegezve a búza alapú TG enzimmel kezelt tésztákkal kapcsolatos vizsgálatokat megállapítható, hogy az enzimes kezelés a száraztészta modellek minőségét nagymértékben javította, de a glutén immunreaktivitást nem szüntette meg, illetve alig csökkentette. Így nem építhetők be ezen termékek diétás élelmiszerként a cöliákiás betegek étrendjébe.

5.3.2. Gluténmentes diétába illeszthető sárgaborsóliszt alapú száraztészta modellek jellemzése

Az egészséges táplálkozás egyre fontosabbá válik és ennek függvényében egyre nagyobb figyelem irányul a diétás, nem hagyományos bázisú termékek felé (RASMAY et al. 2000, RENZETTI et al. 2007, WANG et al. 1999). Ennek oka kettős, egyrészt ezek a termékek jól illeszthetők a lisztérzékeny betegek gluténmentes diétájába (CICLITIRA et al. 2005), másrészt széles körben terjednek a funkcionális élelmiszerek Európában is. Előtérbe kerülnek azok az anyagok, amelyek nem tartalmaznak gliadin típusú fehérjét. Ilyen anyagok a hüvelyesek is, köztük a borsó. Gazdag esszenciális aminosavakban, a fehérjetartalma 23-25%. Ezek a magok nem tartalmaznak prolamin típusú fehérjét, így az örleményből készült termékek szerkezetének kialakítása szempontjából nélkülözhetetlen az adalékok alkalmazása (ARENDT et al. 2002). LARRE et al. (1992, 1993, 2000) kísérleteztek korábban borsóval, melynek leguminjában vizsgálták a transzglutamináz enzim szerkezetjavító hatását.

A fentiek ismeretében, sárgaborsóból víz és különböző koncentrációban (50-200 mg TG/kg liszt) adagolt transzglutamináz enzimmel tésztamodelleket készítettem (lásd 4.2.3.1. pontban). Mivel a búza alapú tészták (lásd 5.3.1. pontban) esetében az enzimkezelés időtartama nem volt befolyással egyik vizsgált paraméterre sem, a sárgaborsóliszt alapú tésztamodellek esetében a szerkezet kialakításához szükséges minimális 60 perces inkubációs időt választottam. A vízzel készített sárgaborsó alapú tésztákat (natúr tésztákat) kontroll mintaként használtam.

Mivel a sárgaborsóban az albumin/globulin frakció (21%/66%) van túlsúlyban, szemben a glutelin frakcióval (5-8%), a sárgaborsó alapú tésztamodellek esetében FEILLET et al. (1977) módosított módszerével albumin/globulin- és glutelin fehérjét frakcionáltam és használtam az említett vizsgálatokhoz. A **17. táblázatban** foglaltam össze minden elkészített tésztamodell érzékszervi és főzési tulajdonságait, valamint az oldható fehérjefrakció mennyiségét, a TG enzim hatására bekövetkező változások nyomon követésére. A borsóban az albumin/globulin frakció összesen 71%, a glutelin frakció pedig 3% alatt volt, így a táblázatban csak a domináns albumin/globulin frakciót tüntettem fel.

17. táblázat: Transzglutamináz enzimmel előállított sárgaborsóliszt alapú tésták jellemzői

Minta (enzim mg/kg)	Enzimes kezelési idő (min)	Érzékszervi jellemző					Főzési jellemző		
		Külső	Illat	Íz	Állomány	Súlyozott átlag	Felvett víz (%)	Főzési veszteség (%)	Albumin+Globulin (%)**
0	0	-	-	-	-	-	-	-	71,20±3,44
50	60	4	5	5	4	17,60	185,56±2,24	15,77±2,11*	15,62±1,23*
70	60	4	5	5	4	17,60	172,33±3,12	16,98±2,03*	14,49±2,78*
100	60	4	5	5	4	17,60	192,11±1,23*	15,90±1,11*	13,64±3,12*
120	60	5	5	5	5	20,00	199,87±2,11*	15,50±1,03*	12,78±2,89*
140	60	5	5	5	5	20,00	195,66±1,34*	14,20±1,11*	11,92±2,44*
150	60	5	5	5	5	20,00	177,65±2,44	16,10±0,56*	11,76±1,45*
180	60	5	5	5	5	20,00	184,64±5,21	16,40±1,22*	11,84±3,12*
200	60	5	5	5	5	20,00	286,65±3,44*	22,00±2,11	11,60±2,14*

* P=5% -os szignifikancia szinten

** a minta fehérjetartalmának százalékában % (Nx5,7)

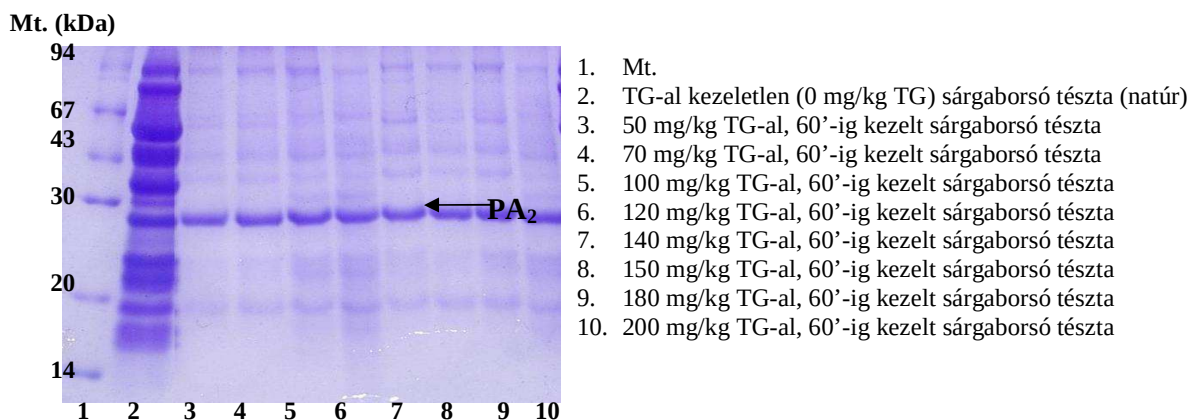
A táblázat adatai három párhuzamos mérés számtani átlagát és a szórást tartalmazzák

A TG enzim segítségével sárgaborsó lisztből téstát lehetett előállítani. A táblázatban jól látható, hogy egy kiváló minőségű (maximális érzékszervi pontszámmal értékelhető) sárgaborsó alapú téstá előállításához minimum 120 mg/kg transzglutamináz enzim adalékanyag hozzáadására volt szükség. A további enzimkoncentráció-növeléssel a termék érzékszervi minősítése nem változott, a tésták továbbra is maximális érzékszervi pontokkal voltak jellemezhetőek. A főzési tulajdonságokat figyelve megállapítható, hogy minden enzimmel kezelt téstamodellnél a vízfelvétel és a főzési-veszteség hasonló %-os értéken mozgott, szignifikáns változás nem következett be. Kivételt képezett a 200 mg/kg transzglutamináz enzimmel kezelt téstamodell, ahol a vízfelvétel (286%) és a főzési veszteség (22%) kiugróan magas volt. A legalacsonyabb főzési veszteséget 140 mg/kg enzimkezelt téstánál mértem.

Mindezeket összevetve a legjobb érzékszervi és főzési tulajdonságait együttesen biztosító optimális enzimdózisnak a sárgaborsóból készült téstáknál a 140 mg/kg liszt enzimkoncentrációt találtam.

A táblázat adatai szerint a víz/sóoldható fehérjefrakciók mennyiségében szignifikáns csökkenés következett be az egyre növekvő enzimmennyiség hatására. Ez azt bizonyította, hogy a víz/sóoldható frakció is jó szubsztrátja az enzimnek.

A sárgaborsóliszt alapú tézstamodellék oldható fehérjefrakcióinak transzglutamináz enzim hatására bekövetkezett molekulatömeg-eloszlásának változását SDS-poliakrilamid gélen követtem nyomon (40. ábra).

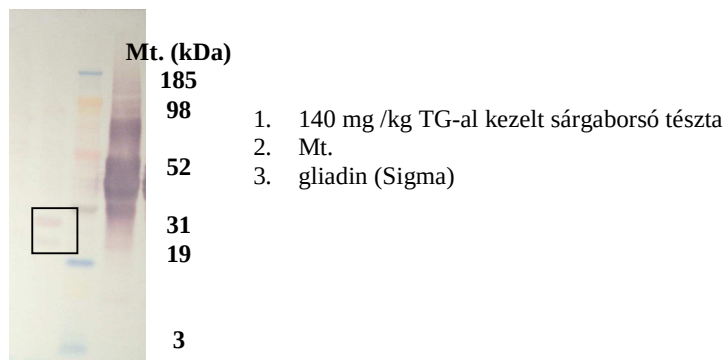


40. ábra: Transzglutamináz enzimmel kezelt sárgaborsó alapú tézstamodellék víz/sóoldható frakcióinak 15%-os SDS-poliakrilamid gélen történő elválasztása

Szignifikáns különbség látható a molekulatömeg-eloszlásban a sárgaborsóliszt és a tézsták oldható fehérjéi között, melynek magyarázata a víz/sóoldható fehérjék mennyiségének jelentős csökkenése a hozzáadott 50-200 mg/kg TG enzim hatására. Publikációk (CREVIEU et al. 1995, PERROT and GUEGEN 1995) szerint a sárgaborsóliszt jellemző fehérjéi a lipoxigenáz 91 kDa, a convicillin 70 kDa, legumin 60 kDa, legumin 39 kDa vicillin 46 kDa, vicillin 30-35,5 kDa, PA₂ (Pea Albumin₂, borsó albumin₂) 26-28,5 kDa, legumin 19,5-21,5 kDa. Az említett fehérjék közül a transzglutamináz enzimmel való kezelés után jellemzően a 28,5 kDa-nál lévő fehérjesáv maradt meg, változatlan intenzitással. A többi fehérjesáv ugyan nem tűnt el, de intenzitásuk jelentősen csökkent. Az enzim a fehérjéket egy kialakult fehérjeszerkezetbe építette be, ezzel egy új nem-víz/sóoldható fehérjét képezve. Tehát az enzim hatására feldúsult az oldhatatlan maradék.

Az optimális sárgaborsó alapú tézstamodell (140 mg/kg TG enzim) ipari körülmények között, egy próbagyártás keretében is előállítottam a Szilágyi Tészta Kft. mikrovállalkozásnál (Szeged). A gyártás La Parmigiana típusú, dupla tartályú, vízszintes nyomású présgépen (Fidenza, Olaszország) történt. A gyártás során előforduló esetleges gluténszennyezés ellenőrzésére kompetitív indirekt gliadin-ELISA-t alkalmaztam. A mintát 70%-os etanolban oldottam. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a rendszer nem volt elég érzékeny, hogy bármiféle prolamin szennyeződést kimutasson. Az ELISA megerősítésére immunblott vizsgálatot is végeztem, anti-gliadin nyúl IgG ellenanyag felhasználásával (41. ábra). Az immunblott vizsgálatnál a gliadinok tartományában (30-70 kDa) nem találtam immunreaktív fehérjesávot. Ez megerősítette a minta

gluténmentességét. Ugyanakkor a 23-31 kDa közötti molekulatömeg-tartományban két borsófehérje mutatott keresztreaktivitást.



41. ábra: Az optimális paraméterekkel rendelkező sárgaborsó alapú tézstamodell víz/sóoldható frakciójának gradiens gélen történő elválasztást követő immunblottja anti-gliadin nyúl IgG ellenanyaggal szemben

WANG et al. (2003) szerint a borsóban azonosított PA₂ fehérje (26-28,5 kDa) lektin típusú tulajdonsággal rendelkezik és homológiát mutat egy a csicseriborsóból izolált fehérjével, amely proteolízisre rezisztenciát mutatott (PERROT and GUEGEN 1995). Ebben az esetben előfordulhat, hogy nem a gliadinnal keresztreagáló fehérje és az ellenanyag közötti immunkomplex, hanem a lektin és az ellenanyag nem-specifikus kapcsolatáról van szó. Lektinek és IgG típusú fehérjék Fc-receptora közötti kapcsolatáról ROUGE et al. (1977) és CHATELAIN et al. (1982) is beszámoltak.

