

Élelmiszer-allergia, -biztonság, -analitika

Tömösközi Sándor – Hajas Livia – Langó Tamás –
Török Kitti – Bugy Zsuzsanna

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott
Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék, Budapest
tomoskozi@mail.bme.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Az élelmiszerallergia az ételekben előforduló fehérjékkel szemben jelentkező túlérzékenységi reakció. Az ilyen típusú megbetegedések nemcsak az érintetteknek jelentenek személyes kellemetlenséget, hanem súlyos egészségügyi, élelmiszerbiztonsági és élelmiszeranalitikai, társadalmi-gazdasági problémát vetnek fel. A betegség egyetlen biztos kezelési módja a diéta, melynek elősegítésére az élelmiszerek csomagolásán a 14 leggyakoribb allergén komponens kötelezően jelölendő. A törvényi előírások betartásának ellenőrzésére megbízható, validált analitikai módszerek szükségesek, melyek azonban a legtöbb allergén forrás esetében nem, vagy csak korlátozottan állnak rendelkezésre.

Kulcsszavak: allergia, élelmiszerbiztonság, élelmiszeranalitika

SUMMARY

The food allergy is a hypersensitivity reaction against naturally occurring proteins in food. These types of disease can cause not only personal inconvenience to the patient but serious health, food safety and food analysis, social-economic problems. The only effective treatment for these illnesses is a life-long diet avoiding the allergenic foods or components of food. In the interest of the patients' health 14 allergenic components must be labeled on the food packaging. To meet the requirement of regulation reliable and valid analytical methods are necessary which for the most allergenic foods are not available.

Keywords: allergy, food safety, food analysis

BEVEZETÉS

A gabonafélék táplálkozástani szempontból a legfontosabb élelmiszereink közé tartoznak, azonban a bennük található fehérjék több, eltérő patomechanizmusú kóros folyamatot képesek elindítani az emberi szervezetben. Egy érett gabonaszem fehérjetartalma 8–20%, melyet albuminok, globulinok, prolaminok és glutelinok alkotnak. A búzában megtalálható tartalékfehérjék, a gliadinok és gluteninek, vízzel kölcsönhatásba lépve alakítják ki a sikérszerkezetet, melynek fehérje összetétele a búza sütőipari minőségét és a tézta funkcionális tulajdonságait határozza meg (Khan et al., 2010). Ugyancsak fehérjék játszanak szerepet a lisztérzékenység (cöliákia) kialakulásában is, amely egy T-sejt mediált autoimmun bélbetegség (Vereckei et al., 2011). A búza által indukált allergiás reakció során IgE mediált és sejtmediált immunológiai folyamatok is zajlanak a normál esetben ártalmatlan gabonafehérjékkel szemben. Az allergiát okozó fehérjék valamennyi búzafrakcióban megtalálhatók, a cöliákiát kiváltó, toxikus fehérjék csak a prolamin és glutelin frakciókban ismertek (Hischenhuber et al., 2006).

Mindkét betegség, a cöliákia és a búzaallergia, egyetlen elterjedten alkalmazott kezelési módja a szigorú diéta. Ha a beteg valamennyi glutént tartalmazó gabonafélét száműz az étrendjéből, a tünetek megszűnnek (Briani et al., 2008; Niewinski, 2008). A 2009/41/EK értelmében a gluténérzékenyek táplálkozási igényeinek megfelelő élelmiszereket jelöléssel kell ellátni. „Nagyon alacsony gluténtartalmú” kifejezést kell feltüntetni, ha 100 mg/kg mennyiségű búzából, rozsból, árpából vagy zabból származó glutént nem tartalmaz az élelmiszer. A „Gluténmentes” megjelölés a 20 mg/kg glutén szintet nem meghaladó élelmiszerek esetében használható. Ezáltal a beteg az igényeinek és érzékenységének megfelelő élelmiszert tudja választani a piacon kapható termékek közül (Európai Közösségek Bizottsága, 2009).

