



# VĚDECKÝ VÝBOR FYTOSANITÁRNÍ A ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

<b>Klasifikace:</b>	Draft	<input type="checkbox"/>	<i>Pro vnitřní potřebu VVF</i>
	Oponovaný draft	<input type="checkbox"/>	<i>Pro vnitřní potřebu VVF</i>
	Finální dokument	<input type="checkbox"/>	<i>Pro oficiální použití</i>
	Deklasifikovaný dokument	<input checked="" type="checkbox"/>	<i>Pro veřejné použití</i>

## Název dokumentu:

**Alergeny v potravinách rostlinného původu**

## Poznámka:

### Zpracoval:

Garant: Ing. Slavomíra Vavreinová, CSc. ve spolupráci s Ing. Danou Gabrovskou, Ing. Janou Rysovou, Mgr. Petrem Hanákem, PhD. a Ing. Alexandrou Proškovou (VÚPP, v.v.i.)

**Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 PRAHA 6 - Ruzyně**

Tel.: +420 233 022 324 , fax.: +420 233 311 591, URL: <http://www.phytopsanitary.org>

Cílem studie je na vybraných alergenech představit způsob stanovení jejich obsahu v potravinách rostlinného původu. Studie dále slouží k prezentaci výsledků šetření kontaminace potravin alergenními složkami.

**Abstrakt:** Cílem studie je na vybraných alergenech představit způsob stanovení jejich obsahu v potravinách rostlinného původu. Studie dále slouží k prezentaci výsledků šetření kontaminace potravin alergenními složkami. Jako základní alergeny byly vybrány gliadin,  $\beta$ -laktoglobulin, kasein, proteiny hořčice, proteiny vaječného bílku a sójové alergeny glycinin a  $\beta$ -conglycinin.

**Abstract:** The aim of the study was to present the method of determination of the selected allergens in foods of plant origin. The study serves also for presentation of the results of possible contamination by allergenic proteins. Gliadin,  $\beta$ -lactoglobulin, casein, mustard proteins, egg white proteins and soya allergens glycinin and  $\beta$ -conglycinin were selected as the basic allergens.

**Závěr:** Byly ověřeny čtyři ELISA soupravy na stanovení vybraných alergenů v potravinách rostlinného původu. Výsledky neprokázaly náhodnou kontaminaci analyzovaných potravin některou alergenní složkou, naopak bylo zjištěno, že ve výrobcích, které měly na obalu deklarován možný obsah alergenů, provedené analýzy jejich přítomnost neprokázaly. To lze na jedné straně interpretovat jako možné nedodržení technologie, na druhé straně jako nadměrnou opatrnost výrobce, která omezuje výběr spotřebitele - alergika. Testovanou metodou Western blot bylo možno detekovat sledované alergeny pouze u výrobků, v nichž sója tvoří majoritní složku.

1. Úvod .....	4
2. Stručná charakteristika vybraných alergenů .....	5
2.1. Prolaminy obilovin a jejich úloha v bezlepkové dietě a alergii .....	5
2.1.1 Struktura gliadinů pšenice .....	5
2.1.2. Struktura hordeinů ječmene.....	6
2.2. Alergenní proteiny hořčice .....	7
2.3. Alergenní proteiny mléka .....	7
2.4. Alergenní proteiny vajec .....	8
2.5. Alergenní proteiny sóji .....	8
3. Metody .....	9
3.1. ELISA metody .....	9
Gliadin ELISA kit .....	9
Mustard ELISA Kit .....	9
Egg ELISA Kit – native .....	10
β-Lactoglobulin ELISA Kit .....	10
Casein ELISA Kit .....	10
3.2. Metoda Western blot .....	10
4. Materiál .....	11
5. Výsledky a diskuse .....	11
5.1. ELISA metody .....	11
5.2. Metoda Western blot .....	16
6. Závěr .....	17
7. Seznam použité literatury .....	17

## 1. Úvod

Jako alergie je označována neadekvátní reakce imunitního systému na některou složku prostředí, zprostředkovaná imunoglobuliny třídy IgE. Dalšími významnými složkami patologické alergické reakce jsou žírné buňky, neboli mastocyty, na jejichž povrchu jsou také navázány molekuly IgE, a dále látky, které mastocyty uvolňují, především histamin. Ne všechny reakce přecitlivělosti jsou alergiemi (např. u celiakie hrají dominantní roli imunoglobuliny třídy IgG), a ani všechny přecitlivělosti nemusejí být zprostředkovány imunitním systémem (např. intolerance laktózy). Některé potraviny bohaté na tyramin nebo histamin mohou vyvolávat patologickou reakci prakticky nerozeznatelnou od potravinové alergie.

Alergická reakce se u postiženého jedince projevuje nejčastěji jako otok sliznic (známá senná rýma), pálení a zarudnutí kůže nebo očí, astmatické projevy provázené stažením svaloviny průdušek. V nejhorších případech, označovaných jako tzv. anafylaktický šok, dochází k masivnímu rozšíření průsvitu cév, tím k poklesu krevního tlaku a následnému oběhovému selhání, které může končit smrtí.

Problém potravinových alergií spočívá především v tom, že na rozdíl od ostatních alergií zatím neexistují účinné metody léčby, respektive desenzibilizace, a dále i v tom, že alergická reakce je vždy vyvolána požitím potraviny obsahující alergenní složku. To není vždy – viz „pekařské astma“

Alergenní složka může být v potravinech obsažena skrytě, konzument o její přítomnosti nemusí vědět. To, spolu s hrozícím nebezpečím anafylaktického šoku, vytváří skutečně závažný problém.