5.4. Új tudományos eredmények

- Az ismert fő gabona allergének közül a búza víz- és sóoldható frakciójában szeparált α -amiláz inhibitorok koncentrálására szelektív és reprodukálható eljárást fejlesztettem ki DEAE-cellulóz ioncserélő kromatográfia alkalmazásával.
- A hazai köztermesztésben lévő búzafajták α -amiláz inhibitorokban koncentrált frakcióiban, a gabonaallergiás humán szérumok többségével szemben IgE-reaktív fehérjéket LC-MS/MS technika és NCBI-nr Plant allergén adatbázis segítségével azonosítottam. A több peptid által beazonosított allergén fehérjék között xilanáz inhibitor prekursor, xilanáz inhibitor, α -amiláz inhibitor (monomer, dimer, CM17 fehérje prekursor), szerpin, tritin, GSP1 fehérje, 5a2 fehérje, LTP1 prekursor, nsLTP prekursor, β -amiláz, manganáz-szuperoxid dizmutáz, peroxidáz és egy kukorica ubiquitin-nel hasonló búzafehérje szerepelt. Az egy peptidtalálathoz alapján beazonosított fehérjék, pedig a következők voltak: peroxidáz, PR4, 15 kDa-os fehérje, WSCI proteináz inhibitor, avenin-féle prekursor, szerpin, és egy *Arabidopsis thaliana* EDA 18-hoz hasonló búzafehérje. Bizonyítottam, hogy az irodalomban

legfontosabb allergénként közölt α -amiláz inhibitorok, és az utóbbi kutatások szerint új allergénként közölt szerpinek a hazai köztermesztésben lévő búzában is allergénként detektálhatók, melyeket elsőként azonosítottam.

- Elsőként mutattam ki a búza, az amaránt és a hajdina víz- és sóoldható fehérjéi közül cöliákiás humán szérumokkal szemben IgA-reaktív fehérjéket. Ezen fehérjék azonosításának a gluténmentes élelmiszerek ellenőrzési módszertanában és a cöliákiás diagnosztikában van jelentősége, mivel így nagyobb biztonsággal van lehetőség a gluténmentes diétában kockázatmentesen alkalmazható élelmiszerek körét kiválasztani.
- A pepszines emésztés *in vitro* vizsgálatát az irodalomban eddig még nem közölt módon, SDS-PAGE-val történő szeparálást követően, PVDF membránra átblottolt búzafehérjéken elsőként végeztem. A vizsgálatokkal megerősítettem, hogy az allergének valóban rezisztensek pepszinnel szemben. Megállapítottam, hogy a gabonaallergiás humán szérumokkal erősen reaktív pepszin-rezisztens fehérjék főleg szerpinek (45 kDa), és α -amiláz inhibitorok (16 kDa) voltak.
- Poliklonális ellenanyag alapú, kompetitív indirekt ELISA-t fejlesztettem ki a gliadin és a gliadinnal immunológiailag keresztregáló fehérjék búzából és tritikáléból történő mennyiségi meghatározására. A módszer kimutatási határértéke 10 ppm, mérési tartománya 10-100 ppm között volt. Hőkezelt élelmiszermátrixokban a kimutatás érzékenysége csökkent.
- Különböző ellenanyagokra alapozott módszerekkel bizonyítottam, hogy a transzglutamináz enzimmel előállított búzaliszt alapú száraztészta modellekben a mérhető gliadintartalom nem csökkenthető az eltűrhető határérték (<100 ppm) alá, ezért csökkentett glutén tartalmú diétába nem illeszthető.
- Sárgaborsóliszt esetében transzglutamináz enzim felhasználásával kiváló minőségű, gluténmentes étrendbe illeszthető minőségi terméket állítottam elő. A termék gluténmentességét gliadin ellen nyúlban termelt poliklonális ellenanyaggal igazoltam.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A cöliákia és a gabonaallergia eltérő patomechanizmusa jól ismert, azonban kevesebb információ áll rendelkezésünkre az őket kiváltó antigénekről. A cöliákia esetében a glutén a fő allergén, a reakciót glutén-specifikus IgA és IgG ellenanyagok túlsúlya jellemzi. Gabonaallergia esetében IgE-reaktív gabona allergénekkal kell számolnunk.

A búzában lévő fehérjét, IgA/IgE-reaktivitásuk szempontjából, egyedül eddig CONSTANTIN et al. (2005) hasonlították össze cöliákiás és gabonaallergiás szérummal végzett 1D-immunblottal.

A cöliákiás IgA - és a búza pozitív IgE ellenanyagok különböző profilban ismerték fel a búza allergéneket. Bár a cöliákiás IgA ellenanyagok is azonosítottak ugyanolyan molekulatömegű antigéneket (25-46 kDa-nál 34/35 -, 10-18 kDa-nál 11/35 -, >45 kDa-nál 10/35 cöliákiás szérum), amelyeket az allergiás IgE ellenanyagok is felismertek (10-15 kDa-nál 13/16-, 25-70 kDa-nál 15/16 búza pozitív humán szérum), mégis erős különbség mutatkozott. A cöliákiás betegek reaktivitás profilja sokkal egységesebb volt, mint az allergiás betegeké. Az allergiás betegszérumok rendkívül heterogén IgE-reaktivitást mutattak.

Ez a tanulmány rámutatott arra, hogy a búzának vannak olyan antigénjei/epitópjai, amelyeket főképp a cöliákiás szérumok-, de vannak olyanok is, amelyeket inkább az allergiás szérumok IgE ellenanyaga preferál jobban. Arra a következtetésre jutottak, hogy az élelmiszerantigének molekuláris természete befolyásolhatja a patológiai immunválasz minőségét a tápcsatornában, ami természetesen a két betegség esetében, eltérő diagnosztikát és terápiás kezelést von maga után.

Az általuk kapott eredményeket összehasonlítva a saját eredményeimmel, és kiegészítve azokat saját vizsgálati eredményeimmel vontam le következtetéseimet, javaslataimat.

A vizsgálataim során hasonló eredményeket tapasztaltam, hiszen a hazai búzafajták fehérjei rendkívül heterogén IgE mintázatot mutattak a víz/sóoldható fehérjék tartományában. A prolaminok esetében nem tapasztaltam IgE reaktivitást. Búzafehérjék esetén a cöliákiás szérumok a prolamin frakcióban lévő gliadinokon kívül, a víz/sóoldható frakcióban is felismertek IgA-reaktív fehérjét a 29-54 kDa közötti molekulatömeg tartományban.

Fontosnak tartottam néhány búzával keresztreakáló és nem-keresztreakáló gabona búza pozitív - és cöliákiás humán szérummal való vizsgálatát is, az esetleges keresztreakciók feltérképezésére. Azt tapasztaltam, hogy a rendelkezésemre álló búza pozitív szérumok a minták prolamin frakciói közül főleg a kukorica zeinekkal reagáltak intenzíven, csak néhány szérum esetében volt a keresztreakálóknál is egy-egy intenzív IgE-sáv. Nem végeztem igazoló vizsgálatokat, arra hogy a tapasztalt keresztreakció peptid-specifikus volt-e, vagy pedig nem-specifikus szénhidrát keresztreakcióval kellett számolnom. A búzával keresztreakáló és nem-keresztreakáló gabonák/pszeudocereáliák víz/sóoldható frakciójában a 10-100 kDa közötti

tartományban egyéenként eltérő mintázatban talált a búza pozitív humán szérum IgE-reaktív fehérjéket. Cöliákiás szérummal vizsgálva azt tapasztaltam, hogy a szérum IgA ellenanyaga a prolamin frakcióban szinte minden fehérjével keresztreagált, illetve a víz/sóoldható fehérjék zömével is a 16-97 kDa közötti tartományban szérumonként eltérő módon.

Új eredménynek számít, hogy cöliákiás szérumokkal a búza víz/sóoldható fehérjéi, valamint a búzával nem-kesztreagáló pszeudocereáliák (amaránt, hajdina) víz/sóoldható fehérjéi felismerhetőek voltak. Ezek alapján javaslom, hogy a klinikai ellenőrzés és a diétás tanácsadás során vegyék figyelembe a fehérjékre mutatott IgE/IgA-reaktivitás említett *in vitro* pozitív vizsgálat eredményeit. Mivel a vizsgálathoz felhasznált szérumok jelentős egyedi eltérést mutattak, így a háttérben álló folyamatokat szükségesnek tartom tovább vizsgálni. Ezenkívül fontos lenne egyedi immunblott vizsgálatokat végezni a gabonákra érzékeny betegek esetében, az egyéni diéta kialakítása végett.

Kereskedelmi forgalomban kapható, kb. 10%-os tisztasági fokú búza eredetű α -amiláz inhibitor készítményt (TrimW, Nutricepts) poliklonális ellenanyag előállítás céljából nagyobb tisztaságúra dúsítottam az egyéb anyagok leválasztásával egy általam kidolgozott DEAE-cellulóz anioncserélő kromatográfiával. Az elválasztáshoz a készítmény 50 mM Trisz-HCl pufferben (pH 8,5) extrahált víz/sóoldható frakcióját használtam. Az oszlopon történő elválasztás során kapott két α -amiláz inhibitorban dúsított frakció közül a nagyobb enzimaktivitással rendelkező 2. frakció ellen nyúlban, a tisztított α -amiláz inhibitorra specifikus poliklonális ellenanyagot állítottam elő.

A búza α -amiláz inhibitorok, gabonaallergiás szérumokkal történő célirányos felismerésére, a korábban említett víz/sóoldható búzafehérje-frakciókat szintén a kidolgozott DEAE-cellulóz kromatográfiás elválasztással dúsítottam α -amiláz inhibitorokban.

A TrimW-2. frakcióban, valamint búzákat esetén a kidolgozott kromatográfiás eljárással kapott két α -amiláz inhibitorban dús frakcióban, poliklonális TrimW készítmény-2. frakció ellen termelt ellenanyaggal, valamint gabonaallergiás anonim humán szérumokkal az allergén fehérjék monitorozása után, a szérumokkal leggyakrabban felismert fehérjék közül néhányat - lehetőség szerint- LC-MS/MS módszerrel azonosítottam. Az α -amiláz inhibitor készítmény (TrimW)-2. frakciójában szerpineket, alfa-amiláz inhibitorokat és HMW glutenin-alegységeket azonosítottam. A búzafehérjesávok azonosított fehérjéi pedig a következők voltak: xilanáz inhibitor prekursor, xilanáz inhibitor, α -amiláz inhibitor (monomer, dimer, CM17 fehérje prekursor), szerpin, tritin, GSP1 fehérje, 5a2 fehérje, LTP1 prekursor, ns-LTP prekursor, β -amiláz, manganáz-szuperoxid dizmutáz, peroxidáz és egy kukorica ubiquitin-nel hasonló búzafehérje. Az egy peptidtalalat alapján beazonosított fehérjék pedig a következők voltak: peroxidáz, PR4, 15 kDa-os fehérje, WSCI proteináz inhibitor, avenin-féle prekursor, szerpin, és egy *Arabidopsis thaliana* EDA 18-hoz

hasznos búzafehérje. Az irodalmi adatokon túl kapott újabb beazonosított allergének alapján megállapítható, hogy mennyire széles skálán mozog az allergiás tüneteket kiváltó allergénforrás. Mivel búzafajtánként akár eltérő is lehet, így a diagnosztika is megnehezül. A betegek bőrtesztrel történő kiszűrésére ezért javaslom a minél több hazai búzafajtából kevert extraktok használatát.

A búzafehérje antigének alapanyagokból és élelmiszer-mátrixokból való kimutatása élelmiszer-biztonsági szempontból fontos feladat a korrekt allergén jelölés érdekében. Munkám során a glutén kimutathatóságát különböző ellenanyag alapú módszerrel (poliklonális-, monoklonális ω -gliadin-, monoklonális R5 ellenanyag alapú módszerekkel) vizsgáltam gabona és pszeudocereália alapanyagokból, és hőkezelt élelmiszer-mátrixokból (tészták, gluténnal szennyezett kenyerek). A gliadin alapú kimutatás során megállapítottam, hogy a gliadinok sokféleségéből és azok technológiai hatásokra való eltérő viselkedéséből adódóan, a toxikus komponensek reprodukív módon és nagy biztonsággal nehezen kimutathatók. A különböző kereskedelmi forgalomban lévő, eltérő ellenanyag alapú kitek, egyazon élelmiszer-minta gliadintartalmát mérve nem ugyanazt az eredményt adják (az eltérő specificitás végett), így nem kapunk egyértelmű választ arra, hogy melyik fogadható el a szabályozásnak (20 ppm gluténtartalom) megfelelően. Javaslom a továbbiakban az alapanyagokból és különböző technológiai hatásoknak kitett élelmiszer-mátrixokból egyaránt a gliadin különböző oldószerekkel történő extrahálásának vizsgálatát, és a kapott eredmények összehasonlítását. Fontos lenne hazánkban az európai referencia standardot kibővíteni hazai búzafajtákból izolált gliadinokkal az élelmiszerek gluténmentességének vizsgálatához.