A diéta betartását megnehezíti, hogy a gabonafélék és származékaik (pl. keményítő, sikkó stb.) számtalan élelmiszertermékben előfordulnak (Briani et al., 2008; Niewinski, 2008). Emellett a glutén eltávolítása a glutént tartalmazó gabonából jelentős technikai nehézséget okoz, nehéz teljesen gluténmentes élelmiszert gyártani, tehát a piacon jelenlévő, cöliákiásoknak szánt élelmiszerek is tartalmazhatnak kis mennyiségű glutént (Európai Közösségek Bizottsága, 2009). Az eredetileg gluténmentes élelmiszerek is kontaminálódhatnak toxikus gabonafehérjékkel a szállítás és tárolás során, a feldolgozás alatt, inadekvát tisztítás során vagy megosztott feldolgozó berendezésről történő átvitelrel (Poms és Anklam, 2004). Ezen okokból olyan gabonafehérjék meghatározására alkalmas analitikai módszerekre van szükség, melyek nagyfokú specifitással és érzékenységgel rendelkeznek a glutén fehérje jelenlétének detektálásához (Besler, 2001; Krska et al., 2004). A gabonafogyasztás által kiváltott túlérzékenységi reakciók komplex példaként szolgálhatnak az általános élelmiszerallergiával kapcsolatos jelenségekre és problémákra, ezért a következőkben ilyen szemléletben alakítjuk a tárgyalásmódot.

ALLERGÉANALITIKA

Az allergiát kiváltó élelmiszerek több százféle fehérjét is tartalmazhatnak, ezek közül csak néhány azonosított allergénként (Taylor et al., 2009). Az élelmiszerekben rendszerint nem egy allergén fehérje fordul elő, hanem több fehérje is tartalmazhatja azon epitópot, melyek a rendellenességek kialakulásáért felelősé tehetők. Ezek nagy változatosságot mutathatnak mennyiségükben és összetételükben az eltérő származási hely, termesztési körülmények és feldolgozottsági szint következtében (Lacorn és Immer, 2010).

Az allergén fehérjék kimutatására alkalmas analitikai módszerekkel egy olyan specifikus marker detektálása történik, melyből az adott allergén fehérje jelenlétére következtethetünk. Mérési elvük alapján a módszerek három csoportját különböztetjük meg. A kromatográfiás módszerek segítségével a fehérjék fizikai szeparációja lehetséges méretük, töltésük vagy hidrofóbicitásuk alapján. Habár ezen módszerek időigényesek, költségesek és kevésbé érzékenyek, tömegspektrometriás detektálást alkalmazva megfelelő megerősítő módszer lehet, emellett alkalmas a fehérje allergiát kiváltó komponensét azonosítani. A DNS alapú módszerek, ezen belül a real-time polimeráz láncreakció alapja a specifikus DNS szegmens amplifikációja és on-line detektálása specifikus primerek segítségével. Mivel a DNS stabilabb, mint a fehérje, és nem ismert az élelmiszer DNS és fehérje tartalma közötti összefüggés, a polimeráz láncreakció megfelelő megerősítési módszer, de további standardizálás nélkül nem alkalmas pontos kvantitatív meghatározáshoz. Az antitest alapú módszerek, mint az ELISA megfelelő extrakciós módszer, jól karakterizált antitestek és kalibráló anyagok alkalmazásával rendkívül specifikus módszer egy adott epitópra vagy fehérjére. Az ELISA kitekkel ellentétben az immunkromatográfiás gyorsesztek csak közelítő kvantitatív meghatározás céljából alkalmazhatóak, elsősorban kvalitatív eredményt szolgáltatnak. A tesztek használata, a mérések kivitelezése egyszerű és csak pár percet vesz igénybe, a termelői láncban és higiénias ellenőrzések során elterjedten alkalmazzák (Lacorn és Immer, 2010).