Tato nepříznivá situace postupně vyvolala tlak na deklaraci, a tedy i stanovení a kontrolu nejnebezpečnějších, nejčastějších alergenů, které se mohou v potravinách objevovat. To se odrazilo v příslušné legislativě Evropské unie a následně i v legislativě národní. Na úrovni EU jde o směrnice Evropského parlamentu a rady 2000/13/ES a 2003/89/ES a směrnici Evropské komise 2005/26/ES; na úrovni České republiky existuje vyhláška č. 113/2005 Sb. o způsobu označování potravin a tabákových výrobků. V těchto dokumentech je přesně uveden seznam alergenních látek, kterých se týká povinná deklarace na obalech výrobku. V případě gliadinu/lepku je potřeba zmínit také vyhlášku č. 54/2004 Sb. o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití, ve znění pozdějších právních předpisů, která, v části 7, řeší přímo bezpečnost potravin.

V době, kdy vešla v platnost legislativa EU a také česká legislativa, nebyly na stanovení všech ve vyhláškách vyjmenovaných alergenních složek dostupné analytické metody. Předložená studie se zaměřuje na imunochemické metody a nejčastěji se vyskytující alergeny potravin rostlinného původu a vychází z experimentálních prací provedených na pracovištích VÚPP, v.v.i.

## 2. Stručná charakteristika vybraných alergenů

### 2.1. Prolaminy obilovin a jejich úloha v bezlepkové dietě a alergii

Základními bílkovinami všech obilovin jsou albuminy, globuliny a ve vodě nerozpustné prolaminy a gluteliny. Triviální názvy prolaminové frakce vycházejí u jednotlivých obilovin z latinských názvů rostlin (hordein u ječmene, sekalin u žita, gliadin u pšenice, avenin u ovsu, oryzin u rýže, zein u kukuřice). Gluten definuje Codex Alimentarius jako frakci bílkovin pšenice, žita, ječmene, [ovsa], která je nerozpustná ve vodě a 0,5 M NaCl. Prolaminová frakce je definována jako frakce glutenu extrahovatelná 40 – 70% ethanolem a tvořící 50% glutenu (*ALINORM 07/30/26-Rev*).

Bílkoviny pšeničného glutenu jsou tvořeny rezervními, ve vodě nerozpustnými gliadiny (prolaminová frakce) a gluteniny (glutelinová frakce) reprezentované řadou příbuzných proteinů vzájemně se lišících složením aminokyselin. Je možné je rozdělit do tří základních skupin :

1. HMW (high molecular weight) skupina, kam patří  $\omega$ -5 a  $\omega$ -1,2 typy HMW podjednotek gluteninu
2. MMW (medium molecular weight) skupina, kam patří  $\omega$ -5,  $\omega$ -1,2 gliadiny  
Tato skupina bývá také označována S-poor skupina pro nepřítomnost cysteinu
3. LMW (low molecular weight), kam patří LMW podjednotky gluteninu a  $\alpha$ - a  $\gamma$ -gliadiny; tato skupina bývá také označována S-rich

Gliadiny mají relativní molekulovou hmotnost 30 až více než 100 kDa, obvykle mezi 60-80 kDa. Obsahují velké množství glutaminu (36-45 %) a prolinu (14-30 %), méně kyseliny asparagové a glutamové. Obsahují neobvykle málo bazických aminokyselin (Arg, Lys, His). Nízký obsah kyselých a bazických aminokyselin s polárními řetězci souvisí s malou rozpustností gliadinů. Gluteniny mají vyšší molekulovou hmotnost, od 40 kDa do 20 000 kDa a jsou tvořeny polypeptidovými řetězci spojenými disulfidovými vazbami .

Vysoký obsah prolinu prakticky znemožňuje tvorbu helikální sekundární struktury obou druhů proteinů. Molekuly gliadinů a gluteninů proto obsahují jen krátké úseky  $\alpha$ -helixů spojené úseky s neorganizovanou sekundární strukturou. V oblastech  $\alpha$ -helixů se vyskytují jeden až dva cysteinové zbytky vzájemně spojující podjednotky do dlouhých řetězců. Nachází se zde velké množství polypeptidových úseků známých jako reverzní smyčky nebo  $\beta$ -otočky, které jsou uspořádány do tzv.  $\beta$ -spirál (*Wieser 1996; Wieser 2004*).

#### 2.1.1. Struktura gliadinů pšenice

První rozdělení frakcí gliadinů bylo provedeno elektroforézou na škrobovém gelu. Byly identifikovány 4 dílčí frakce, podskupiny  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\omega$ -gliadiny, v závislosti na elektroforetické pohyblivosti. Pozdější studie provedené na základě rozboru sekvencí aminokyselin ukázaly, že rozdělení podle elektroforetické pohyblivosti nesouhlasí vždy s klasifikací na základě primární struktury; z tohoto důvodu byly frakce  $\alpha$ - a  $\beta$ -gliadinů zahrnuty do jedné skupiny – mezi  $\alpha$ -gliadiny. Moderní metody – dvourozměrná elektroforéza a RP-HPLC umožnily rozdělení gliadinů na více než 100 složek. Podle primární struktury jsou rozděleny na  $\omega$ 5,  $\omega$ 1,2- gliadiny,  $\alpha$ - a  $\gamma$ -gliadiny. Gliadin  $\omega$ -5 a gliadiny typu  $\omega$ -1,2 jsou příbuzné, stejně tak gliadiny typu  $\alpha$ - a  $\gamma$ -.  $\omega$ -gliadiny jsou charakterizovány vysokým obsahem glutaminu, prolinu a fenylalaninu, které společně tvoří okolo 80 % všech jejich aminokyselin.  $\omega$ -5 gliadiny mají vyšší molekulovou hmotnost a vyšší obsah glutaminu

a fenylalaninu než  $\omega$ -1,2-gliadiny,  $\alpha$ - a  $\gamma$ -gliadiny mají vyšší molekulovou hmotnost a obsah glutaminu a prolinu je nižší než u  $\omega$ -gliadinů. Odlišují se významně pouze několika aminokyselinami, např. tyrosinem. N- koncové sekvence jsou typické pro každý typ a jeho stanovení je důležitým faktorem pro identifikaci gliadinových proteinů.

