



**Doktori értekezés tézisei**

**FŐBB GABONA ALLERGÉNEK IMMUNANALITIKAI KIMUTATÁSA**

**Takács Krisztina**

**Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet**

**Biológia Osztály**

**Budapest  
2008**

## **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

## 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 cöliakiás 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 az alkohololdható gliadinok ( $\alpha$  és  $\omega 5$ ), a vízzoldható  $\alpha$ -amiláz inhibitorok (CM3, 0.53) és a nem-specifikus lipid transzfer fehérjék. Ezen komponensek a tünetek széles skáláját okozhatják. Az érzékenyítés történhet légzőrendszeren, vagy tápcsatornán keresztül. A cöliákia esetében a toxikus allergén faktorok a búza gliadinok és a gliadinokkal azonos szerkezettel rendelkező prolaminek (rozs szekalin, árpa hordein, zab avenin), melyek főként bélboholy elváltozást okozhatnak. Mindkét betegségnél az egyetlen gyógymód a tüneteket kiváltó allergének és intolerancia faktorok elkerülése, vagyis kizárólag 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 alapon nyugvó vizsgálatuk. Ez nem könnyű feladat, hisz a betegekben előforduló klinikai tünetek és a tüneteket kiváltó búza allergének heterogenitása nagymértékben megnehezítik ezeket a vizsgálatokat.

Az allergének megismerése, aktivitásuk -, epitópjaik - és hatásmechanizmusuk meghatározása megkívánja, hogy módszereket dolgozzunk ki az allergének élelmiszerekben való jelenlétének detektálására, illetve koncentrációjuk meghatározására.

A gluténérzékeny betegek számára az élelmiszerek gluténmentességének vizsgálatára több ilyen módszer is létezik, mint például a gliadin-specifikus poliklonális -, az  $\omega$ -gliadin-specifikus monoklonális - és a gliadin-epitóp (R5)-specifikus monoklonális ellenanyag alapú ELISA módszerek, illetve gyorsmódszerek. Ezen módszerek kimutatási határértékének a Codex szerint minimum 10 ppm-nek kell lennie (gluténre vonatkoztatva). Felmerülhet az a kérdés, hogy vajon melyik módszer alkalmas erre a legjobban, hiszen mindegyik módszer másra specifikus, más az érzékenysége, és mindegyiknek más a protokollja. A fent említett megoldandó kérdések végett szükség van mélyrehatóbban foglalkozni a glutén megbízható és reprodukálható kimutathatóságával.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

- Cöliákia és gabonaallergia szempontjából jelentős táplálék allergének összehasonlító vizsgálata a hazai köztermesztésben lévő gabonák és pszeudocereáliák bázisán.
- Immunanalitikai módszerek alkalmazhatóságának vizsgálata glutén kimutatás 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.

## 3. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

### 3.1. Gabonák és pszeudocereáliák, valamint modell minták

- Hazai köztermesztésben lévő gabonák (5-5 fajta búza, rozs, árpa, tritikálé, zab, kukorica, rizs) és pszeudocereáliák (3 fajta amaránt, 5 fajta hajdina), amelyeket a Gabonatermesztési Kutató Kht. és a Klorofill Bt. bocsátott rendelkezésemre.
- Gluténmentes kenyér alapanyagok (rizsliszt, kukoricakeményítő, burgonyapehely, tojáspor, élesztő, kész kenyérpor), glutén szennyezést előidéző alapanyagok (búzaliszt, rozsliszt), kontroll kenyérminták (házi jellegű fehérkenyér, rozskenyér, gluténmentes kenyér), gluténmentes kenyér gyártása során három kiválasztott kontaminációs ponton (dagasztótál, sütőforma, szárítóhelység) búza-/rozsliszttel szennyezett tíz kenyérmodell, amelyeket a Dunakenyér Sütőipari és Kereskedelmi Rt. biztosított.
- Különböző koncentrációban használt transzglutamináz enzimmel (0-200 mg TG/kg liszt) előállított *T. aestivum* és *T. durum* búzaliszt – és sárgaborsóliszt alapú száraztészta modellek, lisztalapanyagaik, amelyek a Szegedi Tudományegyetem Mérnöki Karának Élelmiszermérnöki Intézetéből származtak.
- Egyedi anonim, klinikailag igazolt cöliakiás és gabonaallergiás humán szérumok, amelyek a Heim Pál Gyermekkorház Gasztroenterológia II. szérumbankjából származtak.

### 3.2. Fehérjefrakciók és modell minták előállítására alkalmazott módszerek

- A hazai köztermesztésben lévő gabonák és pszeudocereáliák víz/só- és alkohololdható frakciójának előállítására 50 mM Trisz-HCl pufferes (pH 8,5), illetve 70% etanolos extrakciót alkalmaztam.