Az élelmiszeriparban nagy múltra tekint vissza az élelmiszerfehérjék enzimikus kezelése, mellyel új, kedvezőbb funkciós tulajdonságú és jobb táplálkozási értékű termékeket lehet előállítani. Kutatásaim során búza alapból transzglutamináz enzim hozzáadásával cöliákias betegek részére száraztésztát készítettem. A kísérlettől azt vártam, hogy az enzim, fehérjéket keresztlinkelve elfed reaktív epitópokat, így hipoantigén vagy csökkentett antigén tartalmú terméket eredményez. Mindezek mellett, a gluténtartalommal nem rendelkező sárgaborsó alapból gluténmentes diétába illeszthető minőségi, hipoallergén modelltermék előállítását is elvégeztem. Megállapítottam, hogy búza alapból ugyan minőségileg sokkal jobb minőségű modellterméket tudtam előállítani, de a cöliákias betegek számára nem fogyaszthatót. Ezzel szemben, sárgaborsóból jó minőségű száraztésztát tudtam előállítani, amelyet a cöliákiasok is biztonsággal fogyaszthatnak. Az eredményeim alapján javaslom más, nem keresztreaktáló gabonából, illetve pszeudocereáliából hipoallergén száraztészták, valamint más gabona alapú termékek előállítását nemcsak transzglutamináz enzimmel, hanem akár emulgeátorok felhasználásával.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A cöliákia és a gabonaallergia az egyik legelterjedtebb betegség világszerte és Magyarországon is. Éppen ezért e betegségeket kiváltó allergének vizsgálata a mai napig fontos kutatási területté vált.

A cöliákia esetében a búza gliadinok és a gliadinokkal homológ szerkezettel rendelkező prolaminek (rozs szekalin, árpa hordein, zab avenin) főként bélboholy-elváltozást okozhatnak. Gabonaallergia esetén a gabonaallergiát leggyakrabban kiváltó erős allergénkomponensek a gliadinok (α és $\omega 5$), az α -amiláz inhibitorok (CM3, 0.53) és a nem-specifikus lipid transzfer fehérjék.

Kutatásaimat a hazai köztermesztésben lévő búzafajták fehérjéinek -, és a búzával keresztreagáló (tritikálé, rozs, árpa) - és nem-keresztreagáló gabonák/pszeudocereáliák (rizs, kukorica/hajdina, amaránt) fehérjéinek allergén vizsgálatára fókuszáltam. Minden vizsgálatba vont mintánál (öt db. fajta/faj, kivétel: három db. fajta/amaránt) célom volt cöliakiás-, és gabonaallergiás humán szérumokkal vizsgálni az általuk felismert allergén fehérjéket.

A cöliakiás IgA - és a búza pozitív IgE ellenanyagok különböző profilban ismerték fel a búza allergéneket. Bár a cöliakiás IgA ellenanyagok is azonosítottak ugyanolyan molekulatömegű antigéneket, amelyeket az allergiás IgE ellenanyagok is felismertek, mégis erős különbség mutatkozott. A cöliakiás betegek reaktivitás-profilja sokkal egységesebb volt, mint az allergiás betegeké. Az allergiás betegszérumok rendkívül heterogén IgE-reaktivitást mutattak egyéntől függően.

Nem várt eredmény volt a búza víz/sóoldható fehérjei, valamint a búzával nem-keresztreagáló kukorica - és pszeudocereáliák (amaránt, hajdina) víz/sóoldható fehérjéinek cöliakiás betegszérumokkal szembeni IgA-reaktivitása. A kukorica, az amaránt és a hajdina a cöliakiás betegek diétájába javasolt gabonák közé tartoznak, ezért volt meglepő e felismerés.

A búzaminták vizsgálatánál a víz/sóoldható frakciót két α -amiláz inhibitorban dús frakcióval reprezentáltam, amelyeket egy általam kidolgozott DEAE-cellulóz anioncserélő kromatográfiás elválasztással kaptam. Az α -amiláz inhibitorokban való dúsítás célja a búzák víz/sóoldható frakciójában lévő α -amiláz inhibitorok, gabonaallergiás szérumokkal történő célirányos felismerésének megkönnyítése volt. Szintén ezzel a kromatográfiás eljárással egy a kereskedelmi forgalomban kapható, kb. 10%-os tisztasági fokú búza eredetű α -amiláz inhibitor készítményt (TrimW, Nutricepts) is poliklonális ellenanyag előállítására céljából nagyobb tisztaságúra dúsítottam. Az oszlopon történő elválasztás során kapott két α -amiláz inhibitorban dúsított frakció közül a nagyobb enzimaktivitással rendelkező 2. frakció ellen nyúlban, a tisztított α -amiláz inhibitorra

specifikus poliklonális ellenanyagot állítottam elő. Az ellenanyaggal a búzafehérjék antigenitását térképeztem fel.

A TrimW-2. frakcióban, valamint az α -amiláz inhibitorban dús búzafrakciókban, poliklonális TrimW készítmény-2. frakció ellen termelt ellenanyaggal, valamint gabonaallergiás anonim humán szérumokkal az allergén fehérjék monitorozása után, a szérumokkal leggyakrabban felismert allergén fehérjéket LC-MS/MS módszerrel, NCBI-nr Plant adatbázis alapján azonosítottam. Mivel az adatbázisban nem szerepeltek amaránt, hajdina, rozs, tritikálé, árpa és zab speciális fajfehérjék, így az azonosításra vitt fehérjék közül főleg búza-speciális fajfehérjékkel találtam homológ fehérjéket, különböző mértékű lefedettségben. Több peptid által beazonosított allergén fehérjék között xilanáz inhibitor prekursor, xilanáz inhibitor, α -amiláz inhibitor (monomer, dimer, CM17 fehérje prekursor), szerpin, tritin, GSP1 fehérje, 5a2 fehérje, LTP1 prekursor, ns-LTP prekursor, béta-amiláz, manganáz-szuperoxid dizmutáz, peroxidáz és egy kukorica ubiquitin-nel hasonló búzafehérje szerepelt. Az egy peptidtalálat alapján beazonosított fehérjék pedig a következők voltak: peroxidáz, PR4, 15 kDa-os fehérje, WSCI proteináz inhibitor, avenin-féle prekursor, szerpin, és egy *Arabidopsis thaliana* EDA 18-hoz hasonló búzafehérje. Irodalomban közölt α -amiláz inhibitorok, és a szerpinek allergén tulajdonságát a hazai köztermesztésben lévő búzák esetében is bizonyítottam. A többi előbb felsorolt fehérjét pedig az irodalomban eddig nem ismertetett, új allergénként azonosítottam.

A cöliakiás és a gluténre érzékeny gabonaallergiás betegek szempontjából fontosnak tartottam a gliadinok, mint egyik főbb búza allergén kimutatásának vizsgálatát alapanyagokból, illetve hőkezelt és funkcionális adalékokkal minőségileg javított/vagy szándékos gluténszennyezettségnek kitett élelmiszer-mátrixokból (szárastészták, kenyerek). A vizsgálat fontosságát indokoltnak tartottam, mivel a gluténtartalom kimutatására vonatkozó szabályozás (ALINORM 08/31/26, Appendix III) létjogosultságát a gyakorlatban is elfogadhatóvá kell tenni. Éppen ezért van szükség e témakörben minél több, széleskörű vizsgálatra. Eredményeim alapján elmondható, hogy az eltérő ellenanyag bázisú módszerekkel, adott minták esetén, eltérő érzékenységgel tudtam a gluténmentességet mérni, amely felveti azt a dilemmát, hogy vajon melyik módszer fogadható el kompatibilisnek a szabályozással (20 ppm gluténtartalom).

A cöliakiás és gluténre érzékeny betegek számára csökkentett antigén tartalmú, búza alapú szárastészta előállítását transzglutamináz enzimmal végeztem. Bár az enzim a tézstaszerkezeten javított, de a toxikus gliadinok anti-gliadin ellenanyaggal kimutathatók voltak. Ehelyett a diétás termékek választékát sárgaborsó alapú transzglutamináz enzimmal kezelt szárastésztával bővítettem.

8. SUMMARY

Celiac disease and cereal allergy are the most prevalent illness throughout the world and in Hungary too. Therefore, the investigation of the disease-causing allergens has become an important field of scientific research.

In celiac disease, gliadins and those proteins having structure homolog to gliadins (rye secalin, barley hordein, oat avenin) can cause serious alterations mostly in the villi of the human intestinal tract. In case of wheat allergy, the most frequently allergy-causing components are the gliadins (α , ω 5), the α -amylase inhibitors (CM3, 0.53) and the non-specific lipid transfer proteins.

In this research work the focus was on the examination of the allergenic nature of proteins occurring in the domestic wheat cultivars, its cross-reactive crops such as triticale, rye and barely, and non-cross-reactive cereals/pseudo-cereals like rice, corn/buckwheat and amaranth. In each samples involved in the studies, five cultivars were tested per sort, except amaranth, of which only three cultivars were examined. The main objective was to examine the allergenic proteins recognised by celiac and wheat allergic human sera.

The celiac IgA – and wheat-sensitive IgE antibodies recognized, in different profiles, the wheat allergens. Although, the celiac IgA antibodies also identified antigens with the same molecular weight to that recognized by the allergenic IgE antibodies nevertheless substantial differences could be shown. The reactivity profile of the celiac patients was considerably more uniform, than that of the allergy-diseased patients. The sera from allergy-diseased persons showed, depending on individual, remarkably heterogeneous IgE-reactivity.

It was an unexpected and surprising result, that the IgA-reactivity of water/salt-soluble proteins of wheat, non-cross-reactive corn and pseudo-cereals (amaranth, buckwheat) was found against sera from celiac patients, because corn, amaranth and buckwheat are among that products, which have safe use of practise for diets of celiac patients.

In the examination of the wheat samples, the water/salt-soluble fractions were represented with two α -amylase inhibitor-concentrated fractions, which were produced by own-developed DEAE-cellulose anion-exchange chromatographic separation. The purpose of concentration of α -amylase inhibitors was to facilitate the appropriate recognition of the α -amylase inhibitors existing in the water/salt soluble-fraction by wheat allergic sera. With the same chromatographic procedure, a commercially available α -amylase inhibitor preparation of wheat origin (TrimW, Nutricepts) with about 10% purity was enriched in α -amylase inhibitors in order to produce purified antigen for development of polyclonal antibodies. Polyclonal antibodies specific for purified α -amylase inhibitors were produced in rabbit against the 2nd fraction obtained from the chromatographic

separation and contained the highest enzyme activity. With the produced antibody, the antigenic nature of wheat proteins was monitored.

The protein bands most frequently recognized by IgE-reactive human sera of wheat allergy-diseased patients and by antibodies against the 2nd fraction of TrimW were analyzed by LC-MS/MS and identified from the NCBI nr Plant database. The database is developed mainly for the wheat proteins, so the sequence homology was used for the identification of proteins concerning amaranth, buckwheat, rye, triticale, barley and oat. Among potential allergenic proteins from the database with high peptide covering rate xylanase inhibitor precursor, xylanase inhibitor, α -amylase inhibitor (monomer, dimer, CM17 protein precursor), serpin, tritin, GSP1 protein, 5a2 protein, LTP1 precursor, β -amylase, manganese-superoxide dismutase, peroxidase, and corn ubiquitin-like wheat protein were found. The proteins were identified according to only one peptide were: peroxidase, PR4, 15 kDa protein, WSCI proteinase inhibitor, avenin-type precursor, serpin, and one *Arabidopsis thaliana* EDA 18-like wheat protein. It was proven that α -amylase inhibitors, which are reported in the literature as the most important allergens and serpins, which are found in the most recent researches as new allergens, could be firstly detected and identified as allergens in domestically cultivated wheat varieties.