Distribuce jednotlivých typů gliadinů mezi různými druhy pšenice je závislá na druhu a agrotechnických podmínkách.  $\alpha$ -gliadiny tvoří největší složku gliadinů, následují  $\gamma$ -gliadiny, zatímco  $\omega$ -5 a  $\omega$ -1,2-gliadiny tvoří minoritní skupinu. Byla stanovena sekvence  $\alpha$ - a  $\gamma$ -gliadinů pomocí stanovení sekvence komplementární DNA. Kompletní sekvence  $\omega$ -gliadinů nebyla dosud stanovena, pouze je známo, že obsahují opakující se sekvence s krátkými N-koncovými sekvencemi. Dominantními jednotkami jsou Pro-Gln-Gln-Gln-Phe ( $\omega$ 5-gliadin) a Pro-Gln-Gln-Pro-Phe-Pro-Gln-Gln ( $\omega$ 1,2 gliadin) .

Sekvence  $\alpha$ - a  $\gamma$ - gliadinů jsou rozděleny do několika oblastí. Oblast I je typická pro každý typ a obsahuje N-koncovou sekvenci (Ia) a opakující se sekvenci bohatou na Gln, Pro a aromatické aminokyseliny. Opakující se jednotky  $\alpha$ -gliadinu tvoří dodekapeptid Gln-Pro-Gln-Pro-Phe-Pro-Pro-Gln-Gln-Pro-Tyr-Pro, který se opakuje 5x.  $\gamma$ -gliadin má 16x se opakující jednotku tvořenou sekvencí Gln-Pro-Gln-Gln-Pro-Phe-Pro. Oblast I je oblastí, kterou se liší  $\alpha$ - a  $\gamma$ - gliadiny navzájem. Oblast II je obsažena pouze u  $\alpha$ - gliadinu a je tvořena sekvencí 18 glutaminů. Oblasti III a V jsou oblasti, kde nedochází k opakování sekvencí a obsahují méně Gln a Pro. Oblast IV je bohatá na Gln a obsahuje maximálně 15 zbytků Gln za sebou.

Studie sekundární struktury gliadinu ukazují, že  $\omega$ -gliadiny a oblasti I a  $\alpha$ - a  $\gamma$ -gliadinů jsou charakterizovány konformacemi  $\beta$ -otočky (reverzní spirály), které jsou uspořádány do  $\beta$ -spirál. Neopakující se oblasti III–V obsahují významné podíly  $\alpha$ -helixů a  $\beta$ -struktury (Wieser 1996; Seilmeier et al. 2001; Wieser 2004).

### 2.1.2. Struktura hordeinů ječmene

Hordeinová frakce ječmene zahrnuje HMW (high molecular weight) D-hordein, C-hordein a LMW (low molecular weight) B-hordein. D-hordeiny jsou značně podobné HMW frakci pšeničných proteinů.

C-hordeiny se sestávají ze 4–15 jednotlivých proteinů, v závislosti na kultivaru, a jejich molekulová hmotnost se obvykle pohybuje mezi 55-70 kDa. Jejich typickým znakem jsou repetitivní sekvence složené převážně z oktapeptidu Pro-Gln-Gln-Pro-Phe-Pro-Gln-Gln, dále pak pentapeptidu Pro-Gln-Gln-Pro-Thr poblíž N-koncové části. Složení repetitivního oktapeptidu (4x Gln, 3x Pro, 1x Phe) odpovídá i poměrnému zastoupení těchto aminokyselin v celém proteinu. C-hordeiny neobsahují cystein, v jednom molu obsahují jeden methionin a nula až dva lysinové zbytky. Sekundární struktura těchto bílkovin se vyznačuje výskytem repetitivních sekvencí vedoucích ke vzniku  $\beta$ -otoček a  $\beta$ -hřebenů (Shewry et al. 2002; Shewry et al.1990).

B-hordeiny tvoří 80-90 % všech prolaminů ječmene a jejich aminokyselinové složení je zhruba podobné složení ostatních S-Rich prolaminů, tedy  $\alpha$ - ,  $\beta$ - ,  $\gamma$ -gliadinů a  $\gamma$ -sekalinů. Struktura B-hordeinů obsahuje obvykle C-koncovou část složenou z repetitivních sekvencí bohatých na prolin, N-koncovou část obsahující cysteinové řetězce a konformačně se značně podobá odpovídajícím proteinům gliadinové frakce pšenice s mírně zvýšeným podílem  $\beta$ -hřebenů. Molekulová hmotnost bílkovin této frakce se pohybuje obvykle v rozmezí 20-50 kDa. Dvourozměrná analýza B-hordeinových frakcí je rozdělila na B<sub>1</sub>- a B<sub>3</sub>- hordeiny s molekulovými hmotnostmi okolo 35 kDa a 45 kDa. Jednotlivé proteiny B<sub>1</sub>-hordeinů se mezi sebou liší inzercí, delecí či substitucí jednotlivých aminokyselin, zatímco B<sub>3</sub>-hordeiny se

navíc ještě vzájemně odlišují organizaci repetitivních domén (Hulín et al.2007; Stern et al. 2001).

## 2.2. Alergenní proteiny hořčice

Hořčice jako potravinářský výrobek se připravuje ze semen hořčičných rostlin. Jedná se zejména o hořčici bílou (*Sinapis alba*) využívanou pro výrobu plnotučné hořčice a brukey sítinovitou (brukey, hořčici sarepskou, *Brassica juncea*). Tmavosemenné odrůdy této hořčice se využívají na výrobu kremžské hořčice a žlutosemenné odrůdy do výrobků orientálního typu. Na výrobu kremžských hořčic se dále používají i semena brukve černé (*Brassica nigra*).