- A búzaminták esetében DEAE-cellulóz anioncserélő kromatográfiai eljárást alkalmaztam az  $\alpha$ -amiláz inhibitorban dús fehérjefrakcióinak előállítására.
- A transzglutamináz enzimmel kezelt tészták esetében a 0,5 M NaCl-oldatos (pH 6,8), illetve 68% etanolos, majd  $\beta$ -merkaptó-etanol tartalmú borát-pufferes extrakciót alkalmaztam a víz/só -, illetve az alkohol -, majd a sav/lúgoldható frakciójának előállítására.
- SDS-PAGE és immunblott kombinációját az allergén fehérjék detektálására alkalmaztam. Az immunblotthoz antigén-specifikus poliklonális ellenanyagot, cöliákiás (IgA) és gabonaallergiás (IgE) humán szérumot használtam.
- Glutén kimutatására különböző (poliklonális, monoklonális  $\omega$ -gliadin, monoklonális R5) ellenanyag alapú módszereket alkalmaztam.
- Folyadékkromatográfias-tandem tömegspektrometriás (LC-MS/MS) módszert és NCBI Inr Plant adatbázist használtam az allergén fehérjék azonosítására.
- Az allergén fehérjék pepszinnel szembeni rezisztencia vizsgálatát PVDF membránra blottolt fehérjéken végeztem.
- A búzaliszt/rozsliszttel való szennyezést gluténmentes kenyérgyártásnál kiválasztott kritikus kontaminációs pontokon (dagasztótál, sütőforma, szárítóhelység) valósítottam meg.
- Transzglutamináz enzimet alkalmaztam a búza – és sárgaborsóliszt alapú száraztészta modellek előállítására.

#### 4. EREDMÉNYEK

- A hazai köztermesztésben lévő búzafajtákban IgE- és IgA-reaktív fehérjéket mutattam ki gabonaallergiás és cöliákiás betegszérumok felhasználásával.
- Hazai köztermesztésben lévő gabonákban/pszeudocereáliákban (tritikálé, rozs, árpa, zab, kukorica, rizs/amaránt, hajdina) lévő, búzafehérjékkel keresztreaktív fehérjék jelenlétét mutattam ki immunblottal gabonaallergiás és cöliákiás humán szérumok felhasználásával.
- Az IgE-reaktív fehérjék pepszinnel szembeni rezisztencia vizsgálatára kifejlesztett új immunblott módszerrel is bizonyítottam az allergén fehérjék stabilitását.
- Gabonaallergiás betegszérumokkal leggyakrabban felismert, főbb gabona allergéneket azonosítottam SDS-PAGE szeparálást követő LC-MS/MS vizsgálatok alapján NCBI Inr Plant adatbázisból történő azonosítással.
- Különböző specificitású ellenanyagokra alapozott ELISA módszerek alkalmazhatóságának modellvizsgálatában (gabonák és pszeudocereáliák, kenyér és száraztészta modellek) megállapítottam, hogy a gliadin-specifikus poliklonális ellenanyag alapú ELISA

alkalmasnak bizonyult >200 ppm gliadin kvantitatív mérésére is, míg az  $\omega$ -gliadin-specifikus és az R5-gliadin-epitóp specifikus monoklonális ellenanyag alapú ELISA csak a nyomokban (<200 ppm) jelenlévő gliadin meghatározására volt alkalmazható. A kimutatás érzékenysége a technológiai kezelés (enzim, hőkezelés) hatására csökkent. Mivel a fenti módszerek a gliadin kimutatására alkalmasak, ezért csak közvetetten alkalmazhatók a gluténtartalom tényleges meghatározására.

- Gluténmentes diétába illeszthető száraztészta modelltermék fejlesztése során rámutattam, hogy búzaliszt esetén a transzglutamináz enzim alkalmazása lényegesen nem csökkenti a gliadin-specifikus ellenanyagokkal felismerhető fehérjék mennyiségét, míg a sárgaborsóliszt esetében keresztreaktivitás nem volt tapasztalható.

## 5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Az ismert fő gabona allergének közül a búza víz- és sóoldható frakciójában szeparált  $\alpha$ -amiláz inhibitorok koncentrálására szelektív és reprodukálható eljárást fejlesztettem ki DEAE-cellulóz ioncserélő kromatográfia alkalmazásával.
- A hazai köztermesztésben lévő búzafajták  $\alpha$ -amiláz inhibitorokban koncentrált frakcióiban, a gabonaallergiás humán szérumok többségével szemben IgE-reaktív fehérjéket LC-MS/MS technika és NCBI Inr Plant allergén adatbázis segítségével azonosítottam. A több peptid által beazonosított allergén fehérjék között xilanáz inhibitor prekursor, xilanáz inhibitor,  $\alpha$ -amiláz inhibitor (monomer, dimer, CM17 fehérje prekursor), szerpin, tritin, GSP1 fehérje, 5a2 fehérje, LTP1 prekursor, nsLTP prekursor,  $\beta$ -amiláz, mangánáz-szuperoxid dizmutáz, peroxidáz és egy kukorica ubiquitin-nel hasonló búzafehérje szerepelt. Az egy peptidtalát 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  $\alpha$ -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, a kukorica, 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  $\alpha$ -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 élelmiszer-mátrixokban 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.