The investigation on detection of gliadin, the one of the major wheat allergens is considerably important in the raw materials and in the heat-treated and quality improved by functional additives matrices or other food matrices contaminated on purpose with gluten (dry pastas, breads) in the respect of the patients suffering from celiac disease and wheat allergy. My results have pointed out the weakness of the practical uses of the regulation concerning the gluten-free food (ALINORM 08/31/26, Appendix III). That is the reason for the necessity of more extensive research work in this topic. According to the obtained results, the gluten-free nature of the samples was assured by different antibody-based methods with different sensitivity, which raised the question, which method was compatible with the regulation that limited the tolerable gluten content (≤ 20 ppm in gluten-free food).

Transglutaminase enzyme was used for the production of wheat based dry pasta with reduced antigen content for the celiac and gluten-sensitive patients. Although the enzyme improved the structure of the pasta, the gliadins have been recognized by anti-gliadin antibodies. Instead of wheat based pasta products, the range of the gluten-free foodstuffs was broadened with yellow pea-based and transglutaminase enzyme-treated dry pasta.

MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- AALBERSE R. C., STAPEL S. O. (2001): Structure of food allergens in relation to allergenicity. *Pediatric Allergy and Immunology*, 14 (12) 10-14. p.
- AKAGAWA M., HANDOYO T., ISHII T., KUMAZAWA S., MORITA N., SUYAMA K. (2007): Proteomic analysis of wheat flour allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (17) 6863-6870. p.
- ALLMANN M., CANDRIAN U., HÖFELEIN C., LÜTHY J. (1993): Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. *Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 196 (3) 248-251. p.
- AMANO M., OGAWA H., KOJIMA K., KAMIDAIIRA T., SUETSUGU S., YOSHIHAMA M., SATOH T., SAMEJIMA T., MATSUMOTO I. (1998): Identification of the major allergens in wheat flour responsible for baker's asthma. *Biochemical Journal*, 330 (3) 1229-1234. p.
- ARENDT E. K., O'BRIEN C. M., SCHOBERT T. J., GALLAGHER E., GORMLEY T. R. (2002): Development of gluten-free cereal products. *Farm and Food*, 12 (1) 21-27. p.
- ARENDT K. E., SCHOBERT T. J., GORMLEY R., GALLAGHER E. (2004): Új szemlélet a gluténmentes gabonatermékek előállításában. *Élelmészeti ipar*, 58 (1) 5-13. p.
- ARENTZ-HANSEN H., FLECKENSTEIN B., MOLBERG O., SCOTT H., KONING F., JUNG G., ROEPSTORFF P., LUNDIN K. E. A., SOLLID L. M. (2004): The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *Public Library of Science Medicine*, 1 (1) 84-92. p.
- ARMENTIA A., SANCHEZ-MONGE R., GOMEZ L., BARBER D., SALCEDO G. (1993): In vivo allergenic activities of eleven purified members of a major allergen family from wheat and barley flour. *Clinical and Experimental Allergy*, 23 (5) 410-415. p.
- ASENSIO L., GONZÁLEZ I., GARCÍA T., MARTIN R. (2008): Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19 (1) 1-8. p.
- ASERO R., MISTRELLO G., RONCAROLO D., DE VRIES S. C., GAUTIER M. F., CIURANA C. L., VERBEEK E., MOHAMMADI T., KNUL-BRETTLOVA V., AKKERDAAS J. H., BULDER I., AALBERSE R. C., VAN-REE R. (2000): Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *International Archives of Allergy and Immunology*, 122 (1) 20-32. p.
- BAKOS N. (2006.): Növényi eredetű táplálékok közötti allergiás keresztreakciók. *Allergológia és Klinikai Immunológia*, 9 (1) 13-18. p.

- BASMAN A., KOKSEL H., ATLI A. (2006): Effects of increasing levels of transglutaminase on cooking quality of bran supplemented spaghetti. *European Food Research and Technology*, 223 (4) 547-551. p.
- BASMAN A., KÖKSEL H., NG P. K. W. (2002a): Effect of increasing level of transglutaminase on the rheological properties and bread quality characteristics of two wheat flours. *European Food Research and Technology*, 215 (5) 419-424. p.
- BASMAN A., KÖKSEL H., NG P. K. W. (2002b): Effects of transglutaminase on SDS-PAGE patterns of wheat, soy, and barley proteins and their blends. *Food Chemistry and Toxicology*, 67 (7) 2654-2658. p.
- BATTAIS F., COURCOUX P., POPINEAU Y., KANNY G., MONERET-VAUTRIN D. A., DENERY-PAPINI S. (2005): Food allergy to wheat: differences in immunoglobulin E-binding proteins as a function of age or symptoms. *Journal of Cereal Science*, 42 (1) 109-117. p.
- BAUER N., KOEHLER P., WIESER H., SCHIEBERLE P. (2003): Studies on effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat. I. Biochemical Analysis. *Cereal Chemistry*, 80 (6) 781-786. p.
- BAUR X., POSCH A. (1998): Characterized allergens causing bakers' asthma. *Allergy*, 53 (6) 562-566. p.
- BESLER M. (2001): Determination of allergens in foods. *Trends in analytical chemistry*, 20 (11) 662-672. p.
- BITTNER C., GRASSAU B., FRENZEL K., BAUR X. (2008): Identification of wheat gliadins as an allergen family related to baker's asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121 (3) 744-749. p.
- BJORKSTEN F., BACKMAN A., JARVINEN K. A., LEHTI H., SAVILAHTI E., SYVANEN P., KARKKAINEN T. (1977): Immunoglobulin E specific to wheat and rye flour proteins. *Clinical Allergy*, 7 (5) 473-483. p.
- BLOCK G., TSE K. S., KIJEK K., CHAN H., CHAN-YEUNG M. (1984): Baker's asthma. Studies of the cross-antigenicity between different cereal grains. *Clinical Allergy*, 14 (2) 177-185. p.
- BONET A., BLASZCZAK W., ROSELL C. M. (2006): Formation of homopolymers and heteropolymers between wheat flour and several protein sources by transglutaminase-catalyzed cross-linking. *Cereal Chemistry*, 83 (6) 655-662. p.
- BORGHI B., CASTAGNA R., CORBELLINI M., HENU M., SALAMINI F. (1996): Breadmaking quality of Einkorn wheat (*Triticum monococcum* spp *monococcum*). *Cereal Chemistry*, 73 (2) 208-214. p.

- BREITENEDER H. (2008): Can any protein become an allergen? *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 48 (3) 135-138. p.
- BREITENEDER H., MILLS E. N. C. (2005): Plant food allergens-structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology advances*, 23 (6) 395-399. p.
- BREITENEDER H., RADAUER C. (2004): A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113 (5) 821-830. p.
- BRUSIC V., MILLOT M., PETROVSKY N., GENDEL S. M., GIGONZAC O., STELMAN S. J. (2003a): Allergen databases. *Allergy*, 58 (11) 1093-1100. p.
- BRUSIC V., PETROVSKY N. (2003b): Bioinformatics for characterisation of allergens, allergenicity and allergic cross-reactivity. *Trends in Immunology*, 24 (5) 225-228. p.
- CABALLERO P. A., GÓMEZ M., ROSELL C. M. (2007a): Bread quality and dough rheology of enzyme-supplemented wheat flour. *European Food Research and Technology*, 224 (5) 525-534. p.
- CABARELLO P. A., BONET A., ROSELL C. M., GÓMEZ M. (2005): Effect of microbial transglutaminase on the rheological and thermal properties insect damaged wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 42 (1) 93-100. p.
- CABARELLO P.A., GÓMEZ M., ROSELL C.M. (2007b): Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzyme combination. *Journal of Food Engineering*, 81 (1) 42-53. p.
- CHAPMAN M. D., POMÉS A., BREITENEDER H., FERREIRA F. (2007): Nomenclature and structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119 (2) 414-420. p.
- CHATELAIN C., LEMOINE A., DUGOUYON M., CLANC M., ROUGE P. (1982): Interaction of polyclonal and monoclonal human immunoglobulins G with various lectins (Concavalin A, lentil and pea lectins). In: *BØG-HANSEN, T. C. (Ed.) Lectins, biology, biochemistry, clinical biochemistry*. Walter de Gruyter, New York, pp. 393-402.
- CICLITIRA P. J., JOHNSON M. W., DEWAR D. H., ELLIS H. J. (2005): The pathogenesis of celiac disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26 (6) 421-458. p.
- CICLITIRA P. J., MOODIE S. J. (2003): Coeliac disease. *Best Practise & Research Clinical Gastroenterology*, 17 (2) 181-195. p.
- CONSTANTIN C., HUBER W. D., GRANDITSCH G., WEGHOFFER M., VALENTA R. (2005): Different profiles of wheat antigens are recognised by patients suffering from coeliac disease by patients suffering from coeliac disease and IgE-mediated food allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 138 (3) 257-266. p.

- CREVEL R. W. R., BRIGGS D., HEFLE S. L., KNULST A. C., TAYLOR S. L. (2007): Hazard characterisation in food allergen risk assessment: The application of statistical approaches and the use of clinical data. *Food and Chemical Toxicology*, 45 (5) 691-701. p.
- Crevieu, I., Berot, S., Geuguen, J. (1995): Large scale procedure for fractionation of albumins and globulins from pea seeds. [350–351. p.] In: Proceedings. 2nd European Conference on Grain Legumes. Copenhagen, Denmark July 9-13, 1995
- CX/NFSDU ALINORM 08/31/26, Appendix III., Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Alimentarius Commission, 31th Session, Geneva, Switzerland, 30 June - 5 July 2008. The Report of the 29th session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses, Bad Neuenahr-Ahrweiler, Germany, 12 - 16 November 2007.
- DENERY-PAPINI S., NICOLAS Y., POPINEAU Y. (1999): Efficiency and limitations of immunochemical assays for the testing of gluten-free foods. *Journal of Cereal Science*, 30 (2) 121-131. p.
- DIAZ-PERALES A., COLLADA C., BLANCO C., SANCHEZ-MONGE R., CARRILLO T., ARAGONCILLO C., SALCEDO G. (1999): Cross-reactions in the latex-fruit syndrome: A relevant role of chitinases but not of complex asparagine-linked glycans. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104 (3 Pt 1) 681-687. p.
- DICKINSON E. (1997): Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. *Trends in Food Science and Technology*, 8 (10) 334-339. p.
- ESCRIBANO M. M., SERRANO P., MUNOZ-BELLIDO F. J., DE LA CALLE A., CONDE J. (1998): Oral allergy syndrome to bird meat associated with egg intolerance. *Allergy*, 53 (9) 903-904. p.
- FAO/WHO (2001a): Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology. Rome, Italy, 22-25 January, 2001, 12-13. p. (http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/ec_jan2001.pdf)
- FAO/WHO (2001b): Topic 4.: Sequence homology and allergen structure. Expert consultation on foods derived from biotechnology. Rome, Italy, 22-25 January, 2001, 6 p. (<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/bi06al.pdf>)
- FASANO A., CATASSI C. (2001): Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*, 120 (3) 636-651. p.
- FDA (The Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services) (2006): Approaches to establish thresholds for

- major food allergens and for gluten in food (prepared by the Threshold Working Group) 108 p. (<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/alrgn2.html>)
- FEILLET P., FEVRE F., KOBREHEL K. (1977): Modification in durum wheat protein properties during pasta dough sheeting. *Cereal Chemistry*, 54 (3) 580–587. p.
- FENNEY R. E. (ed.), WHITAKER J. R. (ed.) (1986): Protein tailoring for food and medical uses. Marcel Dekker Inc., New York, 392. p.
- FRANKEN J., STEPHAN U., MEYER H. E., KÖNIG W. (1994): Identification of alpha-amylase inhibitor as a major allergen of wheat flour. *International Archives of Allergy and Immunology*, 104 (2) 171-174. p.
- GARCIA E., LLORENTE M., HERNANDO A., KIEFFER R., WIESER H., MÉNDEZ E. (2005): Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 17 (5) 529-539. p.
- GERGELY J., ERDEI A. (Szerk.) (2000): Immunbiológia- Medicina Könyvkiadó Rt.. Budapest, 329-343. p.
- GERRARD J. A. (2002): Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in Food Science & Technology*, 13 (12) 391-399. p.
- GERRARD J. A., FAYLE S. E., BROWN P. A., SUTTON K. H., SIMMONS L., RASIAH I. (2001): Effects of microbiological transglutaminase on the wheat proteins of bread and croissant dough. *Journal of Food Science*, 66 (6) 782 -786. p.
- GERRARD J. A., NEWBERRY M. P., ROSS M., WILSON A. J., FAYLE S. E., KAVALE S. (2000): Pastry lift and croissant volume as affected by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 65 (2) 312-314. p.
- GERRARD J. A., SUTTON K.H. (2005): Addition of transglutaminase to cereal products may generate the epitope responsible for coeliac disease. *Trends in Food Science and Technology*, 16 (11) 510-512. p.
- GOMEZ L., MARTIN E., HERNANDEZ D., SANCHEZ-MONGE R., BARBER D., DEL POZO V. (1990): Members of the α -amylase inhibitors family from wheat endosperm are major allergens associated with baker's asthma. *FEBS Letter*, 261 (1) 85-88. p.
- GONZÁLEZ-BUITRAGO J. M., FERREIRA L., ISIDORO-GARCÍA M., SANZ C., LORENTE F., DÁVILA I. (2007): Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases. *Clinica Chimica Acta*, 385 (1-2) 21-27. p.
- GUJRAL H. S., ROSELL C. M. (2004): Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase. *Journal of Cereal Science*, 39 (2) 225-230. p.