Pokud jde o prevalenci, alergie na hořčici je asi pátou až šestou nejčastější potravinovou alergií. Její výskyt úzce souvisí se spotřebou hořčice v dané oblasti. Hlavním alergenem bílé hořčice je protein o molekulové hmotnosti 14 kDa označovaný jako Sin a 1. Minimální dávky proteinu Sin a 1 vyvolávající alergickou reakci se pohybují v mikrogramových množstvích. Dalším významným alergenem je Bra j 1, alergen hořčice *Brassica juncea*. Oba proteiny jsou rezistentní k proteolýze trypsinem, chymotrypsinem a pepsinem. Odolávají teplotám nad 88 °C . Alergické reakce na hořčici včetně anafylaxe byly už dokumentovány v řadě studií a setkáváme se s nimi i u malých dětí (*The EFSA Journal, 2004; Rancé, et al. 2000; Monreal, et al 1992*).

## 2.3. Alergenní proteiny mléka

Mléko je jedna z hlavních alergizujících potravin, a to především u dětí. Prevalence této alergie se liší v různých zemích, údaje se pohybují od 1 % až do 3 % v populaci. Alergenní proteiny se nacházejí nejen v mléce a mléčných výrobcích, ale v řadě dalších potravin, kam se přidávají mléčné bílkoviny pro zlepšení funkčních vlastností (vazba vody, zahušťování, tvorba gelu, emulgace, tvorba pěny, zvýšení nutriční hodnoty). Technologické zpracování nemění strukturu mléčných proteinů natolik, aby se měnila významně jejich alergenicita. To platí i o tepelném zpracování mléka.

Kravné mléko obsahuje 30–35 g proteinů na litr. Po jeho okyselení na pH 4.6 vzniknou dvě frakce: syrovátka (20 % proteinů) a tvaroh (80 % proteinů). Sirovátka především obsahuje  $\beta$ -laktoglobulin (BLG),  $\alpha$ -laktalbumin (ALA), hovězí sérový albumin (BSA) laktoferin (LF) a imunoglobuliny (Igs). Tvaroh je tvořen kaseinem (CAS), a to čtyřmi druhy označovanými jako  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  a  $\kappa$ . Hlavními alergenními proteiny mléka jsou  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin a kasein (*Kleber, Hinrichs 2007a; Kleber, Hinrichs 2007b; Monaci et al. 2006; Wroblewska et al. 2007*).

Procentické zastoupení bílkovin mléka		Koncentrace v mléce, g/L	Molekulová hmotnost, kDa
Sirovátková frakce	BLG (10)	3 - 4	18.3 / dimer 37
	ALA (5)	1 – 1.5	14.2
	Igs (3)	0.6 - 1	150
	BSA (1)	0.1 – 0.4	66.3
	LF (stopy)	0.09	80
Kaseinová frakce	$\alpha_{s1}$ - CAS (32)	12 - 15	23.6
	$\alpha_{s2}$ - CAS (10)	3 - 4	25.2
	$\beta$ - CAS (28)	9 - 11	24.0
	$\kappa$ - CAS (10)	3 - 4	19.0

## 2.4. Alergenní proteiny vajec

Prevalence alergie na vaječné bílkoviny je jedna z největších – odhady se pohybují mezi 3-7 % u dětí do 2 let věku. Rovněž i výskyt u celé populace je na úrovni jednotek procent. Alergeny jsou obsaženy v bílku i ve žloutku, a jejich účinek se tepelným opracováním potravin neodstraní. Podobně jako u mléka jsou vaječné bílkoviny obsaženy v mnoha potravinách v skryté formě jako aditiva. Například lysozym je používán při výrobě některých léků, albumin se používá jako čířící reagencie při výrobě červeného vína.

Vaječné alergeny jsou následující – seřazeno dle klesající alergenicity:

	molekulová hmotnost (kDa)	obsah (%)
Vaječný bílek:		
ovomukoid	28	13.3
ovalbumin	43	67.5
konalbumin	76	15.1
lysozym	14	4.2
Vaječný žloutek:		
lipovitelin	400	
fosvitin	175	
low density lipoprotein		
livetiny	45-150	

Z hlediska klinických projevů je asi nejdůležitější ovomukoid.

Uvádí se, že už mikrogramová množství alergenních proteinů mohou u některých jedinců vyvolat alergickou reakci. (*Eggesbo et al. 2001; Cooke et al. 1997; Eigenmann et al. 1996*).

## 2.5. Alergenní proteiny sóji

U zdravé populace mohou sójové bílkoviny zlepšit zdravotní stav především v oblasti kardiovaskulární, dále mají antisklerotický vliv a působí také antikarcinogenně. Na druhé straně mohou vyvolávat u citlivých jedinců silné alergie.

Sója patří mezi tzv. majoritní alergeny, tzn., že minimálně 50 % sledovaných alergických jedinců má v séru přítomný specifický IgE. Glycinin a  $\beta$ -conglycinin jsou hlavními rezervními proteiny sóji a současně i hlavními alergeny, vedle trypsin inhibitoru a několika dalších proteinů, které jsou v sóji přítomny v menším množství. Lze je od sebe oddělit frakčním srážením a ultracentrifugací jako tzv. frakce 11S a 7S. Hlavním alergenem sóji je Gly m 1 (Gly m Bd) o mol. hmotnosti 30 kDa, který je obsažen v 7S globulinové frakci. Vodou extrahovatelné proteiny (asi 90 %) obsahují 25-35 % glycininu a 20-35 %  $\beta$ -conglycinu (*Yamauchi et al., 1991*). Subjednotky glycininu jsou acidické (asi 38 kDa) a basicke (asi 20 kDa) polypeptidy, spojené většinou jednoduchými bisulfidickými můstky (*Maruyama et al. 2003, Lakemond 2000, Staswick et al. 1984, Staswick et al. 1981*). Při pH 7,6 a iontové síle 0,5 je většinou glycinin přítomen v hexametrické formě asi 360 kDa se sedimentačním koeficientem 11S (*Badley et al. 1975*). Druhý alergen,  $\beta$ -conglycinin, je



přítomen jako trimer s koeficientem 7S a mol. hmotností 150-170 kDa (Yaklich 2001), skládající se ze tří podjednotek (Maruyama et al. 2003).

