



A kép illusztráció / Picture is for illustration only

Török Kitti¹, Schall Eszter¹, Hajas Lívia¹, Bugyi Zsuzsanna¹, Tömösközi Sándor¹

Érkezett: 2016. március – Elfogadva: 2016. június

A túlérzékenységi reakciókat kiváltó fehérjék viselkedése élelmiszerfeldolgozási folyamatok során

1. Összefoglalás

Mivel a túlérzékenységi reakciókat (allergia, cöliákia) kiváltó komponensek általában fehérjék, ezért ezek esetleges változásainak megismerése élelmiszerbiztonsági szempontból fontos téma. Amennyiben a fehérjék a feldolgozás során különböző szerkezeti módosulásokon esnek át, az élelmiszerekből történő meghatározásuk akadályokba ütközhet. Ha a módosult fehérjék a rendelkezésre álló analitikai módszerekkel különböző eredményt adnak, nem feltétlenül jelenti azt, hogy a szervezetben is eltérően viselkednek. E témával kapcsolatosan felmerülő kérdések megválaszolása a betegek, a klinikusok és az analitikusok együttműködését igényli.

A végső fogyasztásra szánt élelmiszerek számos feldolgozási folyamaton esnek át a nyersanyagtól a végtermékig. Minden olyan hatás, amely megváltoztatja a fehérjék szerkezetét, várhatóan befolyásolja azok ellenanyagokhoz történő kötődését is. Az élelmiszerfeldolgozási folyamatok számos olyan fizikai, kémiai és biokémiai változást okoznak, amelyek hatással lehetnek egy fehérje allergén tulajdonságaira. A feldolgozás növelheti, csökkentheti vagy változatlanul hagyhatja a fehérjék allergén hatását a fehérje tulajdonságaitól, a feldolgozási művelet típusától, időtartamától és intenzitásától, illetve a mátrixtól függően.

A jelenleg rutin módszerként használt ELISA tesztek eltérő antitesteket alkalmazhatnak, így az immunreakciókban megcélzott epitópok is különbözőek lehetnek. A különböző epitópok pedig más-más módosulásokon eshetnek át az élelmiszerek feldolgozása során, ezért az antitesthez való affinitásuk is változhat, ami hatással van a módszer által szolgáltatott eredményekre. Ez arra a tényre hívja fel a figyelmet, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható tesztek alkalmazása során részben eltérő eredményeket kaphatunk, tehát az immunanalitikai módszerek fejlesztése és harmonizálása egyaránt szükségesszerű.

2. Bevezetés

Az élelmiszerekkel szemben jelentkező túlérzékenységi reakciók komoly élelmiszerbiztonsági problémát jelentenek. A nem toxikus reakciók legnagyobb hányadéért nyolc élelmiszerösszetevő a felelős: a glutén (siker), a rákfélékből előállított alapanyagok, a tojás, a halhús-féleségek, a földimogyoró, a szója, a tej és a diófélékből készített termékek. Emellett az EU-ban hat másik túlérzékenységi reakciót kiváltó komponens (zeller, mustár, szezám, csillagfürt, puhatestűek, kén-dioxid) jelölése is kötelező az élelmi-

szerek csomagolásán [1]. A rendellenességeket – a kén-dioxid kivételével – az adott élelmiszer fehérje-komponensei váltják ki. Mindegyik élelmiszeralkotóról elmondható, hogy igen változatos fehérje-összetétellel rendelkezik, és több olyan fehérjét tartalmaz, amelyekben megtalálhatók a túlérzékenységi reakciót kiváltó, speciális aminosav-sorrenddel rendelkező szakaszok, ún. epitópok is.

Jellemzően élelmiszerek útján kerülnek a szervezetbe a reakciókat kiváltó fehérjék, amelyek változatos összetételű mátrixok lehetnek, és számos, illetve sokféle

¹ Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék, Gabonatudományi és Élelmiszerminőség Kutatócsoport

feldolgozási folyamaton esnek át. E hatások következtében a fehérjék denaturálódhatnak, ami a legtöbb esetben intra- vagy intermolekuláris kölcsönhatásokra vezethető vissza, és amelynek során összetételi és szerkezeti változások állnak elő. Mindezek hatással lehetnek a fehérjék szerkezetére és viselkedésére, valamint a reakciót kiváltó építőpokra is. A jelenlegi szakirodalom azonban nem egységes ebben a témában. A reakciót kiváltó fehérjék száma, az egyes fehérjék építőp szekvenciái, valamint a fehérjék viselkedése egyaránt a vitatott kérdések körébe tartozik.

Az érintett fogyasztók biztonsága érdekében elengedhetetlen a megbízható analitikai módszerek fejlesztése és alkalmazása. A fehérjék változásai hatással lehetnek az analitikai meghatározást megelőző mintaelőkészítés – benne az extrakció – hatékonyságára, valamint befolyásolhatják az eredmények pontosságát és precizitását. Így szükségeszerű a fehérjék mind jobb megismerése, mind viselkedésük tanulmányozása.