- HAJÓS GY., IDEI M. (2001): Elektroforetikus és elektrokratográfiás módszerek fejlődése és alkalmazási lehetőségei I. *Magyar Kémikusok Lapja*, 56 (10) 364-368. p.
- HARBOE N., INGLID A. (1973): Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2 (Suppl 1): 161-164. p.
- HENSON C. A., STONE J. M. (1988): Variation in α -amylase and α -amylase inhibitor activities in barley malts. *Journal of Cereal Science*, 8 (1) 39-46. p.
- HINZ K., HUPPERTZ T., KULOZIK U., KELLY A. L. (2007): Influence of enzymatic cross-linking on milk fat globules and emulsifying properties of milk proteins. *International Dairy Journal*, 17 (4) 289-293. p.
- HISCHENHUBER C., CREVEL R., JARRY B., MAKIS M., MONERET-VAUTRIN D. A., ROMANO A., TRONCONE R., WARD R. (2006): Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 23 (5) 559-575. p.
- HORACSEK M. (2005): A gluténmentes élelmiszerek nemzetközi szabályozásának aktuális kérdései. 33-36. p. In: BÁNÁTI D. (Szerk.), MOLNÁR I. (Szerk.): *Élelmiszer-biztonságia Közlemények II.: Gluténmentes élelmiszerek*. Budapest: Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet (kiadó), Budapest: SZÍN-TECH Kft. (nyomda), 62. p.
- HOUBA R., VAN RUN P., HEEDERIK D., DOEKES G. (1996): Wheat antigen exposure assessment for epidemiological studies in bakeries using personal dust sampling and inhibition ELISA. *Clinical and Experimental Allergy*, 26 (2) 154-163. p.
- HÖGBERG L., LAURIN P., FALTH-MAGNUSSON K., GRANT C., GRODZINSKY E., JANSSON G., ASCHER H., BROWALDH L., HAMMERSJÖ J. A., LINDBERG E., MYRDAL U., STENHAMMAR L. (2004): Oats to children with newly diagnosed coeliac disease: a randomised double blind study. *Gut*, 53 (5) 649-654. p.
- <http://www.cbms.mq.edu.au/-plantserpins/SERineProteinaseINhibitor>
- <http://www.foodintol.com/celiac.asp>
- <http://www.immunocapinvitrosight.com>
- <http://www.informall.eu.com> (EU informall database)
- IZUMI H., ADACHI T., FUJII N., MATSUDA T., NAKAMURA R., TANAKA K., URISU A., KUROSAWA Y. (1992): Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a major allergenic protein in rice seeds. Homology of the deduced amino acid sequence with members of alpha-amylase/trypsin inhibitor family. *FEBS Letters*, 302 (3) 213-216. p.
- JACKSON W. F. (2003): Food Allergy. ILSI (International Life Science Institute) Europe Concise Monograph Series. Brussels: ILSI Press. 46 p.

- JAMES J. M., SIXBEY J. P., HELM R. M., BANNON G. A., BURKS A. W. (1997): Wheat α -amylase inhibitor: a second route of allergic sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99 (2) 239-244. p.
- JANATUINEN E. K., KEMPPAINEN T. A., JULKUNEN R. J. K., KOSMA V. M., MÄKI M., HEIKKINEN M., UUSITUPA M. I. J. M. (2002): No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease, *Gut*, 50 (3) 332-335. p.
- JENSEN-JAROLIM E., SCHMID B., BERNIER F., BERNA A., KINACIYAN T., FOCKE M., EBNER C., SCHEINER O., BOLTZ-NITULESCU G. (2002): Allergologic exploration of germins and germin-like proteins, a new class of plant allergens. *Allergy*, 57 (9) 805-810. p.
- JOHANSSON S. G., HOURIHANE J. O., BOUSQUET J., BRUIJNZEEL-KOOMEN C., DREBORG S., HAAHTELA T., KOWALSKI M. L., MYGIND N., RING J., VAN CAUWENBERGE P., VAN HAGE-HAMSEN M., WUTHRICH B. (2001): A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*, 56 (9) 813-824. p.
- JONES S. M., MAGNOLFI C. F., COOKE S. K., SAMPSON H. A. (1995): Immunologic cross-reactivity among cereal grains and grasses in children with food hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 96 (3) 341-351. p.
- KAHLENBERG F., SANCHEZ D., LACHMANN I., TUCKOVA L., TLASKALOVA H., MÉNDEZ E., MOTHES T. (2006): Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides. *European Food Research and Technology*, 222 (5-6) 78-82. p.
- KARÁCSONYI L. (1970): Gabona és liszt-, sütő- és téstávizsgálási módszerek. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó, 22-24. p.
- Kasarda D. D. (2001): GRAINS in relation to celiac disease. *Cereal Foods World*, 46 (5) 209-210. p.
- KASARDA D. D. (2004): What we know about grain safety. Columbia University Celiac disease and other food intolerances conference, Columbia Medical Center, New York, New York, 22 October 2004. (<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/topics/kasarda.html>)
- KAUKINEN K., COLLIN P., HOLM K., RANTALA I., VUOLTEENAHO N., REUNALA T., MAKI M. (1999): Wheat starch-containing gluten-free flour products in the treatment of coeliac disease and dermatitis herpetiformis. A long-term follow-up study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 34 (2) 163-169. p.
- KISS M. (2004): A gluténszenzitív enteropátia (coeliákia) és az 1-es típusú diabétesz mellitusz (ITDM) együttes előfordulása. *Új diéta*, 1 (9) 18. p.
- KITTA K., OHNISHI-KAMEYAMA M., MORIYAMA T., OGAWA T., KAWAMOTO S. (2006): Detection of low-molecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid-urea polyacrylamide gel. *Analytical Biochemistry*, 351 (2) 290-297. p.

- KÖKSEL H., SIVRI D., NG P. K. W., STEFFE J. F. (2001): Effects of transglutaminase enzyme on fundamental rheological properties of sound and bug-damaged wheat flour doughs. *Cereal Chemistry*, 78 (1) 26-30. p.
- KURAISHI C., SAKAMOTO J., YAMAZAKI K., SUSAKI, Y. (2001): Transglutaminase: Its utilisation in the food industry. *Food Reviews International*, 17 (2) 221–246. p.
- KURTH L., ROGERS P. (1984): Transglutaminase catalyzed cross-linking of myosin to soya protein, casein and gluten. *Journal of Food Science*, 49 (4) 573-589. p.
- KUSABA-NAKAYAMA M., KI M., IWAMOTO M., SHIBATA R., SATO M., IMAIZUMI K. (2000): CM3, one of the wheat α -amylase inhibitor subunits, and binding of IgE in sera from Japanese with atopic dermatitis related to wheat. *Food and Chemical Toxicology*, 38 (2-3) 179-185. p.
- LAEMMLI U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259) 680-685. p.
- LARRE C., CHIARELLO M., DUDEK S., CHENU M., GUEGUEN J. (1993): Action of transglutaminase on the constitutive polypeptides of pea legumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 (11) 1816-1820. p.
- LARRE C., DENERY-PAPINI S., POPINEAU Y., DESHAYES G., DESSERME C., LEFEBVRE J. (2000): Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. *Cereal Chemistry*, 77 (1) 32-38. p.
- LARRE C., KEDZIOR Z. M., CHENU M. G., VIROBEN G., GUEGUEN J. (1992): Action of transglutaminase on an 11S seed protein (pea legumin): influence of the substrate conformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (7) 1121-1126. p.
- LÁSZTITY R. (1999): *Cereal Chemistry*. Budapest: Akadémiai Kiadó.
- LUNDIN K.E., NILSEN E. M., SCOTT H. G., LOBERG E. M., GJOEN A., BRATLIE J., SKAR V., MENDEZ E., LOVIK A., KETT K. (2003): Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut*, 52 (11) 1649-1652. p.
- MALEKI S. J. (2004): Food processing: effects on allergenicity. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology*, 4 (3) 241-245. p.
- MARI A., SCALA E., PALAZZO P., RIDOLFI S., ZENNARO D., CARABELLA G. (2006): Bioinformatics applied to allergy: Allergen databases, from collecting sequence information to data integration. The Allergome platform as a model. *Cellular Immunology*, 244 (2) 97-100. p.
- MARUYAMA N., ICHISE K., KATSUBE T., KISHIMOTO T., KAWASE S., MATSUMURA Y., TAKEUCHI Y., SAWADA T., UTSUMI S. (1998): Identification of major wheat allergens by means of the Escherichia coli expression system. *European Journal of Biochemistry*, 255 (3) 739-745. p.

- MATSUO H., MORITA E., TATHAM A. S., MORIMOTO K., HORIKAWA T., OSUNA H., IKEZAWA Z., KANEKO S., KOHNO K., DEKIO S. (2004): Identification of the IgE-binding epitope in omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (13) 12135-12140. p.
- MÉNDEZ E., VELA C., IMMER U., JANSSEN F. W. (2005): Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 17 (10) 1053-1063. p.
- MOORE M. M., HEINBOCKEL M., DOCKERY P., ULMER H. M., ARENDT E. K. (2006): Network formation in gluten-free bread with application of transglutaminase. *Cereal Chemistry*, 83 (1) 28-36. p.
- MORITA E., KUNIE K., MATSUO H. (2007): Food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Dermatological Science*, 47 (2) 109-117. p.
- MORITA E., MATSUO H., MIHARA S., MORIMOTO K., SAVAGE A. W. J., TATHAM A. S. (2003): Fast ω -gliadin is a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Dermatological Science*, 33 (2) 99-104. p.
- MORRIS A. (2007): ABC of allergology. *Current Allergy & Clinical Immunology*, 20 (3) 156-157. p.
- MOTHES T., STERN M. (2003): How gluten-free is gluten-free, and what does this mean to coeliac patients? *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 15 (5) 461-463. p.
- MOTOKI M., SEGURO K. (1998): Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9 (5) 204-210. p.
- MSZ 20500/3-1985: Szárzásteszták vizsgálati módszerei: Érzékszervi tulajdonságok vizsgálata. Magyar Élelmiszerkönyv (Codex Alimentarius Hungaricus), Hivatalos Élelmiszervizsgálati módszergyűjtemény.
- MUJOO R., NG P. K. W. (2003): Identification of wheat protein components involved in polymer formation on incubation with transglutaminase. *Cereal Chemistry*, 80 (6) 703-706. p.
- MURAO S., GOTO A., MATSUI Y., OHYAMA K., ARAI M (1981): Isolation of a hog pancreatic α -amylase inhibitor (haim) producing Streptomyces. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45 (11) 2599-2604. p.
- NAKAI S., LEE-CHAN E. (1993): Recent advances in structure and function of food proteins: ASAR approach. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 33 (6) 477-499. p.
- NÉMEDI E., UJHELYI G., GELENCSEÉ. (2007): Detection of gluten contamination with PCR method, *Acta Alimentaria*, 36 (2) 241-248. p.