V sójovém extraktu bylo při klinických zkouškách s pacienty nalezeno 16 různých alergenů, jejich molekulová váha byla mezi 14 000-70 000. Nejvíce alergií na sóju vyúsťuje v kožní alergie - atopickou dermatitis. Nejčastější odezva v séru pacientů byla na alergen, nazvaný Gly m Bd 30 s molekulovou vahou 30 000 (Ogawa et al. 1991), který se vyskytuje ve frakci 7S společně s  $\beta$ -conglycininem a lze je od sebe oddělit. Jako další nejčastěji zmiňovaný alergen je  $\alpha'$  subjednotka  $\beta$ -conglycininu s uváděnou molekulovou vahou 70-72 000 (Ogawa et al. 1995) a  $\alpha$  subjednotka  $\beta$ -conglycininu s molekulovou vahou 60 000. Další alergen je Gly m Bd 28. Jedná se o minoritní složku sójových proteinů, a to součást frakce 7S (Ogawa et al. 2000).

Méně se vyskytující alergie je astma z prachu na pracovištích, kde se pracuje se sójou. Tu způsobují nízkomolekulární alergeny s mol. vahou pod 14 000, např. 7 000, 7 500, 8 000 (Ogawa et al. 1991, 2000), jsou to obvykle degradační produkty  $\beta$ -conglycininu. Alergenické jsou také acidické podjednotky glycininu (Ogawa et al. 2000, Djurtoft et al. 1991).

### 3. Metody

Ke studiu byly vybrány imunochemické metody. ELISA metody pro stanovení gliadinu,  $\beta$ -laktoglobulinu, kaseinu, proteinů hořčice a proteinů vaječného bílku, metoda Western blot pro stanovení alergenů sóji.

#### 3.1. ELISA metody

##### Gliadin ELISA kit

(Imunoenzymatická souprava pro kvantitativní stanovení prolaminů pšenice, žita a pro detekci prolaminů ječmene)

ELISA stanovení gliadinu je stanovení sendvičového typu, které probíhá ve dvou imunochemických krocích. Kalibrátory nebo zředěné extrakty jsou inkubovány v jamkách, pokrytých dvěma monoklonálními protilátkami proti gliadinu. Na tyto protilátky se během inkubace gliadin naváže. Po inkubaci a promytí se do jamek přidá polyklonální protilátka proti gliadinu konjugovaná s křenovou peroxidázou. Vytvoří se komplex s gliadinem zachyceným v jamce. Po inkubaci se jamky promyjí a na jamkách navázaná peroxidáza je detekována přidávkem chromogenního substrátu (tetramethylbenzidin, dále TMB). Intenzita vzniklého zabarvení je úměrná koncentraci gliadinu v kalibrátorech a zředěných extraktech.

##### Mustard ELISA Kit

(Imunoenzymatická souprava pro stanovení obsahu proteinů hořčice (*Sinapsis alba*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*) v syrových i tepelně upravených potravinách)

Imunoenzymatické stanovení proteinů hořčice je stanovení sendvičového typu, které probíhá ve dvou imunologických krocích. Kalibrátory, kontrolní vzorky nebo extrakt vzorku jsou inkubovány v jamkách pokrytých králičí protilátkou proti proteinům hořčice. Na protilátku se během první inkubace ze vzorku nebo kalibrátoru naváží proteiny hořčice. Po inkubaci a promytí se do jamek přidá konjugát specifické králičí protilátky s křenovou peroxidázou. Vznikne komplex protilátka – antigen značený peroxidázou. Po inkubaci se jamky promyjí a na jamkách navázaná peroxidáza je detekována přidávkem chromogenního

substrátu (TMB). Intenzita vzniklého zbarvení je úměrná koncentraci hořčice v kalibrátorech, kontrolních vzorcích a extraktech vzorků.

#### Egg ELISA Kit – native

(Imunoenzymatická souprava pro kvantitativní stanovení proteinů vaječného bílku (Egg White Protein - EWP) v potravinách a surovinách)

Souprava sendvičového typu. Stanovení je založeno na imunochemické reakci specifické protilátky s proteiny vaječného bílku. V prvním kroku reagují proteiny z kalibrátoru nebo ze vzorku – extraktu analyzované potraviny – se specifickou protilátkou ukotvenou na stěnách jamky mikrotitrační destičky. Po odmytí nenavázaných bílkovin následuje druhý inkubační krok, při kterém reaguje specifická protilátka konjugovaná s enzymem – křenovou peroxidázou – s navázanými bílkovinami. Po inkubaci se jamky promyjí a na jamkách navázaná peroxidáza je detekována přidavkem chromogenního substrátu (TMB). Intenzita vzniklého zbarvení je úměrná koncentraci vaječných bílkovin v kalibrátorech a vzorcích.

#### $\beta$ -Lactoglobulin ELISA Kit

(Imunoenzymatická souprava na stanovení alergenního proteinu kravského mléka)

Souprava sendvičového typu. Stanovení je založeno na imunochemické reakci  $\beta$ -lactoglobulinu (BLG) se specifickou protilátkou. Po jednoduché extrakci z potraviny  $\beta$ -lactoglobulin v prvním kroku reaguje se specifickou protilátkou ukotvenou na stěnách jamky mikrotitrační destičky. Po odmytí nenavázaných bílkovin následuje inkubační krok, při kterém reaguje specifická protilátka konjugovaná s enzymem – křenovou peroxidázou – s navázaným BLG. Po inkubaci se jamky promyjí a BLG je detekován přidavkem chromogenního substrátu (TMB). Intenzita vzniklého zbarvení je úměrná koncentraci BLG ve vzorcích potravin.