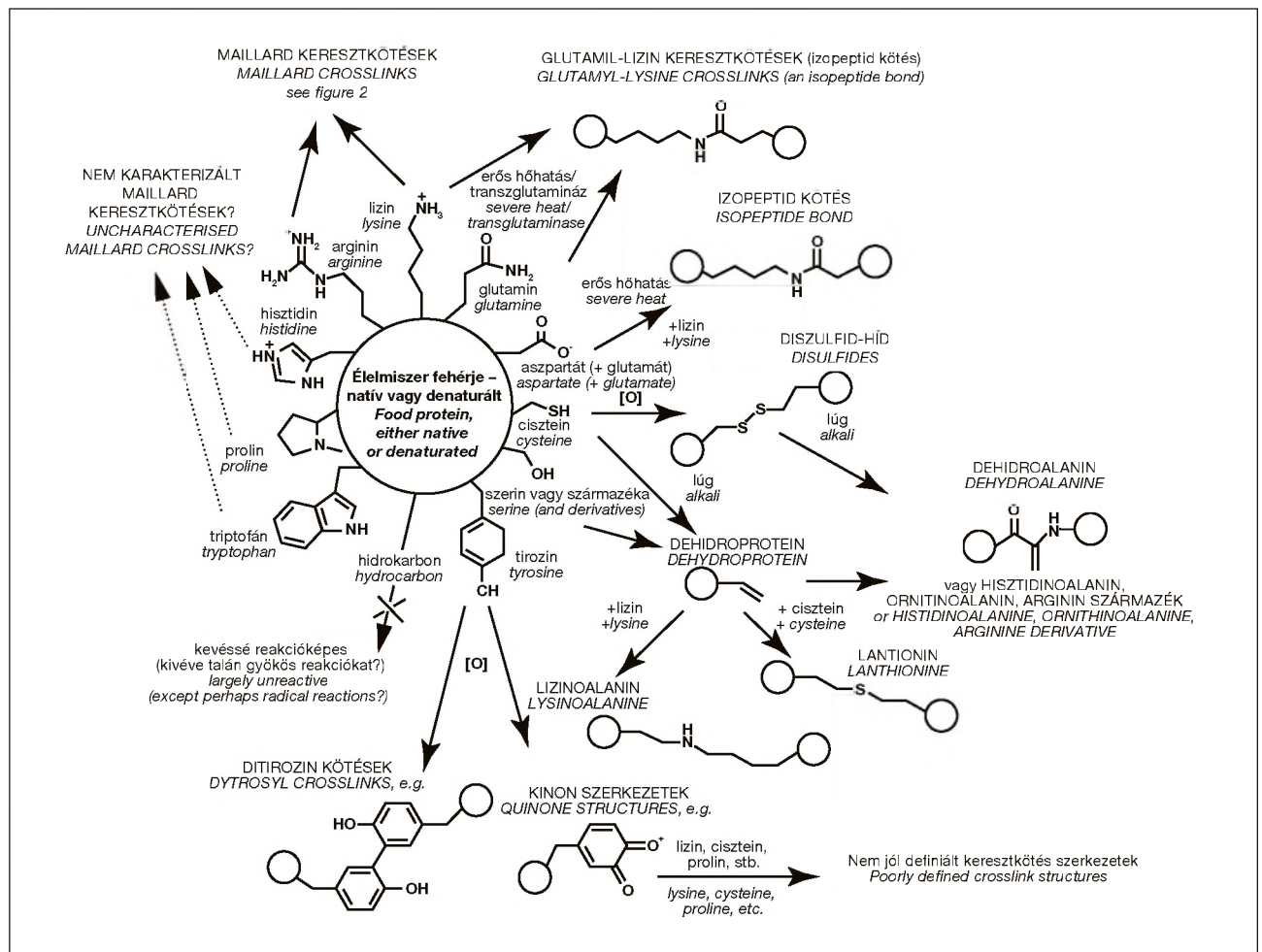
3. A túlérzékenységi reakciókat kiváltó fehérjék és változásaik

A fehérjék reakciókészségét számos tényező befolyásolhatja, melyek közül a legfontosabb az elsődleges szerkezet. Az aminosav összetétel és sorrend értelemszerűen meghatározza a reaktív csoportok

típusát és arányát. A hidrofób aminosavak felelnek a fehérje konformációjáért, a hidratációért, befolyásolják az oldhatóságot és a géllépző tulajdonságokat is. A töltéssel rendelkező aminosavak képesek elektrosztatikus kölcsönhatások létrehozására, valamint hatással vannak a fehérjék vízkötő képességére. A kölcsönhatások létrejöttét befolyásolja továbbá a fehérje mérete, alakja és töltéseloszlása is. A reakciók kialakulása az élelmiszerek feldolgozása során alkalmazott körülmények (hőmérséklet, pH, enzimek jelenléte, stb.) között valósulhat meg [2], [3].

A legkritikusabb és a leggyakrabban alkalmazott technológiai lépés a különböző intenzitású (idejű, hőmérsékletű, dinamikájú) hőkezelés. A hőkezelés 55-70°C-on a másodlagos szerkezet elvesztését eredményezi, 70-80°C-on felhasadnak a diszulfid kötések, 80-90°C-nál új intra- és intermolekuláris kölcsönhatások alakulnak ki, míg 90-100°C-on kialakulnak a fehérje aggregátumok [4]. A hőkezelés hatására az adott fehérjemolekulán belül intramolekuláris, vagy a fehérjemolekulák között intermolekuláris kölcsönhatások jöhetnek létre (1. ábra) kovalens vagy nem kovalens kötésekkel.

Fehérjemolekulák között leggyakrabban inter- és intramolekuláris diszulfidkötések jönnek létre a ciszteinek szabad tiolszoportjainak kapcsolódása révén.