- ORTOLANI C., PASTORELLO E. A. (2006): Food allergies and food intolerances. *Best Practise & Research Clinical Gastroenterology*, 20 (3) 467-483. p.
- OSBORNE T. B. (1907): The proteins of the wheat kernel. Carneige Institute, Washington D. C.
- OSMAN A. A., UHLIG H. H., VALDES I., AMIN M., MENDEZ E., MOTHES T. (2001): A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 13 (10) 1189-1193. p.
- PALACIN A., QUIRCE S., ARMENTIA A., FERNÁNDEZ-NIETO M., PACIOS L. F., ASENSIO T., SASTRE J., DIAZ-PERALES A., SALCEDO G. (2007): Wheat lipid transfer protein is a major allergen associated with baker's asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120 (5) 1132-1138. p.
- PALOSUO K., VARJONEN E., KEKKI O. M., KLEMOLA T., KALKKINEN N., ALENIOUS H., REUNALA R. (2001): Wheat ω 5-gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108 (4) 634-638. p.
- PASTORELLO E. A., FARIOLI L., CONTI A., PRAVETTONI V., BONOMI S., IAMETTI S., FORTUNATO D., SCIBILIA J., BINDSLEV-JENSEN C., BALLMER-WEBER B., Perrot, C., Guegen, J. (1995): Susceptibility of pea proteins to enzymatic hydrolysis. [346-347. p.] In: Proceedings. 2nd European Conference on Grain Legumes. Copenhagen, Denmark, July 9-13, 1995
- PIETRASIK Z., LI-CHAN E. (2002): Response surface methodology on the effects of sal, microbial transglutaminase and heating temperature on pork batter gel properties. *Food Research International*, 35 (4) 387-396. p.
- POLGÁR M. (2005): A coeliákia és a gabonaallergia jellegzetességei, diagnosztikus és étrendi következményei gyermek és felnőtt korban. 14-18 p. In: BÁNÁTI D. (Szerk.), MOLNÁR I. (Szerk.): *Élelmiszer-biztonság Közlemények II.: Gluténmentes élelmiszerek*. Budapest: Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet (kiadó), Budapest: SZÍN-TECH Kft. (nyomda), 62. p.
- POMÉS A. (2008): Common structures of allergens. *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 48 (3) 139-142. p.
- POMS R. E., ANKLAM E. (2004): Effects of chemical, physical, and technological processes on the nature of food allergens. *Journal of AOAC International*, 87 (6) 1466-1474. p.
- POMS R. E., KLEIN C.L., ANKLAM E. (2004): Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants*, 21 (1) 1-31. p.
- POMS R.E., ANKLAM, E. (2003): Current trends in detecting food allergens. *GIT Laboratory Journal Europe*, 8 (1) 43-46. p.

- POSCH A., WEISS W., WHEELER C., DUNN M. J., GÖRG A. (1995): Sequence analysis of wheat grain allergens separated by two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 16 (7) 1115-1119. p.
- PUSZTAI A., GRANT G., STEWART J. C., WATT W. B. (1988): Isolation of soybean trypsin inhibitors by affinity chromatography on anhydrotrypsin-Sepharose 4B. *Analytical Biochemistry*, 172 (1) 108-112. p.
- RADAUER C., BREITENEDER H. (2007): Evolutionary biology of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120 (3) 518-525. p.
- RASANEN L., LEHTO M., TURJANMAA K., SAVOLAINEN J., REUNALA T. (1994): Allergy to ingested cereals in atopic children. *Allergy*, 49 (10) 871-876. p.
- RASIAH I. A., SUTTON K. H., LOW F. L., LIN H. M., GERRARD J. A. (2005): Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and croissants. *Food Chemistry*, 89 (3) 325-332. p.
- RASMAY, N. M. H., EL SHATANOWI G., AHASSAN K. E. W. (2000): High protein macaroni from legume flours and their protein concentrates. *Annals of Agricultural Science Ain Shams University*, 45 (2) 555-570. p.
- REGENMORTEL M. H. V. (1992): Molecular dissection of protein antigens. In: Regenmortel M. H. V. (ed): Structure of antigens, CRC Press, Boca Raton, 1-27. p.
- RENZETTI S., DAL BELLO F., ARENDT E. K. (2007): Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase. *Journal of Cereal Science*, (article in press)
- RIGHETTI P. G. (1985): Isoelectric focusing: theory, methodology and applications. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
- ROSELL C. M., WANG J., AJA A., BEAN S., LOOKHART G. (2003): Wheat flour protein as affected by transglutaminase and glucose oxidase. *Cereal Chemistry*, 80 (1) 52-55. p.
- ROUGE P., CHATELAIN C., LEMOINE A., PERE D (1977): Précipitation sélective de certaines immunoglobulines G du sérum humain normal par les lectines des graines de Pois (Precipitation of some immunoglobulin G from normal human blood by pea seed lectins.) *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences, Serie D* 285, 471-473. p.
- ROZYNEK P., SANDER I., APPENZELLER U., CRAMERI R., BAUR X., CLARKE B., BRÜNING T., RAULF-HEIMSOTH M. (2002): TPIS- an IgE-binding wheat protein. *Allergy*, 57 (5) 463. p.

- SAMPSON H. A. (2003): Anaphylaxis and emergency treatment. *Pediatrics*, 111 (6 Pt 3) 1601-1608. p.
- SAMPSON H. A. (2004): Update on food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113 (5) 805-819. p.
- SANCHEZ-MONGE R., GARCIA-CASADO G., LOPEZ-OTIN C., ARMENTIA A., SALCEDO G. (1997): Wheat flour peroxidase is a prominent allergen associated with baker's asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, 27 (10) 1130-1137. p.
- SANCHEZ-MONGE R., GARCIA-CASADO G., MALPICA J. M., SALCEDO G. (1996): Inhibitory activities against heterologous alpha-amylases and in vitro allergenic reactivity of Einkorn wheats. *Theoretical and Applied Genetics*, 93 (5-6) 745-750. p.
- SANDIFORD C. P., TATHAM A. S., FIDO R., WELCH J. A., JONES M. G., TEE R. D., SHEWRY P. R., NEWMAN TAYLOR A. J. (1997): Identification of the major water/salt insoluble wheat proteins involved in cereal hypersensitivity. *Clinical and Experimental Allergy*, 27 (10) 1120-1129. p.
- SCHEIN C. H., IVANCIUC O., BRAUN W. (2007): Bioinformatics approaches to classifying allergens and predicting cross-reactivity. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 27 (1) 1-27. p.
- SCHUPPAN D., HAHN E. G. (2002): Biomedicine. Gluten and the gut lessons for immune regulation. *Science*, 297 (5590) 2218-2220. p.
- SKERRITT J. H., HILL A. S. (1990): Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (8) 1771-1778. p.
- SOLAR-RIVAS C., WICHES H. J. (2001): Impact of (bio)chemical and physical procedures on food allergen stability. *Allergy*, 67 (56) 52-55. p.
- SORELL L., LÓPEZ J. A., VALDÉS I., ALFONSO P., CAMAFEITA E., ACEVEDO B., CHIRDO F., GAVILONDO J., MÉNDEZ E. (1998): An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis. *FEBS Letters*, 439 (1-2) 46-50. p.
- STERN M. (2005): A major step towards a practical and meaningful gluten analysis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 17 (5) 523-524. p.
- STORSRUD S., OLSSON M., ARVIDSSON LENNER R., NILSSON L. A., NILSSON O., KILANDER A. (2003): Adult celiac patients do tolerate large amounts of oats. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57 (1) 163-169. p.
- SUPHIOGLU C., BLAHER B., ROLLAND J. M., MCCLUSKEY J., SCHAPPI G., KENRICK J., SINGH M. M., KNOX R. B. (1998): Molecular basis of IgE-recognition of Lol p 5, a major allergen of rye-grass pollen. *Molecular Immunology*, 35 (5) 293-305. p.

- SUTTON R., SKERRIT J. H., BALDO B. A., WRIGLEY C. W. (1984): The diversity of allergens involved in bakers' asthma. *Clinical Allergy*, 14 (1) 93-107. p.
- SVÁB J. (1981): Biometriai módszerek a kutatásban. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó. 557 p.
- TABERLET P., GIELLY L., PAUTOU G., BOUVET J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17 (5) 1105-1109. p.
- TAKIZAWA T., ARAKAWA H., TOKUYAMA K., MORIKAWA A. (2001): Identification of allergen fractions of wheat flour responsible for anaphylactic reactions to wheat products in infants and young children. *International Archives of Allergy and Immunology*, 125 (1) 51-56. p.
- TAYLOR S. L., HEFLE S. L. (2001): Ingredients and labeling issues associated with allergenic foods. *Allergy*, 56 (67) 64-69. p.
- TAYLOR S. L., HEFLE S. L., BINDSLEV-JENSEN C., BOCK S. A., BURKS A. W. JR., CHRISTIE L., HILL D. J., HOST A., HOURIHANE J. O., LACK G., METCALFE D. D., MONERET-VAUTRIN D. A., VADAS P. A., RANCE F., SKRYPEC D. J., TRAUTMAN T. A., YMAN I. M., ZEIGER R. S. (2002): Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109 (1) 24-30. p.
- THOMAS K., HEROUET-GUICHENEY C., LADICS G., BANNON G., COCKBURN A., CREVEL R., FITZPATRICK J., MILLS C., PRIVALLE L., VIETHS S. (2007): Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: International workshop report. *Food and Chemical Toxicology*, 45 (7) 1116-1122. p.
- TIJSSEN P. (1985): Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Practice and theory of enzyme immunoassays. Eds.: BURDON R. H., VAN KNIPPENBERG P. H., Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers Biomedical Division (5 th edition). 549. p.
- TSUJI H., KIMOTO M., NATORI Y. (2001): Allergens in major crops. *Nutrition Research*, 21 (6) 925-934. p.
- VADER W., KOOY Y., VAN VEELEN P., DE RU A., HARRIS D., BENCKHUIJSEN W., PENA S., MEARIN L., DRIJFHOUT J. W., KONING F. (2002): The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology*, 122 (7) 1729-1737. p.
- VALDÉS I., GARCIA E., LLORENTE M., MÉNDEZ E. (2003): Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 15 (5) 465-474. p.

- VAN ECKERT R., BERGHOFFER E., CICLITIRA P. J., CHIRDO F., DENERY-PAPINI S., ELLIS H. J., FERRANTI P., GOODWIN P., IMMER U., MAMONE G., MÉNDEZ E., MOTHES T., NOVALIN S., OSMAN A., RUMBO M., STERN M., THORELL L., WHIM A., WIESER H. (2006): Towards a new gliadin reference material-isolation and characterisation. *Journal of Cereal Science*, 43 (3) 331-341. p.
- VARJONEN E., VAINIO E., KLIMO K., JUNTUNEN-BACKMAN K., SAVOLAINEN J. (1995): Skin-prick test and RAST responses to cereals in children with atopic dermatitis. Characterization of IgE-binding components in wheat and oats by an immunoblotting method. *Clinical and Experimental Allergy*, 25 (11) 1100-1107. p.
- VIETHS S. (1997): Allergenic cross-reactivity, food allergy and pollen. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 4 (1-2) 61-70. p.
- VIETHS S., SCHEURER S., BALLMER-WEBER B. (2002): Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 964 (1) 47-68. p.
- WAGNER S., RADAUER C., HAFNER C., FUCHS H., JENSEN-JAROLIM E., WUTHRICH B., SCHEINER O., BREITENEDER H. (2004): Characterization of cross-reactive bell pepper allergens involved in the latex-fruit syndrome. *Clinical and Experimental Allergy*, 34 (11) 1739-1746. p.
- WALSH B. J., WRIGLEY C. W., MUSK A. W., BALDO B. A. (1985) A comparison of the binding of IgE in the sera of patients with baker's asthma to soluble and insoluble wheat grain proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 76 (1) 23-28. p.
- WANG N., BHIRUD P. R., SOSULSKI F. W., TYLER R. T. (1999): Pasta-like product from pea flour by twin screw extrusion. *Journal of Food Science*, 64 (4) 671-678. p.
- WANG T. L., DOMONEY C., HEDLEY C. L., CASEY R., GRUSAK M. A. (2003): Can we improve the nutritional quality of legume seeds? *Plant Physiology*, 131 (3) 886-891. p.
- WATANABE J, TANABE S., SONOYAMA K., KURODA M, WATANABE M. (2001): IgE-reactive 60 kDa glycoprotein occurring in wheat flour. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 65 (9) 2102-2105. p.
- WATANABE M., SUZUKI T., IKEZAWA Z., AROU S. (1994): Controlled enzymatic treatment of wheat proteins for production of hypoallergenic flour. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58 (2) 388-390. p.
- WATANABE M., TANABE S., SUZUKI T., IZEWAKA Z., ARAI S. (1995): Primary structure of an allergenic peptide occurring in the chymotryptic hydrolysate of gluten. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59 (8) 1596-1597. p.