A glutén fehérjék vizsgálatához elterjedten használt módszerek az ELISA és a tömegspektrometria (Hischenhuber et al., 2006). Az epitóp függő módszerek, mint az ELISA, a mért gliadin tartalom alapján ugyan megadja a minta teljes glutén tartalmát, az egyes gabonafajtákból származó fehérjéket nem tudja megkülönböztetni. Ezzel szemben a mátrixhoz kötött lézer deszorpció/ionizáció-repülési idő tömegspektrometria (MALDI-TOF) megfelelő komplex gabonafehérje keverékekben a búza, árpa és a rozs glutén fehérje tartalmának szimultán és szelektív azonosítására (Camafeita et al., 1998). Azonban a MALDI-TOF MS 20–25 ppm-nél nagyobb prolamin koncentráció esetén alkalmazható, melynek következtében az alacsony prolamin tartalmú élelmiszereknél nem megfelelő módszer a glutén tartalom meghatározásához. A tömegspektrometriai eljárásokat elsősorban a glutén fehérjék karakterizálására alkalmazzák (Mujico et al., 2011).

Gluténmentes termékekben a glutén fehérje mennyiségi meghatározására olyan analitikai módszerre van szükség, melynek kimutatási határa 10 ppm glutén alatt van és megfelelő specifitással és érzékenységgel rendelkezik. Ezen feltételeknek megfelelően a Codex Alimentarius a glutén mennyiségi meghatározására immunanalitikai módszert, a szendvics R5 ELISA-t javasolja (Codex Alimentarius, 2008).

AZ ELISA ÉS KORLÁTAI

A glutén fehérjék kvantitatív méréséhez számos kereskedelemben kapható ELISA kit alkalmazható. Azonban az egyes gyártók és laboratóriumok eltérő ellenanyagot, extrakciós eljárást, valamint kalibráló

anyagot használnak fel az általuk kidolgozott ELISA tesztekhez, megnehezítve ezáltal a módszerek standardizálását (Hischenhuber et al., 2006). Számtalan antitest létezik a glutén fehérjék meghatározására, monoklonális és poliklonális antitestek egyaránt, melyek közül a két legismertebb és legelterjedtebben alkalmazott az AOAC által jóváhagyott a Skerritt-féle, ω -gliadinra specifikus monoklonális ellenanyag és a Codex által javasolt a QPPFP toxikus epitópra specifikus R5 monoklonális ellenanyag (Thompson és Méndez, 2008). A natív prolaminok 60–70 (v/v)%-os víz-etanol elegyben oldhatók. Azonban hőkezelés hatására a prolaminok és glutelinek a diszulfid hidak révén kovalens kötésekkel kapcsolódnak, ezáltal megváltozik oldhatóságuk. Hőkezelt élelmiszerek esetében manapság széles körben alkalmazzák az ún. koktél oldatot, mely redukáló ágens (merkaptóetanol) és disszociáló komponenst (guanidinium-klorid) tartalmaz. A piacon kapható ELISA kitek között megtalálható a csak alkoholos extrakciót és a koktél oldatot alkalmazók is (Gessendorfer et al., 2010). A glutén meghatározására elvégzett ELISA vizsgálatok eredménye nemcsak az alkalmazott antitesttől, és extrakciós módszertől függ, hanem nagymértékben meghatározza a használt kalibráló anyag is. Az egyes ELISA kitek fejlesztése során a gyártók és a laboratóriumok nem ugyanazon sztenderdet alkalmazzák, több lehetőség közül választhatnak. A Prolamin Munkacsoport megtette az első lépést a teszteredmények standardizálása felé, amikor kifejlesztettek egy ún. „PWG-gliadin” referencia gliadint, a 28 leggyakoribb európai búzafajta felhasználásával. A PWG gliadin magas fehérje és gliadintartalommal bír, megfelelő oldhatóság, homogenitás és stabilitás jellemzi, mely lehetővé teszi univerzális kalibráló anyagként történő felhasználását (van Eckert et al., 2006; van Eckert et al., 2010).