#### Casein ELISA Kit

(Imunoenzymatická souprava na stanovení alergenního proteinu kravského mléka)

Stanovení kompetitivního typu. Stanovení je založeno na imunochemické reakci specifické protilátky s kaseinem. V jamkách destičky, které jsou pokryty touto protilátkou, se smíchá vzorek s kaseinem značeným biotinem, při následné inkubaci dochází k navázání kaseinu na stěny jamek. Kasein ve vzorcích a biotinylovaný kasein soutěží o omezený počet vazebných míst na protilátce proti kaseinu. Po promytí se do jamek přidá konjugát křenové peroxidázy se streptavidinem. Po inkubaci se jamky promyjí a na jamkách navázaná peroxidáza je detekována přidavkem chromogenního substrátu (TMB). Intenzita vzniklého zbarvení je nepřímo úměrná koncentraci kaseinu v kalibrátorech, kontrolních vzorcích a vzorcích.

### 3.2. Metoda Western blot

Alergeny sóji glycinin a  $\beta$ -conglycinin byly izolovány na našem pracovišti a následně použity jako antigeny pro tvorbu slepičích protilátek typu IgY. Poté byla sledována imunoreakce získaných protilátek metodou Western blot. Jako sekundární protilátka byla používána králičí anti-chicken IgY- peroxidase firmy Sigma.

#### 4. Materiál

Jako materiál byly vybrány potravinářské výrobky rostlinného původu běžně dostupné na trhu. Stanovení obsahu gliadinu bylo provedeno u největšího souboru potravin, a to především z toho důvodu, že obsah gliadinu a jiných nežádoucích prolaminů je důležitý jak pro skupinu populace s alergií na pšeničnou bílkovinu, tak i pro pacienty s celiakií. U ostatních alergenů bylo provedeno stanovení pouze v několika výrobcích.

#### 5. Výsledky a diskuse

##### 5.1. ELISA metody

Výsledky stanovení obsahu či přítomnosti vybraných alergenních proteinů jsou uvedeny v následujících tabulkách č.1 – 7.

Tabulka č.1 Obsah lepku (glutenu) ve vybraných vzorcích koření ( mg/kg potraviny ve stavu určeném ke spotřebě)

vzorek	Lepek
Nova volná	12,0
Deko saromex volné	12,2
Deko přírodní volné	12,2
Dia Nova volná	11,9
Paštikové koření	12,4
Zlaté kuřátko	12,1
Koření pěti vůní	12,2
Garam masala	12,0
Koření na čínu	12,3
Paprika pálivá	12,5
Orientální koření	12,3
Koření do perníku	12,3
Skořicový cukr Dia	11,7
Kari	11,8
Kurkuma mletá	12,5
Klobásové koření	11,8
Směs mletá masa	12,4
Kmín římský	12,1
Koření na pizzu	11,0
Dátá čaj masala	11,7
Pepř zelený drcený	12,4
Sezam loupaný	11,4
Bylinkové máslo	12,5
Kardamon mletý	12,3
Grilovací koření	12,2
Želírka volná	12,3
Rosovické koření	12,2
Buffalo – grilovací koření	12,3
Tandori masala	11,9

Adžika	26,8
Kořenící směs Vegeta	11,8
Valencie	11,7
Provensálské koření	11,6
Koření na kuře	14,3
Saturejka drcená	12,3
Oregano	12,5
Rozmarýn	12,2
Kmín drcený	12,0

Tabulka č.2 Obsah lepku (glutenu) ve vybraných vzorcích koření (mg/kg potraviny ve stavu určeném ke spotřebě)

vzorek	Lepek
Anýz celý	12,0
Majoránka	12,5
Pět pepřů	12,5
Bobkový list	11,9
Chilli paprička 1-3 cm	11,6
Petržel list 1,5 – 4 mm	11,9
Šafrán volný	13,1
Badyán celý hvězdičky	12,0
Skořice řezaná 8 cm	12,5
Muškatový ořech celý malý	12,1
Vanilka celá 16/18 cm	11,7
Pepř česnekový	11,8
Česnek sušený plátky	11,4
Kmín římský	12,1
Koření na pizzu	11,0
Dátá čaj masala	11,7
Pepř černý celý	11,7
Nové koření	12,3
Jalovec celý	11,5
Koriandr celý	12,2
Kardamon zrna	12,0
Hořčice bílá	11,9
Kmín celý	12,0
Tymián	12,4
Kopr list	12,2
Fenykl celý	11,9
Hřebíček celý	11,6
Libeček nat' drcená	12,3
Bazalka	12,5
Dekorační koření -Steak	12,2
Kořenová zelenina	11,8
Cibule sušená	11,5
Pepř pomerančový	12,2

Tabulka č.3 Obsah lepku (glutenu) ve vybraných vzorcích koření (mg/kg potraviny ve stavu určeném ke spotřebě)

Vzorek	Lepek
Chocolate Fruit and Nut Crunch	12.4
Traditional Crunch	12.2
Treasure Crunch	12.2
Hawaiian Crunch	12.4
Strong Exclusiv (doplňěk stravy)	12.4
Korálovec ježatý a hlíva ústřičná s meruňkovým olejem	11.9
Křehké plátky kukuřičné s vlákninou, 65 g	12.2
Křehké plátky Rýžové, 65 g	12.0
Kukuřičné tyčinky, 70 g	12.2
Křupky kukuřičné, 90 g	12.0
Křupky kukuřičné s příchutí slaniny, 90 g	12.3
Křupky rýžové, 100 g	12.5
Křehké plátky Kukuřičné se sýrem, 65 g	12.4
Pohanková sekaná - směs	13.4
Pohankový dezert	11.5
Pohanková krupice	12.3
Špaldové kafe	12.1
Kukuřičná polenta instantní	12.4
Jáhly	12.4
Cizrna	12.3
Červená čočka loupaná	12.4
Rýžové pukance	13.1
Rýže dlouhozrnná natural	12.2
Rýže basmati natural	12.2
Rozinky sultánky	12.3

Hodnoty obsahu lepku v souboru vybraných potravin rostlinného původu byly všechny až na koření Adžika (tabulka č.1) pod hodnotou 20 mg lepku/kg potraviny určené k přímé spotřebě. Tato hodnota je v současné době limitní hodnotou, pokud chce výrobce označovat potraviny jako přirozeně bezlepkové. U potravin deklarovaných jako bezlepkové je tento limit 100 mg lepku/kg potraviny určené k přímé spotřebě.