1. ábra. A fehérjék feldolgozás hatására bekövetkező reakciói [2]
Figure 1. Reactions of proteins due to processing [2]

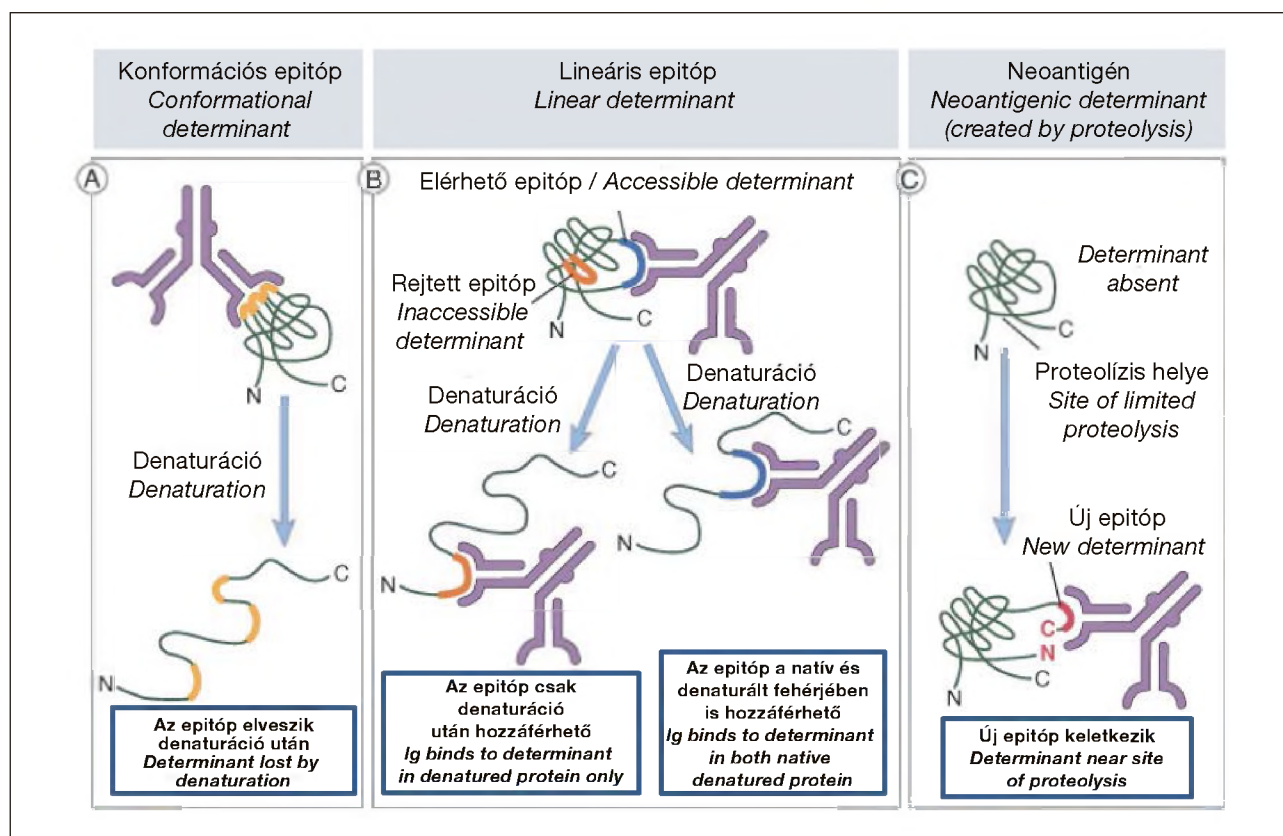
A kénatomok közötti kötések nagyban hozzájárulnak a fehérjék hőstabilitásához. A lúgos körülmények között véghezvitt hőkezelés az aminosavak racemizációjával járhat, így dehidroproteinek keletkeznek, amelyek rendkívül reaktívak, a cisztein tiol csoportjával, valamint a lizin ϵ -amino csoportjával kapcsolódnak. A tirozin aminosavak bizonyos körülmények között képesek ditirozin kötések létrehozására. Emellett közvetve a polifenol-oxidáz is eredményezhet fehérje-kölcsönhatásokat a cisztein, tirozin vagy lizin valamint a fenolok oxidációjából származó reaktív benzokinon között. A hőkezelés és a transzglutamináz enzim együttes hatására a glutamin γ -karboxiamid csoportja és a lizin ϵ -amino csoportja között létrejöhethet glutamil-lizin kötés, amely az izopeptid kötések egy fajtája. Továbbá kis szénhidrát-tartalmú élelmiszerekben hő hatására egyéb izopeptid kötések is létrejöhetnek a lizin ϵ -amino csoportja és az aszparagin vagy a glutamin amid csoportja között [2], [5].

A fehérje-nem fehérje kölcsönhatások leggyakoribb résztvevői a szénhidrátok és a lipidek, ugyanakkor kialakulhatnak kölcsönhatások az élelmiszer mátrix egyéb makro- és mikro-komponenseivel is. A Maillard-reakció a fehérje egy aminjának és egy karbonil csoportnak a reakciója, utóbbi származhat redukáló cukorból vagy zsír bomlástermékekből. Emellett polisacharidok lokális dipólusainak és a fehérjék töltött ionjainak reakciója következtében gyenge komplexek jöhetnek létre. Fehérjék és lipidek között számos kölcsönhatás kialakulása lehetséges: elektrosztatikus kölcsönhatások jöhetnek létre egy foszfolipid pozití-

van töltött csoportja és egy fehérje negatívan töltött csoportja vagy egy foszfolipid negatívan töltött foszfát csoportja és egy fehérje pozitívan töltött csoportja között; oxidált lipidek és fehérjék között kovalens kölcsönhatások kialakulása jellemző, emellett a zsírsavak hidrogén- és hidrofób kötést is kialakíthatnak fehérjékkel [2], [6].