- WEICHEL M., GLASER A. G., BALLMER-WEBER B. K., SCHMID-GRENDELMEIER P., CRAMERI R. (2006b): Wheat and maize thioredoxins: A novel cross-reactive cereal allergen family related to baker's asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117 (3) 676-681. p.
- WEICHEL M., VERGOOSSEN N. J., BONOMI S., SCHIBILIA J., ORTOLANI C., BALLMER-WEBER B. K., PASTORELLO E. A., CRAMERI R. (2006a): Screening the allergenic repertoires of wheat and maize with sera from double-blind, placebo-controlled food challenge positive patients. *Allergy*, 61 (1) 128-135. p.
- WEISS W., VOGELMEIER C., GÖRG A. (1993): Electrophoretic characterization of wheat grain allergens from different cultivars involved in bakers' asthma. *Electrophoresis*, 14 (1) 805-816. p.
- Wieser H., Kahlenberg F., Kim J. J., Köhler P., Jimenez E., Hernando A., Méndez E., Mothes T. (2005): Is the quantification of gliadins in bread by R5 ELISA affected by the treatment of dough with bacterial transglutaminase? [75-79. p.] In: Proceedings. 20th meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Maikammer, Germany, September 16-18, 2005
- WOODWARD J. (2007): Coeliac disease. *Medicine*, 35 (4) 226-230. p.
www.foodintol.com/celiac.asp
- YAGAMI T. (2002): Features and mode of action of cross-reactive plant allergens relevant to latex-fruit syndrome. *Food and Agricultural Immunology*, 14 (4) 241-253. p.
- YAMASHITA H., KIMOTO M., HIEMORI M., OKITA M., SUZUKI K., TSUJI H. (2001). Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay system for micro-detection of the wheat allergen, Tri a Bd 17K. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 65 (12) 2730-2734. p.
- YAMASHITA H., NANBA Y., ONISHI M., KIMOTO M., HIEMORI M., TSUJI H. (2002): Identification of wheat allergen, Tri a Bd 36K, as a peroxidase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66 (11) 2487-2490. p.
- YOKOYAMA K., NIO N., KIKUCHI Y. (2004): Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64 (4) 447-454. p.
- ZAPATERO L., MARTINEZ M. I., ALONSO E., SALCEDO G., SANCHEZ-MONGE R., BARBER D., LOMBARDERO M. (2003): Oral wheat flour anaphylaxis related to wheat α -amylase inhibitor subunits CM3 and CM16: Wheat α -amylase inhibitor subunits related to food allergy. *Allergy*, 58 (9) 956. p.
- ZHU Y., RINZEMA A., TRAMOER J., BOL J. (1995): Microbial transglutaminase: a review of its production and application in food processing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44 (3-4) 277-282. p.

ZUERCHER A. W., FRITSCHÉ R., CORTHÉSY B., MERCENIER A. (2006): Food products and allergy development, prevention and treatment. *Current Opinion in Biotechnology*, 17 (2) 198-203. p.

Jogszabályok, előírások:

2003/89/EK (2003. november 10.) Az Európai Parlament és a Tanács irányelve a 2000/13/EK irányelv élelmiszer-összetevők feltüntetése tekintetében történő módosításáról

2006/142/EK (2006. december 22.) a 2000/13/EK európai parlamenti és tanácsi irányelvnek az élelmiszerek címkézésén minden körülmények között megjelölendő összetevők listáját tartalmazó III a. melléklete módosításáról

2007/68/EK (XI. 27.) bizonyos élelmiszer összetevők tekintetében a 2000/13/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv IIIa mellékletének módosításáról

19/2004. (II. 26.) FVM-ESZCSM-GKM együttes rendelet az élelmiszerek jelöléséről módosításai:

167/2004. (XI. 29.) FVM-EüM-GKM együttes rendelet

38/2005. (IV. 27.) FVM-EüM-GKM együttes rendelet

90/2005. (X. 13.) FVM-EüM-GKM együttes rendelet

5/2006. (I. 20.) FVM-EüM-ICsSzEM együttes rendelet

86/2007. (VIII.17.) FVM-EüM-SZMM együttes rendelet

40/2008. (IV. 3.) FVM-SZMM együttes rendelet

36/2004 (IV. 26.) ESZCSM rendelet a különleges táplálkozási célú élelmiszerekről módosítása:

12/2007 (III. 6.)

M2. Oldatok, pufferek összetétele

Fehérjefrakciók előállításához használt reagensek (FEILLET et al. 1977):

borát-puffer (pH 10): 0,025 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0,5% SDS, 0,6 % β -merkapto-etanol

Poliklonális ellenanyag alapú ELISA reagensei:

foszfát-puffer (PBS; 0,15 M; pH 7,4): 0,14 M NaCl; 0,0027 M KCl; 0,01645 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,002 M KH_2PO_4

kötőpuffer (karbonát-bikarbonát puffer; 0,05 M; pH 9,6): 0,032 M NaHCO_3 ; 0,018 M Na_2CO_3 ;

mosópuffer (0,15 M; pH 7,4): 0,1% Tween-20 0,15 M foszfát-pufferben

fedőpuffer (0,15 M, pH 7,4): 0,5% zselatin 0,15 M foszfát-pufferben (melegen oldva, majd szobahőmérsékletre hűtve)

szubsztrát-oldat (H_2O_2 /OPD; pH 5,0): 1 db. OPD-tabletta (Sigma) 20 ml desztillált vízben

stop-oldat (inhibitor-oldat): 2 M H_2SO_4 -oldat

Gluten Assay Kit (Tepnel BioKits 802002Y): monoklonális anti- ω -gliadin egér IgG_1 ellenanyaggal érzékenyített mikrotiter lemez, gliadin antigén, különböző mértékben gluténnal szennyezett keményítő kontrollok (alacsony szennyezettség: < 100 $\mu\text{g/g}$ gluténtartalom; közepes szennyezettség: 150-400 $\mu\text{g/g}$ gluténtartalom; magas szennyezettség: >1000 $\mu\text{g/g}$ gluténtartalom), HRPO-enzimmal jelzett monoklonális anti- ω -gliadin egér IgG_1 , TMB (tetrametilbenzidin) kromogén és hidrogénperoxid enzim tartalmú szubsztrát-oldat, mosófolyadék (10x) (nedvesítő reagens- és tartósító tartalmú Trisz puffer), hígítófolyadék (5x) (zselatin- és tartósító tartalmú foszfát-puffer)

4-12%-os gradiens kész gélen történő gélelektroforézis reagensei:

mintaoldó-puffer: 28% LDS-mintaoldó puffer (4x; NuPAGE; Invitrogen), 11% redukáló ágens (10x; NuPAGE; Invitrogen)

futtató-puffer: 5% MES SDS futtató puffer (20x; NuPAGE, Invitrogen). Futtatókád belső része (200 ml): 0,25% antioxidáns reagens (NuPAGE; Invitrogen) futtató pufferben; futtatókád külső része (800 ml): futtatópuffer.

Előszínezett ún. MultiMark Multi-Colored Molecula Standard (Invitrogen): miozin 185 kDa, foszforiláz B 98 kDa, glutaminsav dehidrogenáz 52 kDa, karbonsav anhidráz 31 kDa, mioglobinn vörös 19 kDa, mioglobinn kék 17 kDa, lizozim 11 kDa, aprotinin 6 kDa, inzulin 3 kDa

15%-os öntött gélen történő gélelektroforézis reagensei:

Low Range molekulastandard (BioRad): foszforiláz 100 kDa, marha szérumb albumin 97 kDa, ovalbumin 54 kDa, karbonsav anhidráz 37 kDa, szójabab tripszin inhibitor 29 kDa, α -lactalbumin-20 kDa

mintaoldó-puffer (pH 6,8): 62 mM Trisz; 0,07 M SDS, 87% glicerinn, 10% β -merkapto-etanol

A-oldat: 0,22 M akrilamid (C_3H_5NO), 0,0032 M bisz-akrilamid ($C_7H_{10}N_2O_2$)

B-oldat (pH 8,8): 2 M Trisz-HCl

C-oldat: 0,347 M SDS

E-oldat (pH 6,8): 0,5 M Trisz-HCl

ammónium-perszulfát-oldat: 0,44 M ammónium-perszulfát ($(NH_4)_2S_2O_8$)

15%-os elválasztó gél-oldat, 2 kis gélre: 4 ml A-oldat; 1,8 ml B-oldat; 50 μ l C-oldat; 2,06 ml desztillált víz; 6 μ l TEMED; 50 μ l ammónium-perszulfát-oldat.

6%-os gyűjtőgél, 2 kis gélre: 0,5 ml A-oldat; 27,5 μ l C-oldat; 0,33 ml E-oldat; 1,6 ml desztillált víz; 3 μ l TEMED; 25 μ l ammónium-perszulfát-oldat

Futtató-puffer: 0,025 M Trisz, 0,0035 M SDS, 0,193 M glicin

jelzőfesték: spatulahegynyi brómfenolkék futtatópufferben

10%-os natív poliakrilamid gélen történő elektroforézis reagensei:

futtató-puffer: 0,025 M Trisz, 0,193 M glicin

mintaoldó-puffer: 0,585 M szacharóz ($C_{12}H_{22}O_{11}$) futtató-pufferben

10%-os gél: 2,65 ml A-oldat, 1,8 ml B-oldat, 3,4 ml desztillált víz, 6 μ l TEMED, 50 μ l ammónium-

jelzőfesték: spatulahegynyi brómfenolkék futtató-pufferben

Fehérjedetektálás reagensei:

20% TCA

differentiál-oldat: 10% etil-alkohol (96%-os), 5% ecetsav (96%-os)

Festékoldat: 0,2% Coomassie Brilliant Blue R-250 festék, 9% ecetsav (96%-os), 45% etil-alkohol (Felhasználás előtt 30 percig mágneses keverőn kevertetve)

festékmosó-oldat: 10% ecetsav

Gradiens kész gélről PVDF membránra történő immunblott reagensei:

transzfer-puffer: 5% transzfer puffer (20x; NuPAGE; Invitrogen), 0,1% antioxidáns (NuPAGE; Invitrogen), 10% metanol

15%-os öntött gélről PVDF membránra történő immunblott reagensei:

foszfát-puffer (PBS, 0,15 M, pH 7,4) Lásd ELISA-nál!

anód I.-puffer (pH 10,4): 0,3 M Trisz, 10% metanol

anód II.-puffer (pH 10,4): 25 mM Trisz, 10% metanol

katód-puffer (pH 9,4): 25 mM Trisz bázis, 40 mM glicin, 10% metanol

fedő-puffer: 1% BSA, 0,05% Tween-20 foszfát-pufferben

Transzfer utáni immunreaktív fehérjék detektálásának reagensei:

foszfát-puffer (PBS, 0,15M, pH 7,4) Lásd ELISA-nál!

1.-oldat: 0,4% H_2O_2 -oldat (30%-os) foszfát pufferben

2.-oldat: 1 db. 4-kloro-naftol tabletta (Sigma; 30mg) 10 ml etil-alkoholban

4-kloro-naftol/H₂O₂ szubsztrát-oldat: 1.-oldat + 2.-oldat

Poliklonális ellenanyag előállítás reagensai:

Telített ammónium-szulfát oldat (pH 7,4): 6,06 M (NH₄)₂SO₄ (50°C-on 2 órát kevertetve, melegen szűrve, pH-állítás ammónium-hidroxiddal (30%-os))

Ioncserélő kromatográfia DEAE-cellulóz oszlopon:

DEAE-cellulóz előállítása: 70 g DEAE-cellulózt 1 liter 0,5 M HCl-al szuszpendálva, 30 percig ülepedni hagyni duzzasztása céljából. Eztán Büchner tölcse-re szűrve HCl-oldat eltávolítása, majd desztillált vízzel mosása pH 4-ig. Ezután a cellulóz 1 liter 0,5 M NaOH-oldattal szuszpendálva, 30 percig állni hagyni. Utána NaOH-oldat cellulózzal leöntve, majd desztillált vízzel mosva (kb. 4-5x) pH 7-ig. A cellulózt addig szuszpendálni desztillált vízzel, míg a finom frakciók el nem távolodtak. A leülepedett cellulóz Na-azid tartalmú desztillált vízben tárolva (1:2 arányban).

