

MEGHÍVÓ

A BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM

ÉLELMISZERTUDOMÁNYI

DOKTORI ISKOLÁJA

meghívja Önt

NÉMEDI ERZSÉBET

**„Molekuláris biológiai módszerek fejlesztése
gluténmentesség ellenőrzésére”**

című PhD értekezésének

2009. május 19-én de. 9.00 órakor

tartandó nyilvános vitájára.

Témavezetők: Dr. Gelencsér Éva

**Helyszín: Budapesti Corvinus Egyetem,
1118 Bp. Villányi út 35-43. TUDÁSKÖZPONT- ELŐADÓTEREM
G épület, alagsor 2. ajtó**

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG :

Elnöke:

Farkas József, MHAS

Tagjai:

Hoschke Ágoston, CSc

Biacs Péter, DSc

Figler Mária, PhD

Polgár Marianne, PhD

Opponensei:

Maráz Anna, CSc

Kiss Erzsébet, CSc

Titkár: Kiskó Gabriella, PhD

Az értekezés megtekinthető

a Budapesti Corvinus Egyetem Budai Entz Ferenc Könyvtárában és Levéltárban
(Budapest, XI., Villányi út 35-43. K. ép. I. em.),
elektronikus változata a <http://phd.lib.uni-corvinus.hu/354/> címen

*A nyilvános vitában minden jelenlévő részt vehet
és írásban előzetesen is észrevételt tehet.*

Dr. Fodor Péter sk
egyetemi tanár
Doktori Iskola Vezetője

NÉMEDI ERZSÉBET

„Molekuláris biológiai módszerek fejlesztése gluténmentesség ellenőrzésére”

ÖSSZEFOGLALÁS

A glutén szenzitív enteropátia lényege, hogy az érintett páciensben egyes gabonafélék (búza, árpa, rozs, tritikálé, zab(?)) prolaminjai a vékonybél bolyhainak sorvadását, deformálódását idézik elő. Megfelelő haárérték hiányában csakis ezen prolaminek teljes kizárása az étrendből teheti a betegeket tünetmentessé. Habár a zabról manapság úgy tartják, hogy talán nem ártalmas, mégis jelentős probléma a zab búzával való szennyeződése, tehát még szerepel a tiltólistán. Az élelmiszerek keresztszennyeződése és az akaratlan diétahibák sem ritkák, ezért érthető, hogy az allergén-jelenlét címkén történő feltüntetése kötelező. Ilyen megfontolásból a fehérje alapú (ELISA) direkt vizsgálatokon kívül kifejlesztésre kerültek DNS alapú, indirektnek mondható kontamináció szűrésére alkalmas módszerek is. Feldolgozott élelmiszerek esetében a fehérje olyan konformációt vehet fel, amely megnehezítheti a kioldódását, így módosíthatja a fehérje alapú mérésekkel kapott mennyiségi eredményt. A PCR módszeren alapuló DNS vizsgálat nem helyettesíti a fehérje módszereket, inkább megerősítésre, ellenőrzésre szolgál, viszont elég bizonyítékot nyújt arra, hogy az adott élelmiszer valamikor búzával vagy vele keresztreagáló gabonával szennyeződött, illetve kiválóan alkalmas az esetleges keresztszennyeződések kiszűrésére.

4 primer pár tesztelésére került sor a kísérletek során: az A49855 és B49317 kloroplasztisz DNS primer párt, a TR01/TR02 búzaspecifikus primer párt, egy glutenin specifikus mikroszatellit (P1/P2) primer párt és végül egy WBR11/WBR13 nevű primer párt alkalmaztam. Ez utóbbi esetben termékanalízis céljából PCR-RFLP vizsgálat is történt. Különböző búzafajták, száraztészta, főtt tészták, hőkezelt kenyerek, keresztreagáló (rozs, árpa, zab(?), tritikálé) és nem keresztreagáló gabonafélék (kukorica, rizs), pszeudocereáliák (hajdina, amaránt) szolgáltak mintaként.

A DNS minták tisztasága és sokszorozhatósága bizonyítást nyert egyrészt az R értékek meghatározásával, majd a B49317/A49855 növény-specifikus kloroplasztisz primer pár alkalmazásával. Ezen kívül ez az amplifikálási lépés alkalmasnak bizonyult élelmiszerekben megtalálható gabonafélék előszelektálására is. A TR01/TR02 primer pár alapú rendszerrel egy konzervatív búza amplikont detektáltam, majd bizonyítottam, hogy a búzán kívül nem mérhető vele más gabonaféle. A DNS extraktum búza eredetének igazolására azonban megbízható választ adott még erősen hőkezelt minták esetében is a mérések során. A P1/P2 primer párt a glutenint kódoló génrészlet jelenlétének kimutatására használtam. Ezzel a primer párral detektálhatóvá vált a búza és a vele keresztreakciót mutató tritikálé. Az amaránt a búzáéhoz közeli mérettartományban eső jelet adott, ezért nem javasolt a negatív kontrollként való alkalmazása. Végül a búza, a rozs és az árpa szelektív kimutatására adaptált WBR11/WBR13 nevű primer párról bebizonyosodott, hogy tritikálé kimutatására szintén alkalmas. A szekvencia pontosabb azonosíthatósága érdekében az ezen primerrel kapott DNS szakaszokat *Alu1* és *BsmA1* restrikciós endonukleázokkal hasítottam, így az eredményeket PCR-RFLP módszer segítségével pontosítottam.

Optimálás után további mintákon teszteltem a kifejlesztett módszereket: gluténmentes kenyeret sütő üzemben vett mintákon és gluténmentesnek szánt sárgaborsó tészta mintákon. Egy gluténmentes kenyeret gyártó üzemi technológia esetében vizsgáltam a nyersanyagokat az esetleges tárolási hibák kiszűrése végett, majd mesterséges szennyezést (először búzalisztet, majd rozslisztet) iktattam be a technológiai folyamatok három fontos pontján (a dagasztási eljárás, a sütés és a kenyerek szárítása során). Eredményeim összegzése során arra a következtetésre jutottam, hogy búza specifikus PCR a nyersanyagban is megtalálta a nyomokban jelen lévő kontamináns tiltott gabonaféle, a búza DNS részletét. Ez a szennyezettség a végtermékben is kimutatható volt. Más módszerek esetében, mint a búza, rozs és árpa szelektív kimutatására adaptált WBR11/WBR13 technikánál megállapítható volt, hogy a két leginkább szennyeződésnek kitett pont a technológia során a dagasztó tisztasága és a nagy nedvességtartalmú kenyerek 24 órás szárítása volt.

Tovább teszteltem a módszereket gluténmentes élelmiszernek szánt, sárgaborsó lisztből készült száraztésztaikon. Eredményként azt állapítottam meg, hogy a pozitív jeleket a sárgaborsó lisztben és tésztában, nyomokban jelen lévő búza eredetű szennyeződés okozta. Ezt a kontaminációt a sárgaborsó nem megfelelő őrlési körülményei, vagy a kereskedelemben kapható sárgaborsó liszt nem megfelelő kezelése, tárolása okozhatta.