4. A reakciókat kiváltó epitópok

A túlérzékenységi reakciókat kiváltó fehérjék kötődése az immunrendszer ellenanyagaihoz az epitópokon keresztül megy végbe. Az epitópok a fehérje rövid peptid fragmentumai, amelyeket az antitest felismer. A túlérzékenységi reakciókat kiváltó fehérjék szinte mindegyikéről elmondható, hogy több epitópot tartalmaznak. Bizonyos egyének esetén azonban nem mindegyik, illetve nem mindegyik azonos mértékben váltja ki az immunválaszt. Azokat az epitópokat, melyeket az immunrendszer a legkönnyebben felismer, illetve a legintenzívebb válaszreakciót váltják ki, immundomináns epitópoknak nevezzük. Az epitópok szerkezetét tekintve léteznek lineáris (12-18 aminosav hosszúságú) epitópok, amelyeknél a fehérje elsődleges szerkezete határozza meg a reaktív szakaszt. Ugyanakkor beszélhetünk konformációs epitópokról is, amelyek a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezete révén alakulnak ki. A fehérjék térszerkezetéből adódóan az egyes epitópok elhelyezkedhetnek az ellenanyaghoz hozzáférhetően, de rejtetten is [7].



2. ábra. A feldolgozási folyamatok hatása az allergén epitópokra [7]
Figure 2. The effect of processing steps on allergenic epitopes [7]

A fehérjékben a feldolgozás hatására bekövetkező változások természetesen hatással lehetnek az epitópok szerkezetére és hozzáférhetőségére is. A lineáris epitópok nagyobb valószínűséggel változnak meg hidrolizált állapotban, míg a konformációs epitópok sokkal érzékenyebbek a feldolgozás során előálló változásokra. A denaturáció hatására elveszhetnek epitópok, ugyanakkor a rejtett struktúrák elérhetővé válhatnak, továbbá a fehérje elsődleges szerkezetében bekövetkező változások új epitópok létrejöttét eredményezhetik (2. ábra) [7], [8].

Az egyes fehérjék, illetve epitópjaik azonosításáról, viselkedéséről, allergénaktivitásáról jelenleg rendelkezésre álló szakirodalmi információk hiányosak és sok esetben ellentmondásosak. A következőkben néhány gyakran előforduló rendellenességért felelős élelmiszer fehérje (tejfehérjék, tojásfehérjék, szójafehérjék, gliadin) jellemző változásait tekintjük át.

4.1. Az allergiát kiváltó tejfehérjék és stabilitásuk

A tej esetében a túlérzékenységi reakció kiváltásában az α -laktalbumin (ALA), a β -laktoglobulin (BLG), a marha szérum albumin (BSA), a laktoferrin, az immunoglobulinok és a kazeinek vesznek részt, a legtöbb tanulmány azonban azt mutatja, hogy a fő allergének a kazeinek, a BLG és az ALA [9].

Hőkezelés hatására a tejfehérjék oldhatósága csökken a kialakuló aggregátumok következtében. A savófehérjék globuláris szerkezetűek, érzékenyek a hőre, denaturálódnak, majd peptidjeikre esnek szét, amit aggregátumok képződése követ. A β -laktoglobulin és az α -laktalbumin a κ -kazeinnel is képes ko-

valens kötés létrehozására. A szérum albumin csak korlátozottan aggregálódik, azonban hő hatására glikolizálódik, ami konformáció változást eredményez. A kazeinek hőstabilitása lényegesen magasabb – az α_s és β -kazeinek a legstabilabbak – ugyanakkor proteáz enzimek gyorsan képesek lebontani azokat. A kazeinek jelenléte gátolja továbbá más fehérjék aggregációját [10], [11].

A főzés szignifikánsan csökkenti vagy akár meg is szünteti a β -laktoglobulin és a szérum albumin allergénaktivitását, csökkenti továbbá az ALA és a kazeinek IgE-kötő képességét is. Több tanulmány bizonyította azonban már, hogy a kazeinek nem veszítik el antigenitásukat hő hatására. A savófehérjék képesek szénhidrátokkal konjugálódni, ami csökkenti az α -laktalbumin és a β -laktoglobulin allergénitását [10].

4.2. Tojásfehérje-allergének és jellemző változásai

A tojásallergiát kiváltó fehérjék a tojásfehérjében (ovomukoid, ovalbumin, ovotranszferrin, lizozim, ovomucin) és a tojássárgájában (lipovitellinek, foszvitin, α -livetin, apovitellenin I, apovitellenin VI) egyaránt találhatóak, a fő allergének azonban a tojásfehérje összetevői [12].