LC-MS/MS technikával történő fehérjeazonosítás előtti emésztéses művelet reagensai:

0,1 M NH₄HCO₃-puffer

acetonitril-oldat (ACN)

10 mM DTT-oldat (C₄H₁₀O₂S₂) 0,1 M NH₄HCO₃-oldatban

50 mM jódacetamid-oldat 0,1 M NH₄HCO₃-pufferben oldva

tripszin-oldat: 100 µg tripszin (Promega) 200 µl 50 mM ecetsavban oldva, majd 80-szorosra hígítva a „kiszáritott” géldarabokra öntve

5% hangyasav-oldat (HCOOH)

0,1% hangyasav-oldat (HCOOH)

α-amiláz inhibitor aktivitás vizsgálat reagensai (HENSON et al. 1988):

extrakciós-oldat (pH 8,0): 40 mM Trisz, 1 mM CaCl₂

α-amiláz oldat: 0,0025% α-amiláz (Sigma, 1,37 U) extrakciós-oldatban

1% keményítő-oldat: extrakciós-oldatban forralni feloldódásig

kálium-jodid/jód-oldat: 1 mM KI, 0,5 M I₂

α-amiláz inhibitor aktivitás vizsgálat reagensai (MURAO et al. 1981):

0,36 U α-amiláz-oldat: 0,001% α-amiláz porcine pancreas (Sigma; 1,37 U) 5 mM CaCl₂ tartalmú 10 mM Trisz-HCl-pufferben (pH 7,0)

lugol-oldat: 0,04 M KI, 0,013 M I₂

0,005% jóddoldat: 0,5 ml lugol-oldat 33 ml-re hígítva frissen.

Tripszin inhibitor aktivitás vizsgálat reagensai (PUSZTAI et al. 1988):

1.-oldat: 0,3 M Na₂HPO₄ * 12 H₂O

2.-oldat: 0,259 M NaH₂PO₄ * H₂O

foszfát-puffer (0,5 M): 60% 1.-oldat + 40% 2.-oldat

α-kimotripszin-oldat: 74,6 U/mg α-kimotripszin (4 mg), 35 ml foszfát pufferben oldva

A-oldat: 0,0075 M N-acetil-DL-fenil-analin- β -naftil-észter ($C_{21}H_{19}NO_3$), dimetil-formamidban (C_3H_7NO) oldva
oldva

B-oldat: 0,00115 M „tetrazotized” o-dianizidin- $ZnCl_2$ komplex ($C_{14}H_{12}N_4O_2Cl_2 \cdot ZnCl_2$)

festő-oldat: A-oldat és B-oldat összeöntve

leállító-oldat: 1% ecetsav

Pepszines emésztés reagensei (FAO/WHO 2001a):

pepszin-oldat (pH 2,0): 0,32% pepszin, 30 mM NaCl-oldatban

M3. Gabonák és pszeudocereáliák fehérje- és szárazanyagtartalma

Minták	Fehérje-tartalom* (mg/g)	Szárazanyag-tartalom (%)
búza (<i>Triticum aestivum</i>), GK Tisza, 2004	16,50	89,19
búza (<i>Triticum spelta</i>), ÖKO-10, 2004	16,56	89,73
búza (<i>Triticum durum</i>), D-78, 2004	14,37	89,55
búza (<i>Triticum aestivum</i>), GK Cipó, 2004	13,94	89,15
búza (<i>Triticum aestivum</i>), CY-45Q, 2001	18,68	89,08
árpa (<i>Hordeum vulgare</i>), tavaszi, STC I. 22-03.,2004	14,80	89,65
árpa (<i>Hordeum vulgare</i>), őszi, GK Rezi, 2004	15,13	89,88
árpa (<i>Hordeum vulgare</i>), őszi, GK Rezi, 2005	12,79	89,37
csupasz árpa (<i>Hordeum nuda</i>), őszi, C3/05, 2005	14,32	89,52
csupasz árpa (<i>Hordeum nuda</i>), őszi, GK Árpád, 2005	11,97	89,45
rozs (<i>Secale cereale</i>), Amilo, 2004	9,36	89,07
rozs (<i>Secale cereale</i>), Rapid, 2004	9,16	89,21
rozs (<i>Secale cereale</i>), őszi, GK Wibro, 2004	10,36	89,24
rozs (<i>Secale cereale</i>), Matador, 2004	8,99	89,42
rozs (<i>Secale cereale</i>), Gamet, 2004	8,03	89,31
tritikálé (<i>Triticosecale</i> sp.), tavaszi, Kargo, 2004	10,82	89,66
tritikálé (<i>Triticosecale</i> sp.), tavaszi, EMBR 18, 2004	12,61	88,89
tritikálé (<i>Triticosecale</i> sp.), tavaszi, GK korai, 2004	12,90	89,00
tritikálé (<i>Triticosecale</i> sp.), tavaszi, Wanad, 2004	11,39	89,62
tritikálé (<i>Triticosecale</i> sp.), tavaszi, GK Idus, 2004	13,85	89,68
csupasz zab (<i>Avena nuda</i>), tavaszi, GK Zalán, 2004	12,24	89,66
zab (<i>Avena sativa</i>), tavaszi, GK Iringó, 2004	12,61	89,77
zab (<i>Avena. sativa</i>), őszi, GK Impala, 2004	12,09	89,99
zab (<i>Avena sativa</i>), tavaszi, GK Kormorán, 2005	10,94	89,65
zab (<i>Avena sativa</i>), tavaszi, GK Pillangó, 2005	11,45	89,38
kukorica (<i>Zea mays</i>), Sze TC 269, 2004	7,42	89,44
kukorica (<i>Zea mays</i>), Ella SC, 2004	8,03	89,35
kukorica (<i>Zea mays</i>), Sze SC 352, 2004	7,08	89,68
kukorica (<i>Zea mays</i>), Bella TC, 2004	8,69	89,68
kukorica (<i>Zea mays</i>), Veronica SC, 2004	7,61	89,31
rizs (<i>Oryza sativa</i>), Janka, 2003	8,21	89,44
rizs (<i>Oryza sativa</i>), Bioryza, 2003	6,00	89,53
rizs (<i>Oryza sativa</i>), Risabell, 2003	6,40	89,94
rizs (<i>Oryza sativa</i>), Ábel, 2003	7,34	89,18
rizs (<i>Oryza sativa</i>), Oryzella, 2003	6,51	89,45
amaránt (<i>Amaranthus moleros</i>), GK Róza, 2003	22,18	89,88
amaránt (<i>Amaranthus cruentus</i>), GK Maros, 2005	22,70	90,10
amaránt (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>), Edit, 2004	15,25	89,72
hajdina (<i>Fagopyrum esculentum</i>), Hajnalka, 2004	11,33	88,85
hajdina (<i>Fagopyrum esculentum</i>), 430 törzs, 2003	11,75	88,52
hajdina (<i>Fagopyrum esculentum</i>), P425 törzs, 2004	14,94	89,22
hajdina (<i>Fagopyrum esculentum</i>), P427 törzs, 2004	13,64	89,26
hajdina (<i>Fagopyrum esculentum</i>), P429 törzs, 2004	13,88	89,35
<i>Triticum aestivum</i> tészta liszt	11,83	88,35
<i>Triticum durum</i> tészta liszt	15,23	89,42
<i>Pisum sativum</i> sárgaborsó liszt	18,51	89,84

M4. Humán szérumok fehérjékkel szembeni immunreaktivitása immunblott alapján

Gabonaallergiás humán szérumok (IgE-reaktivitás)								
	1. sz.		2. sz.		3. sz.		4. sz.	
	Búza	Ker/nem-ker.	Búza	Ker/nem-ker.	Búza	Ker/nem-ker.	Búza	Ker/nem-ker.
Víz/sóoldható frakcióban IgE-reaktív fehérjesáv	+	+	+	+	/	+(csak rozs, tritikálé, zab, amaránt, hajdina)	+(csak búza2-nél)	-
Alkohololdható frakcióban IgE-reaktív fehérjesáv	-	+(csak zab, kukorica)	-	+	/	-	-	+(csak zab, kukorica)
Cöliakiás humán szérumok (IgA-reaktivitás)								
	1. sz.		2. sz.		3. sz.		4. sz.	
	Búza	Ker/nem-ker.	Búza	Ker/nem-ker.	Búza	Ker/nem-ker.	Búza	Ker/nem-ker.
Víz/sóoldható frakcióban IgA-reaktív fehérjesáv	+	+	/	+	/	+	/	+
Alkohololdható frakcióban IgA-reaktív fehérjesáv	+	+	/	+	/	+	/	+(csak keresztreagálók, kukorica)
Cöliakiás humán szérumok (IgA-reaktivitás)								
	5. sz.		6. sz.		7. sz.		8. sz.	
	Búza	Ker/nem-ker.	Búza	Ker/nem-ker.	Búza	Ker/nem-ker.	Búza	Ker/nem-ker.
Víz/sóoldható frakcióban IgA-reaktív fehérjesáv	/	+	/	+	/	+	+	+(csak rozs, tritikálé)
Alkohololdható frakcióban IgA-reaktív fehérjesáv	/	+(csak kukoricánál)	/	+	/	+	+	+

+: reaktív fehérjesáv található az immunblotton

-: reaktív fehérjesáv nem található az immunblotton

/: nem-vizsgált

Ker: búzával keresztreagáló gabonák

Nem-ker: búzával nem-keresztreagáló gabonák/pszeudocereáliák

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom **Dr. Bánáti Diánának**, a KÉKI főigazgatónöjének, aki a PhD értekezésem elkészítését kezdeményezte, mindvégig támogatta, és hogy nagy bizalommal és szeretettel volt mindig is irántam.

Köszönöm **Dr. Gelencsér Évának**, a KÉKI Élelmiszer-biztonsági Főosztály vezetőjének, a Biológia Osztály osztályvezetőjének, egyben témavezetőmnek, hogy kezdetektől fogva, bizalmába fogadva lehetőséget adott pályakezdőként a kutatási munkámban való elinduláshoz. Köszönöm ezúton azt is, hogy mindig hitt bennem és mind a munkámban, mind a PhD tanulmányaimban szakmai segítségével, tanácsaival- és baráti szeretetével, türelmével támogatott.

Köszönöm **Dr. Kovács Erzsébetnek**, a Szegedi Tudományegyetem, Mérnöki Kar, Élelmiszermérnöki Intézet egyetemi tanárának a munkám során nyújtott szakmai útmutatásait, baráti szeretetét.

Köszönöm **Dr. Szamos Jenőnek**, a KÉKI tudományos főmunkatársának, hogy felhívta a figyelmemet a kromatográfiás fehérje elválasztásra, és hogy ebben a témakörben a kísérleti munkámat kezdeményezte. Köszönöm ezúton még a rengeteg szakmai és baráti segítségét is.

Köszönöm **Dr. Janáky Tamásnak, Szeliné Szomor Juditnak, Csorba Attilának** (Szegedi Tudomány Egyetem Orvosi Vegytani Intézet) a fehérjék adatbázis alapján történő azonosítását és az eredmények kiértékelésében való segítségüket.

Külön köszönettel tartozom **Kissné Valentin Évának, Molnár Mihálynének, Háderné Súlyom Katalinnak, Horváthné dr. Szanics Enikőnek, Gyebróczi Józsefnek** a laborban és állatházban nyújtott segítségükért, gyakorlati tanácsaikért.

Köszönetemet fejezem ki a **Biológia Osztály minden egyes munkatársainak és az intézeti kollegáknak** baráti segítőkészségükért, valamint a biztatásukért. Köszönöm, hogy a munkával töltött órákat kellemessé tették, melyek nem csak eredményesek, hanem emlékek is maradnak.

Végül köszönetemet fejezem ki **Dr. Polgár Mariannak** (Heim Pál Kórház Gasztroenterológiai Intézet), **Léder Ferencnének** (KÉKI), **Szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht.-nak, Klorofill Bt.-nek, Dunakenyér Sütőipari és Kereskedelmi Rt.-nek, Dél Gabona Rt.-nek, Agrimill-Agrimpex Rt.-nek** a kísérleteimhez biztosított vizsgálati mintákért.

Köszönöm **családom, minden kedves rokon és barát** türelmét és támogatását, belém vetett hitét, nélkülük nem sikerült volna célom elérése.