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ TARTOZÓ PUBLIKÁCIÓK

### Publikáció folyóiratban:

#### IF-os folyóirat cikk:

**TAKÁCS K., NÉMEDI E., MÁRTA D., GELENCSÉR É., KOVÁCS E. T.** (2007): Use of the enzyme transglutaminase for developing glutenfree noodle products from pea flour. *Acta Alimentaria*, 36 (2) 195-205. p.

**TAKÁCS K., GELENCSÉR É., KOVÁCS E. T.** (2008): Effect of transglutaminase on the quality of wheat based pasta products. *European Food Research and Technology*, 226 (3) 603-611. p.

**NAGY A., PAUK J., TAKÁCS K., GELENCSÉR É.** (2008): Nutritional evaluation of the proteins of broad range herbicide resistant spring wheat (*Triticum aestivum* L.). lines II. Resistance to digestion of marker proteins in rat model. *Acta Alimentaria*, 37 (2) 159-166. p.

#### Nem IF-os folyóirat cikk:

**TAKÁCS K., NÉMEDI E., GELENCSÉR É.** (2005): Fehérje és DNS alapú glutén kimutatási módszerek. (Gluténmentes élelmiszerek fogyasztói megítélésének aktuális kérdései” c. tudományos szimpózium – Budapest, 2005. március 9.- előadásainak átdolgozott anyaga). *Élelmiszer-biztonsági Közlemények II.*, ISBN 963 7358 08 0: 24-32. p.

### Publikáció konferencia kiadványban:

#### Magyar nyelvű (teljes):

**TAKÁCS K., GELENCSÉR É., KOVÁCS E. T.** (2004): Transzglutamináz enzimmel módosított búza alapú tészta antigénitásának változásai. *VI. Nemzetközi Élelmiszertudományi Konferencia. Szeged, 2004. május 20-21., Proceeding CD-formában, ISBN: 963-482-6768, 91. sorszám*

**KOVÁCS E. T., GELENCSÉR É., TAKÁCS K.** (2004): Transzglutamináz enzim alkalmazása búza alapú hypoallergén tészta termékek előállítására. *VI. Nemzetközi Élelmiszertudományi Konferencia. Szeged, 2004. május 20-21., Proceeding CD formában, ISBN: 963-482-6768, 60. sorszám*

**NÉMEDI E., TAKÁCS K., UJHELYI G., GELENCSÉR, É.**, (2006): Glutén kontamináció vizsgálatára szolgáló alternatív módszer optimalizálása és alkalmazási lehetőségei. *VII. Nemzetközi Élelmiszertudományi Konferencia. Szeged, 2006. április 20. Proceeding CD formában (ISBN 963 482 577 X).* 18. p.



### **Magyar nyelvű (összefoglaló):**

KOVÁCS E. T., TAKÁCS K., GELENCSÉR É. (2004): Transzglutamináz alkalmazási lehetősége minőségi száraztészták előállítására. *317. Tudományos Kollokvium -Szeged, 2004. október 7.- előadások rövid kivonata 289. füzet 5.p.*

KOVÁCS E. T., TAKÁCS K., GELENCSÉR É. (2005): Transzglutamináz enzim alkalmazási lehetősége minőségi száraztészták előállítására. *Élelmezési ipar LIX. Évfolyam 2005. 1. szám 14. p.*

TAKÁCS K., GELENCSÉR É., NÉMEDI E., KOVÁCS E. T. (2005): Fehérje alapon történő nagy érzékenyséű glutén kimutatási technikák. *Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Tudományos Ülésszak (minőségbiztosítás és táplálkozás szekció) –Budapest, 2005. október 19-21.- összefoglalója. 234. p.*

NÉMEDI E., TAKÁCS K., GELENCSÉR É. (2005): Búzával keresztreagáló gabonák PCR alapú vizsgálati módszerének megbízhatósága. *Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Tudományos Ülésszak (minőségbiztosítás és táplálkozás szekció) –Budapest, 2005. október 19-21.- összefoglalója. 216. p.*