Az ovalbumin (OVA) kevésbé hőstabil fehérje, hő hatására denaturálódik, majd aggregálódik. Az aggregátumokat diszulfid kötések tartják össze, dimer, oligomer és polimer formában is előfordulnak, monomer OVA kevés marad. Az ovalbumin képes a sikkfehérjékkel komplexet kialakítani, valamint szénhidrátokkal – redukáló cukrokkal a Maillard-reakción keresztül – konjugálódni. Utóbbi hatása vitatott, bizo-



A kép illusztráció / Picture is for illustration only

nyos tanulmányok szerint a konjugálódás növeli, míg mások szerint csökkenti az ovalbumin denaturációs hőmérsékletét. Ezzel szemben az ovomukoid (OM) hőtűrő fehérje, melyet kén-kén kötések stabilizálnak. Koagulációra nem hajlamos, valamint a denaturáló ágenseknek is ellenáll, ugyanakkor hő hatására intermolekuláris kötések létrehozására képes, például komplex mátrixok esetén a tej szérum albumin fehérjéjével. Az ovotranszferrin igen hőlabilis, a másodlagos szerkezet módosulása már 80°C-on bekövetkezik, dimer formájú aggregátumok képződnek. A vastranszportban szerepet játszó fehérje ugyanakkor hőtűrő komplexet képez a szállított fémionokkal. A hőkezelés mértékével és idejével oldhatósága irreverzibilisen csökken [13], [14].

A tojásfehérjék allergénitásának hőhatásra bekövetkező változását illetően még sok a bizonytalanság, a tudomány egyelőre adós a téma részletes kutatásával. Az ovalbuminról és az ovomukoidról megállapították, hogy poliszacharidokkal komplexet képeznek, amelyet nem kovalens kötőerők tartanak össze. Ebben a komplexált állapotban az IgE-kötő képességük növekedést mutat a natív fehérjékhez képest. Ugyanakkor az ovomukoid esetében tojás és búza együttes jelenlétében csökkent allergénitás figyelhető meg, melyet az OM és a búzafhérjék intermolekuláris diszulfid hidak által stabilizált komplexének tulajdonítanak [14].

4.3. Allergén szójafehérjék és változásaik

A szója allergén fehérjéit tagláló irodalmak tartalmukban sok helyen eltérő véleményt fogalmazznak meg. Összességében 16 és 33 közöttire tehető az allergénként azonosított szójafehérjék száma, a legfontosabb allergén frakciók – glicinin, β -konglicinin, profilin, P34, Kunitz tripszin inhibitor (KTI) – azonban jól ismertek [15].

A szójafehérjék denaturációs hőmérséklete erősen függ a pH-tól és az ionerősségtől. Hőkezelés során a glicinin több lépésben aggregálódik, elsőként alegységeire bomlik, majd a savas és bázikus peptideket összetartó kén-kén kötések szakadnak fel. Ezt követően oldható aggregátumok keletkeznek, savas polipeptidek azonban változatlanok maradnak. A β -konglicinin különböző alegységei különböző hőtűrő képességgel bírnak, az α' és a β alegység a stabilabb. Hő hatására a másodlagos szerkezet módosul, oldható aggregátumok képződnek, amelyeket nem kovalens kötőerők tartanak össze. Emellett a glicinin és a β -konglicinin egymással is képes aggregátumok létrehozására. A profilin, a P34 és a KTI hőlabilis fehérjék. A profilin másodlagos szerkezete módosul, aggregátumok képződnek, ugyanakkor a pH csökkentésével a stabilitás nő. A P34 fehérje kénhidakkal kötődik a 7S globulinokhoz. A Kunitz tripszin inhibitor 90°C-on már irreverzibilisen denaturálódik, majd diszulfid hidakkal és/vagy nem kovalens kötésekkel aggregálódik [16], [17].

A hőkezelés immunaktivitásra gyakorolt hatásáról kevés információ áll rendelkezésre. Elmondható azonban, hogy a Maillard-reakció általi glikolízis csökkenti a szójafehérjék antigenitását [18].

4.4. A túlérzékenységi reakciókat kiváltó búzafhérjék és stabilitásuk

A búza fehérjéi a klasszikus allergia mellett kiválthatnak ún. búzafüggő mozgás indukálta anafilaxiát, amely a búzafhérjéket tartalmazó étel elfogyasztása és az azt követő intenzív mozgás együttese esetén jelentkezik. Továbbá egyes búzafhérjék cöliákiát (lisztérzékenység) kiváltó szekvenciákat is tartalmaznak. A cöliákia genetikai alapon provokációra kialakuló autoimmun enteropátia, amely a vékonybél bolyhainak pusztulásával, a kripták hiperpláziájával, limfociták beszűrődéssel jár [19], [20].

Búzaallergénként azonosítottak az α -amiláz inhibitor családba tartozó fehérjéket, a QQPPP szekvenciával rendelkező LMW glutenin alegységet, α - és β -gliadinokat, lipid transzfer proteinek, profilin fehérjéket valamint az albumin/globulin frakció egyes fehérjéit. A cöliákia kialakulásáért elsősorban a gliadin és glutenin fehérjék felelősek, immundomináns epitópként az $\alpha 2$ -gliadinban található 33 aminosavból álló szekvenciát (57-89) azonosították. Emellett azonban számos más fehérje epitóp is kiválthatja a rendellenességet [5], [20].

A búza albumin és globulin fehérjéi néhány kivételtől eltekintve hőlabilisak, másodlagos szerkezetük módosul hőkezelés hatására. Ezzel szemben a tartalékfehérjék, illetve az α -amiláz inhibitor hőstabilak. Az α -, β - és γ -gliadinok oldhatósága a hőmérséklet növelésével csökken, mivel a cisztein aminosavak révén diszulfid kötések létrehozására képesek egymással és a glutenin fehérjékkel, mely változatos méretű aggregátumokat eredményez. A gluteninek emellett egyéb intermolekuláris kölcsönhatásokban is részt vehetnek (pl. izopeptid kötések, β -elimináció). Elmondható továbbá, hogy az izopeptid kötések száma a hőkezelés idejével nő [21], [22].