Tabulka č.4 Obsah proteinů bílku ve vybraných potravinách rostlinného původu

Vzorek	proteiny vaječného bílku (mg/kg)	deklarovaná přítomnost vaječných bílkovin
Palačinky v prášku	<0.5	-
Směs na pizzu	>15.0	+
Bramborové knedlíky v prášku	<0.5	+
Rýže	<0.5	-
Knemix - směs na houskové a ovocné knedlíky	>15.0	+
Sedlácká polévka Maggi	0.22	+
Zátkovy vaječné těstoviny-široké nudle	>15.0	+
Červené víno - Francie	<0.5	-
Červené víno - Itálie	<0.5	-
Jogurtovník	<0.5	-

Tabulka č.5 Obsah proteinů hořčice ve vybraných potravinách rostlinného původu

vzorek	proteiny hořčice mg/kg	deklarovaná přítomnost hořčice
Francouzský dressing	<0.42	-
Majolka	<0.42	+
Marináda s chilli a česnekem pikantní	<0.42	+
Sladko-kyselá omáčka	<0.42	+
Koření přípravek Gril Argentina	>12.5	+
Maggi nápady česnek a bylinky	<0.42	-
Koření Rožnění	>12.5	+
Marináda pepř a hořčice	>12.5	+
Maggi nápady hořčice a smetana	>12.5	+
Koření Pečená masa	<0.42	+
Telka provensálská	<0.42	-
Rýže	<0.42	-
Ovesné vločky	<0.42	-
Sója	<0.42	-

Tabulka č.6 Obsah  $\beta$ -laktoglobulinu ve vybraných potravinách rostlinného původu

vzorek	$\beta$ -laktoglobulin mg/kg
Chléb konzumní s kmínem krájený	<0.20
Telka s provensálským kořením	<0.20
Kyselé rybičky	<0.20
Sójový dezert meruňkový	<0.20
Sójový dezert karamelový	<0.20
Rýže dlouhozrná	<0.20
Pšeničná mouka	<0.20
Cereálie-Cini Minis	<0.20
Fruit action - ovocný nápoj	<0.20
Džus	<0.20
Olej	<0.20
Letní rajská polévka	<0.20
Bylinkové tofu	<0.20
Hořká čokoláda	<0.20
Besipky - s vitamínem C	<0.20
Perla	<0.20
Zapékané křupavé muesli s meruňkami	<0.20

Tabulka č.7 Obsah kaseinu ve vybraných potravinách rostlinného původu

vzorek	kasein mg/kg	deklarovaná přítomnost mléka nebo kaseinátu
Pšeničná mouka	<1.0	-
Pohanková mouka	<1.0	-
Bramborová kaše s mlékem	>30.0	+
Jihlavanka 3 v1	>30.0	+
Směs na bábovku	>30.0	+
Muesli čokoládové s ořechy Emco	<1.0	-
Bezlepková směs na pečení Jizerka	<1.0	-
Olej	<1.0	-
Cukr	<1.0	-
Rýže	<1.0	-
Kečup	<1.0	-
Kakao	<1.0	-
Vegeta - koření	<1.0	-
Kukuřičná mouka	<1.0	-
Sirup	<1.0	-

## 5.2. Metoda Western blot

Byla otestována intenzita imunoreakce metodou Western blot u dvou protilátek (antiglycinin a anti- $\beta$ -conglycinin) se vzorky původního izolovaného glycininu a  $\beta$ -conglycininu. Dále byly testovány tyto výrobky: Tofu natural-sója s mořskou solí, Tofu zeleninové-sója s mořskou solí a směsí zeleniny, dětský párek-sója 0,4 %, mini klobáska-sójová bílkovina 4 % a jako kontrola i spišský párek. V případě izolované bílkoviny glycininu i  $\beta$ -conglycininu dávaly obě protilátky antiglycinin i anti- $\beta$ -conglycinin pozitivní výsledky. U sójových výrobků Tofu natural a Tofu zeleninové byla reakce po vyvolání protilátkami také pozitivní, zatímco u výrobků pouze s přídavkem sóji (klobáska, dětský párek) byla reakce výrazně slabší a teprve po důsledném odtučnění těchto vzorků se objevila intenzivnější reakce. Kontrolně byly sledovány i vzorky, kde bylo na obalu výrobku přímo garantováno, že neobsahují sóju. U spišského párku byla tato reakce skutečně negativní.

Testovanou metodou Western blot je možno detekovat sledované alergeny pouze ve výrobcích, v nichž sója tvoří majoritní složku.