TAKÁCS K., NAGY A., SZANICS E., HALÁSZ Á., GELENCSÉR É. (2007): Gabonaallergének kimutatása és immunreaktivitásuk vizsgálata. *Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXXII. Vándorgyűlése -Kecskemét, 2007. október 18-20. - összefoglalója. 31. p.*

MÁRTA D., TAKÁCS K., GELENCSÉR É. (2007): Enzimjelzéses immunanalitikai módszerek alkalmazása gabona allergének kimutatására élelmiszerekben. *Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Tudományos Ülésszak (élelmiszerbiztonság, mikrobiológia és biotechnológia szekció) – Budapest, 2007. november 7-8.- összefoglalója. 72-73. p.*

### **Nemzetközi konferencia (teljes):**

KOVÁCS E. T., GELENCSÉR É., TAKÁCS K. (2003): Use of transglutaminase enzyme for producing hypoallergenic pasta products. *4<sup>th</sup> Croatia Congress of Cereal Technologists -Opatija, Croatia, November 19-22., 2003.- Proceedings of International Congress FLOUR-BREAD '03., ISBN:953-7005-04-6. 283-288. p.*

NÉMEDI E., TAKÁCS K., UJHELYI G., GELENCSÉR É. (2006): Adaptation and optimalization of an alternative method for gluten detection, 7th International Conference on Food Science; electronical proceeding: SZTE SZÉF ISBN 963 482 577 X

### **Nemzetközi konferencia (összefoglaló):**

**TAKÁCS K.,** NAGY A., GELENCSÉR É. (2003): The extend of the gut resisitance of wheat germ agglutinin. *The SAFE Consortium: FOSARE Seminar Series 2. "Food allergy and intolerance, including to predict allergenicity" Conference -19-20. June., 2003., Brussels, Belgium- Book of abstracts* 35. p.

**TAKÁCS K.,** NAGY A., NÉMEDI E., POLGÁR M., GELENCSÉR É. (2004): Gut resistance of WGA and the IgE-binding epitopes of the wheat albumine-globuline. *9th International Symposium on Immunological, Chemical and Clinical Problems of FOOD ALLERGY - 18-21. April, 2004., Budapest, Hungary- Book of abstracts, Poster No. 39, 140. p.*

GELENCSÉR É., **TAKÁCS K.,** KOVÁCS E. T. (2004): ELISA based detection of food allergens. *3rd AOAC Europe -Eurachem Symposium, Legal limits on the road to food safety: establishing sound criteria for compliance decisions., 3-4. March, 2005., Brussels, Belgium- Book of Abstracts Eds. B. Kortsen and M. Lauwaars. 89. p.*

**TAKÁCS K.,** GELENCSÉR É., KOVÁCS E. T. (2004): Changes of the antigenic properties of transglutaminase enzyme modified wheat based pasta products. *2<sup>nd</sup> Central European Congress on Food. -April, 26-28. 2004., Budapest- Book of abstracts, No. P-S-39, 207. p.*

**TAKÁCS K.,** GELENCSÉR É., KOVÁCS E.T. , POLGÁR M. (2005): Comparing different methods for determiantion of gliadin in transglutaminase enzyme modified wheat based pasta products. *4<sup>th</sup> European Young Cereal Scientists and Technologists Workshop -June 29-July 1., 2005.,Vienna, Austria- Book of Abstracts: No. P.16, 63. p.*

**TAKÁCS K.,** NAGY A., MÁRTA D., PAUK J., GELENCSÉR É. (2006): Quantification of three major allergen factors of wheat. *The SAFE Consortium International Congress on Food Safety. First International Congress, Nutrition and Food Safety: Evaluation of Benefits and Risks -11-14. June 2006., Budapest, Hungary- Book of abstracts: No. 5-9., 98. p.*

NÉMEDI E., **TAKÁCS K.,** GELENCSÉR É. (2006): Adaptation of a special DNA-based gluten detection method in bakery industry. *The SAFE Consortium International Congress on Food Safety. First International Congress, Nutrition and Food Safety: Evaluation of Benefits and Risks -11-14. June 2006., Budapest, Hungary- Book of abstracts: No. 2-23., 50. p.*

NÉMEDI E., **TAKÁCS K.,** UJHELYI G., GELENCSÉR É. (2006): Verification of the presence of wheat cross-reacting cereals by novel PCR method. *1st EurChem Congress -27-31. August, 2006., Budapest, Hungary- Abstract book: 212. p.*

GELENCSÉR É., POLGÁR M., HAJÓS GY., **TAKÁCS K.** (2007): Food allergy to proteins and cross-reactivities. 3<sup>rd</sup> Congress of Slovenian Nutrition Society, 3<sup>rd</sup> Slovenian Congress on Food and Nutrition under title „Food processing-innovation-nutrition-healthy consumers”-23-36. *September, 2007., Radenci, Slovenija- Abstract book*: 128. p.