Sütés hatására az α -amiláz inhibitor IgE-kötő aktivitása megszűnik, míg a prolaminoké nem. A legtöbb allergén epitóp stabil marad a kenyérsütés során, sőt néhány fehérjéről kimutatatták, hogy hőkezelés hatására ellenállóbbá válik a pepszinnel történő emésztéssel szemben [5].

5. A fehérjék kémiai és szerkezeti változásának hatása az immunanalitikai eredmények alakulására

A számos rendelkezésre álló analitikai módszer közül élelmiszerallergének kimutatására és mennyiségi meghatározására leggyakrabban immunanalitikai módszereket (ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, LFD: Lateral Flow Devices) alkalmaznak nagyfokú specifitásuk és érzékenységük miatt. A mátrix-komponensekkel kialakuló reakciók valamint az élelmiszer-feldolgozás hatására bekövetkező ké-

miai változások befolyásolhatják a fehérjék szerkezetét, így az analitikai módszerek eredményeire is hatással lehetnek [23].

Kutatásaink során vizsgáltuk a feldolgozási folyamatok hatását az analitikai eredményre tej-, tojás-, szója- és búzafehérjék esetében. A kísérletekhez ismert adott allergéntartalmú, de részben különböző összetevőket tartalmazó modellmátrixokat (porkeveréket, tésztát és süteményt) dolgoztunk ki, és vizsgáltuk, hogy a feldolgozás egyes lépései milyen mértékben befolyásolják az analitikai eredményeket. A jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható ELISA tesztek különböző vagy részben különböző mintaelőkészítési módszertant alkalmaznak, valamint a célfehérje is különböző lehet, így az alkalmazott antitest más és más. Ez okokból kifolyólag kerestük a választ arra a kérdésre is, hogy a különböző kitek alkalmazása hatással van-e az analitikai eredményre. Így az ELISA méréseket két gyártó tesztjeivel végeztük el mind a négy vizsgált komponens esetében: az R-Biopharmtól a Ridascreeen Fast Milk, Fast Egg, Fast Soya, Gliadin kiteket, a Romerlabs-tól pedig az AgraQuant Casein, Egg white, Soy, Gluten teszteseteket használtuk a kísérleteinkben. (Mivel nem célunk a gyártók minősítése, az egyes gyártók tesztjeire A és B jelzéssel hivatkozunk.)

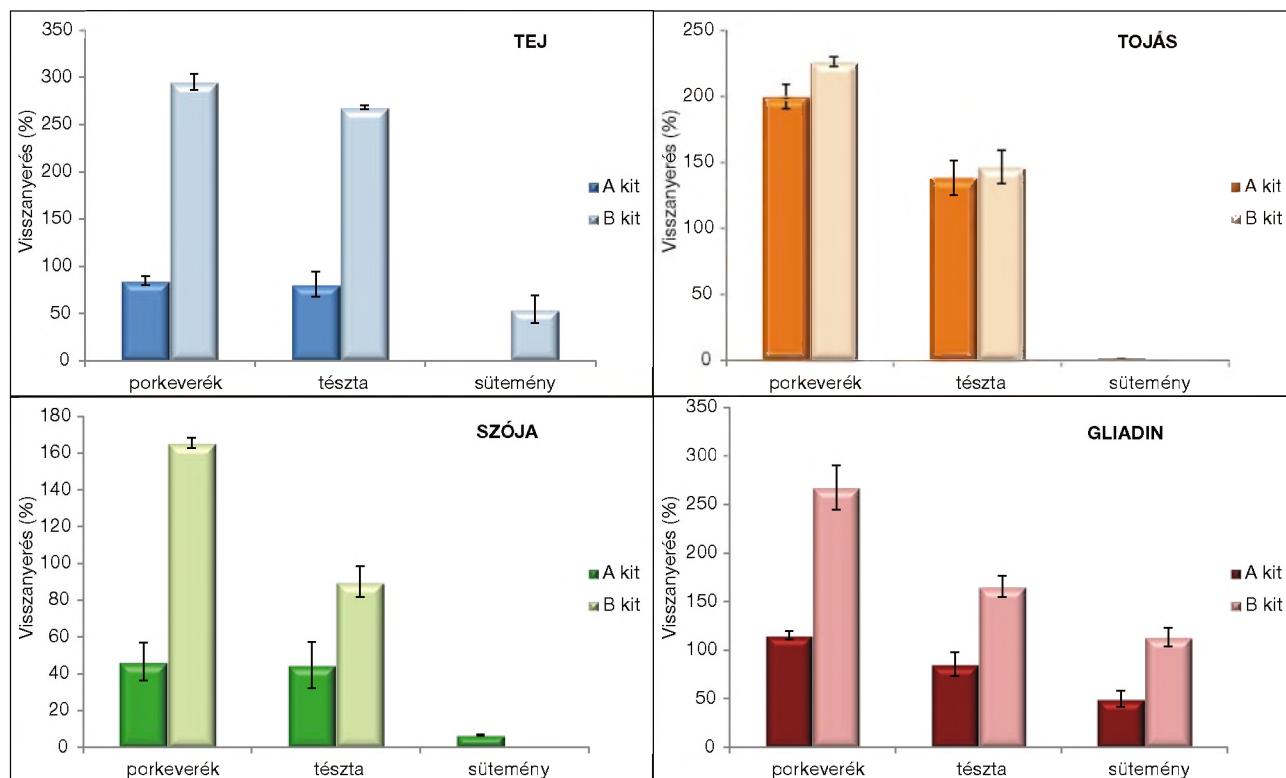
A feldolgozási folyamatok ELISA eredményekre gyakorolt hatásairól általánosságban elmondható, hogy a porkeverékhez képest csak kis csökkenés tapasztalható a nyers tészták esetében, ezzel szemben a hőkezelés után nagyon nagymértékű csökkenés figyelhető meg a mérhető koncentrációban (3. ábra).