Tabulka č.8 Výsledky metody imunoreakce metodou Western blot

Vzorek	alergenní protein	
	glycinin	$\beta$ -conglycinin
Tofu natural-sója s mořskou solí	+	+
Tofu zeleninové – sója s mořskou solí a směsí zeleniny	+	+
Dětský párek, sója 0,4 %	+	+
Klobáska-sójová bílkovina 4 %	+	+
Spišský párek	-	-

Legislativa týkající se povinnosti výrobců potravin uvádět přítomné alergenní složky na obalu neřeší konkrétní limity obsahu alergenů v potravinách, jako je tomu u lepku v případě bezlepkových potravin. Podle vžitých pravidel je za pozitivní nález (pozitivní přítomnost alergenního proteinu či alergenní složky) považován výsledek, kdy je obsah alergenního proteinu nebo složky nad hodnotou 1. standardu dané imunochemické soupravy. Podle tohoto pravidla byly všechny vzorky analyzovány na obsah  $\beta$ -laktoglobulinu negativní (tabulka č.6). V případě dalších alergenů byly vybrány i potraviny, kde výrobce deklaroval přítomnost alergenní složky – tabulky č.4, 5 a 7. V tabulce č. 4 je přehled výrobků, u kterých byl stanoven obsah proteinů bílku. Jeden výrobek (bramborové knedlíky v prášku), kde výrobce deklaruje jako složku sušené vejce, vykázal hodnotu obsahu proteinů bílku pod hodnotou 0,5 mg/kg. U vybraných potravin rostlinného původu, kde byly jako alergenní složka sledovány proteiny hořčice, byla situace podobná, a to hned u čtyř výrobků. Výrobce zde přítomnost hořčice či hořčičného semínka deklaruje, ale analýza přítomnosti proteinů hořčice neprokázala. V případě stanovení kaseinu (tabulka č. 7) byly u všech vzorků, kde výrobce deklaroval přítomnost mléčné složky, nalezeny hodnoty kaseinu nad hodnotou posledního standardu.



## 6. Závěr

Z pohledu možností použití imunochemických metod ke stanovení vybraných alergenů lze konstatovat, že ELISA metody s použitím uvedených kitů se osvědčily a je možné je používat k rutinním stanovením. Testovanou metodou Western blot je možno detekovat sledované alergeny pouze u výrobků, v nichž sója tvoří majoritní složku.

I z pohledu spotřebitelského je možné výsledky stanovení alergenních proteinů a vlastní práci se soupravami na stanovení alergenních proteinů považovat za uspokojivé. Došlo k případům, kdy nebyl prokázán obsah alergenu, ačkoli byl na obalu potravin alergenu deklarován. Tuto situaci by bylo možné hodnotit jako nedodržení technologie výroby nebo receptury, spíše se však jedná o preventivní opatření výrobce pro případ náhodné kontaminace výrobku.

**Studie může sloužit SZPI jako základní materiál poskytující možnost prokázat přítomnost či nepřítomnost vybraných alergenů v potravinách rostlinného původu na českém trhu lékařům – alergologům i pacientům samotným.**

## 7. Seznam použité literatury

Badley R.A. et al.(1975) *Biochim Biophys Acta* 412, 214-228.

Cooke S.K., Sampson H.A.(1997): Allergenic properties of ovomucoid in man, *J. Immunol.*, 159: 2026-2032.

Decree No.113/2005 Coll. (the Czech Republic), on the method of labelling food and tobacco products. Date of entry into force: 21.3.2005.

Directive 2003/89/EC of the European Parliament and of the Council of 10 November 2003.

Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council of 20 March 2000.

Directive 2003/89/EC of the European Parliament and of the Council of 21 March 2005.

Djurtoft R. et al. (1991): *Adv. Exp. Med. Biol.*, 286, 281-293.

Eggesbo M., Botten G., Halvorsen R., Magnus P.(2001): The prevalence of allergy to egg: a population-based study in young children, *Allergy* 56: 403-411.

Eigenmann P.A., Huang S.K., Sampson H.A (1996): Characterization of ovomucoid-specific T-cell lines and clones from egg-allergic subjects, *Pediatr. Allergy Immunol.* 7: 12-21.

Kleber, N., Hinrichs, J..(2007): *Milchwissenschaft-Milk Science International*, **62**(2): 121-124.

Kleber, N., Hinrichs, J..(2007): *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **8**(1): 39-45.

Lakemond C.M.M.(2000): *J. Agric Food Chem.*, 48: 1991-1995.

- Maruyama N. et al. (2003): *Phytochemistry*, 64: 701-708.
- Monaci, L., Tregoat, V., van Hengel, A.J., Anklam, E.(2006): *European Food Research and Technology*, **223**(2): 149–179.
- Monreal P., Botey J., Pea M., Marín A., Eseverri J.L. (1992): Mustard allergy. Two anaphylactic reactions to ingestion of mustard sauce, *Ann. Allergy*. 69: 317-320.
- Ogawa T. et al. (1991): *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 37: 555-565.
- Ogawa T. et al. (1995): *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59: 831-833.
- Ogawa T. et al.(2000): *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 46: 271-279.
- Rancé F., Abbal M., Dutau G., (2000): Mustard allergy in children, *Allergy* 55: 496-500.
- Seilmeier W., Valdéz I., Méndez E., Wieser H.(2001): Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species,II. Characterization of  $\omega$ -gliadins. *European Food Research and Technology* 212: 355-363.
- Staswick P.E. et al. (1981): *J. Biol. Chem.*, 256: 8752-8755.
- Staswick P.E. et al. (1984): *J. Biol. Chem.*, 259: 13431-13435.
- Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes, *The EFSA Journal* (2004) 32: 1-197.
- Stern M., Ciclitira P.J., van Eckert R., Feighery C., Janssen F.W., Méndez E., Mothes T., Troncone R., Wieser H.(2001): Analysis and clinical effects of gluten in celiac disease, *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 13: 741-747.
- Wieser H.(1996): Relation between gliadin structure and coeliac toxicity, *Acta Paediatrica Supplement* 412: 3-9.
- Wieser H.(2004): Chemistry and molecular biology of glutenins, In:M.Stern, editor, *Proceedings of the 19th Meeting Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*, Prague, Czech Republic, Verlag Wissenschaftliche Scripten, 143-146, ISBN: 3-937524-23-1.
- Wroblewska, B., Jedrychowski, L., Farjan, M.(2007): *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 62(4): 375 – 379.
- Yaklich R.W.(2001): *J. Agric. Food Chem.*, 49: 729-735.
- Yamauchi F., Yamagishi T., Iwabuchi S. (1991): *Food Rev.Int.* 7: 283-322.