A tapasztalt különbségek szinte minden esetben szignifikánsak.

A nyers tészta esetén mérhető koncentrációcsökkenés mértéke a legtöbb esetben magyarázható a hozzáadott víz és margarin hígító hatásával, ám néhány esetben (például a szója tartalmú modelltermékek B kittel történő mérése esetén) ennél nagyobb mértékű csökkenés tapasztalható. Megfigyelhető továbbá, hogy a tej, tojás és szója tartalmú modelltermékek-nél a süteményekben visszamérhető allergén fehérjetartalom 60% alatt van, és több esetben az adott ELISA teszt kimutatási határát sem éri el.

A két ELISA kit egyidejű alkalmazása a feldolgozási lépések mellett lehetőséget biztosított a választott módszer analitikai eredményt befolyásoló hatásának vizsgálatára is. Mind a négy vizsgált komponens esetén megfigyelhető, hogy a „B” gyártó tesztjei által szolgáltatott eredmények meghaladták az „A” kitek eredményeit, és a tapasztalt különbség a legtöbb esetben szignifikáns. Ugyanakkor az elméleti koncentrációtól való eltérést vizsgálva megállapítható, hogy az „A” teszteset által kapott visszanyerés százalékok közelebb esnek a 100%-hoz, ám attól általában még így is szignifikánsan eltérnek. Az eltérés irányára azonban tendencia nem állítható fel egyik gyártó tesztje esetében sem.

Az élelmiszer-feldolgozási folyamat ELISA eredményt befolyásoló hatásai lényegében mindenütt tapasztalhatók, ám a vizsgált fehérjeforrások hőstabilitásának függvényében a hatás más és más. A feldolgozási folyamatok esetében értelemszerűen a



3. ábra. A feldolgozási folyamatok ELISA eredményekre gyakorolt hatása
 Figure 3. Effects of processing operations on ELISA results

hőkezelésnek van nagyobb hatása és elsősorban a mérés pontosságát (visszanyerési százalékot) befolyásolja szignifikánsan és egyértelműen. A jelenség háttérben döntően – részben a gliadin kivételével – nem (csak) fehérje-fehérje kölcsönhatások, hanem fehérje-nem fehérje komponensek közötti reakciók állnak, amelyek alapvetően a célfehérjék oldhatóságát változtatják meg. Tehát elsősorban a lejátszódó reakciókat, képződő termékeket kell azonosítanunk, és ezt követően kell megoldást találni a hőkezelt mintamatrixok hatékony fehérje-extrakciójára. Sajnos azt kell megállapítanunk, hogy a jelenleg alkalmazott mintaelőkészítő lépések mellett a forgalomban lévő egyes ELISA kitek csak jelentős mértékű hibával képesek hőkezelt termékek esetében analitikai eredmény szolgáltatására. Minden vizsgált komponens esetében megfigyelhető, hogy a különböző ELISA kitek más-más eredményeket szolgáltatnak. Ugyanazon minta vizsgálata során nagymértékű különbségek tapasztalhatók már a natív fehérjét tartalmazó modell-termékek visszanyerés-értékeiben is, ugyanakkor precizitásuk kielégítőnek mondható. Az egyes gyártók ELISA tesztjeinek mintaelőkészítési protokolljai, célfehérjei és analitikai teljesítményjellemzői között jelentős eltérések lehetnek. A mérés pontosságát befolyásoló tényezők statisztikai értékelése alapján megállapítható, hogy a használt ELISA kit és a feldolgozottság szintje van a legnagyobb hatással a mérhető eredményre mind a négy vizsgált komponens esetében.

Mindezen eredmények felhívják a figyelmet a mátrixhatás jelentőségére, az e mögött álló jelenségek tisztázásának fontosságára, és ezek felhasználásával az immunanalitikai módszerek továbbfejlesztésének és harmonizálásának szükségességére.

6. Következtetések

Minden vizsgált túlérzékenységi reakciót kiváltó komponens esetében azonosíthatóak a feldolgozási folyamat analitikai eredményekre gyakorolt hatásai. Munkánk során a pontosság és a precizitás, mint

teljesítményjellemző változását tanulmányoztuk. A vizsgált fehérjeforrások esetében azonos matrixokat használva eltérő mértékű változást azonosítottunk, de az alkalmazott technológiai lépések kedvezőtlen hatása minden célfehérje csoport esetében tetten érhető volt. A feldolgozási folyamatok esetében értelemszerűen a hőkezelésnek van nagyobb hatása, és elsősorban a mérés pontosságát befolyásolja szignifikánsan és egyértelműen. A jelenség háttérben döntően nem (csak) fehérje-fehérje kölcsönhatások, hanem fehérje-nem fehérje komponensek közötti reakciók is állnak, amelyek valószínűleg elsősorban a célfehérjék oldhatóságát változtatják meg. Tehát elsősorban a lejátszódó reakciókat, képződő termékeket kell azonosítanunk, és ezt követően kell megoldást találni a hőkezelt mintamatrixok fehérje-extrakciójára. A jelenleg alkalmazott redukáló szerves mintaelőkészítés, illetve detergens alkalmazása nem minden esetben tűnik kielégítőnek. Ez alól részben kivételt képeznek a kevésbé hőérzékeny gluténfehérjék, amelyek esetében a kénhidak képződése meghatározó kísérő jelensége a hőkezelésnek. A jelenleg hozzáférhető ELISA módszerek alkalmazása tehát feldolgozott termékek esetén analitikai hibával terhelt eredményeket szolgáltat, amit mind a szabályozás, mind az allergén menedzsmentben történő alkalmazás esetében figyelembe kell venni. A megoldást a célfehérjék, epitópek és a többi matrixalkotó, az analitikai módszerek szempontjából meghatározó fizikai-kémiai folyamatok megismerése és ezek alapján a módszertan pontosítása jelentheti.

7. Köszönetnyilvánítás

A kutatómunka kapcsolódik a „Minőségorientált, összehangolt oktatási és K+F+I stratégia, valamint működési modell kidolgozása a Műgyetemen” c. projekt (TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0002) és „Gluténmentes tészta minőségének javítása hemicellulóz hálózat kialakításával” c. OTKA kutatási program (OTKA ANN 114554) szakmai célkitűzéseinek megvalósításához.



A kép illusztráció / Picture is for illustration only

8. Irodalom

- [1] EU Regulation No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the EU, 304:18-63.
- [2] Gerrard J. A. (2002): Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. Trends in Food Science & Technology, 13: 391-399.
- [3] Breitender H., Mills E.n.c. (2005): Molecular properties of food allergens. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 115(1): 14-23.
- [4] 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: 1116-1122.
- [5] Tatham A.S., Shewry P.R. (2008): Allergens in wheat and related cereals. Clinical and Experimental Allergy, 38: 1712-1726.
- [6] Mccann T. H., Small D. M., Batey I. L., Wrigley C. W., Day L. (2009): Protein-lipid interactions in gluten elucidated using acetic-acid fractionation. Food Chemistry, 115: 105-112.
- [7] Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. (2005): Cellular and Molecular Immunology. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA. ISBN: 978-1-4377-1528-6.
- [8] Davis P. J., Smales C. M., James D. C. (2001): How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? Allergy, 67: 56-60.
- [9] Diaz-Amigo C. (2010): Towards a Comprehensive Validation of ELISA Kits for Food Allergens: Case 1—Milk. Food Analytical Methods, 3: 351-356.
- [10] Monaci L., Brohée M., Tregoat V., Van Hengel A. (2011): Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA. Food Chemistry, 127: 669-675.
- [11] Pesic M. B., Barac M. B., Stanojevic S. P., Ristic N. M., Macej O. D., Vrvic M. M. (2012): Heat-induced casein-whey protein interactions at natural pH of milk: A comparison between caprine and bovine milk. Small Ruminant Research, 108: 77-86.
- [12] Caubet J. C., Bencharitiwong R., Moshier E., Godbold J. H., Sampson H. A., Nowak-Wegrzyn A. (2012): Significance of ovomucoid- and ovalbumin-specific IgE/IgG4 ratios in egg allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 129(3): 739-747.
- [13] Croguennec T., Renault A., Beaufile S., Dubois J., Pezennec S. (2007): Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. Journal of Colloid and Interface Science, 315: 627-636.
- [14] Azarnia S., Boye J. I., Mongeon V., Sabik H. (2013): Detection of ovalbumin in eggwhite, whole egg and incurred pasta using LC-ESI-MS/MS and ELISA. Food Research International, 52: 526-534.
- [15] Cucu T., De Meulenaer B., Devreese B. (2011): MALDI based identification of soybean protein markers – Possible analytical targets for allergen detection in processed foods. Peptides, 33(2): 187-196.
- [16] Nishinari K., Fang Y., Guo S., Philips G. O. (2014): Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. Food Hydrocolloids, 39: 301-318.
- [17] Chen Y., Xu Z., Zhang C., Kong X., Hua Y. (2014): Heat-induced inactivation mechanisms of Kunitz trypsin inhibitor and Bowman-Birk inhibitor in soymilk processing. Food Chemistry, 154: 108-116.
- [18] Van De Lageemat J., Silvan J.m., Moreno F. J., Olano A., Del Castillo M. D. (2007): In vitro glycation and antigenicity of soy proteins. Food Research International, 40: 153-160.
- [19] 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: 109-117.
- [20] Tollefsen S., Arentz-Hansen H., Fleckenstein B., Molberg O., Ráki M., Kwok W. W., Jung G., Lundin K. E. A., Sollid L. M. (2014): HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. The Journal of Clinical Investigation, 116(8): 2226-2236.
- [21] Singh H. (2005): A study of changes in wheat protein during bread baking using SE-HPLC. Food Chemistry, 90: 247-250.
- [22] Rasheed F., Newson W. R., Plivelic T. S., Kuktait R., Hedenqvist M. S., Gallstedt M., Johansson E. (2014): Structural architecture and solubility of native and modified gliadin and glutenin proteins: non-crystalline molecular and atomic organization. RSC Advances, 4: 2051-2060.
- [23] Kerbach S., Aldrick A. J., Crevel R. W. R., Dömötör L., Dunngalvin A., Mills E. N. C., Pfaff S., Poms R. E., Popping B., Tömösközi S. (2009): Managing food allergens in the food supply chain - viewed from different stakeholder perspectives. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 50-60.