A Codex bizottság által javasolt R5 szendvics ELISA a Prolamin Munkacsoport által validált módszer, melyhez a Munkacsoport által kifejlesztett gliadin standardot használták. Alkalmas a búza, a rozs, és az árpa teljes prolamin fehérjéinek kvantitatív meghatározására. Natív és hőkezelt fehérjék vizsgálatára is megfelelő, mivel az epitóp hővel szemben ellenálló és az alkalmazott koktél oldattal a teljes gliadin tartalom kinyerhető. A módszer hátránya, hogy hidrolizált glutén fehérjék meghatározására nem alkalmas. A szendvics módszer sajátosságából adódóan a két szükséges epitóp jelenlétének hiányában nem detektálható a toxikus fragment. A kompetitív ELISA azonban csak egy epitópot igényel, ezáltal a hidrolizált prolaminok is vizsgálhatóvá válnának ezen módszer segítségével. A kompetitív R5 ELISA hátránya, hogy a koktél oldattal nem kompatibilis, csak az alkoholos extrakciós eljárással (Thompson és Méndez, 2008). A probléma megoldására egy új extrakciós oldatot, az ún. UPEX oldatot fejlesztettek ki, mely redukáló ágensként TCEP-t tartalmazott. A TCEP nemcsak hatékonyabb a merkaptóetanolhoz képest, hanem kevésbé ártalmas az emberi szervezetre (Mena et al., 2012). Fermentált búza, rozs és árpa termékekben a hidrolizált glutén megbízható kvantitatív meghatározásához már enzimesen kezelt kalibráló anyagok is rendelkezésre állnak (Gessendorfer et al., 2009).

REFERENCIAANYAG FEJLESZTÉSE

Az élelmiszer allergének oldhatósága pH, hő- vagy egyéb fizikai kezelés hatására, aggregálódás és/vagy komplexálódás következtében megváltozik. Azonban az, hogy a fehérje nem oldható, ezáltal nem extrahálható az élelmiszermatrixból, nem jelenti, hogy a fehérje allergenitása is megváltozik. A célfehérje epitópja a feldolgozás folyamata alatt kémiai módosuláson eshet át, mely befolyásolja az immunanalitikai módszerek által szolgáltatott eredmény pontosságát. A módszerfejlesztést és validálást megnehezítő körülmény, hogy nem áll rendelkezésre referencia módszer az alkalmazott mérési eljárás helyességének igazolására. Tanúsított referenciaanyag hiányában pedig nem lehetséges a különböző ELISA kitek eredményeinek összehasonlítása (Taylor et al., 2009; Bugyi et al., 2012).

A fent említett problémák kiküszöbölésére a MoniQA Nemzetközi Kiválóságághálózat támogatásával megkezdődhetett egy gliadin izolátumot tartalmazó reális élelmiszermatrix fejlesztése. A kezdeti inhomogenitási és alacsony visszanyerési problémák megoldása után, sikerült előállítani egy olyan feldolgozott, sült modellterméket, mely deklarált mennyiségben és homogén eloszlásban tartalmazott PWG-gliadint. A labor szinten előállított modelltermék elősegíti az immunanalitikai módszerek fejlesztését, validálását, valamint a feldolgozott termékekben történő megbízhatóbb meghatározást.

A referenciaanyag jelölt modelltermék lehetőséget ad a kereskedelmi forgalomban kapható hét ELISA kit eredményeinek összehasonlítására. A vizsgálatok alapján számos kit alá vagy felé becsüli az elméleti gliadin tartalmat. Az eltérő eredmények háttérben a fentebb részletesen tárgyalt problémák állhatnak, melyek rövi-

den a következők: a kitek különböző extrakciós módszereket és antitesteket használnak, a különböző toxikus fehérjékre/epitópokra kifejlesztett extrakciós oldatok és antitestek nem egyforma hatékonysággal és specifitással rendelkeznek a különböző forrásból származó gliadinok esetében, a kitek az egyes búzafajtákban változó gliadin/glutenin arányt állandó 1:1 összetételnek tekintve használják az eredmények megadásához (Bugyi et al., 2012). A különböző gyártóktól származó ELISA kitekkel kapott eredmények összevetése is mutatja a jelenlegi allergénvizsgálatok bizonytalanságát.

A referenciaanyag jelölt modelltermék tanúsítását, univerzális felhasználását elősegítő vizsgálatok (pl. stabilitásvizsgálat) és fejlesztések a mai napig tartanak. Az ELISA kitekkel mért fehérje koncentrációkban mutatkozó eltérések okainak feltárása jövőbeni céljaink között szerepel. A teljes fehérjeösszetétel analíziséhez és a feldolgozási folyamat során bekövetkező változások azonosításához más mérés technikák (Lab-On-a-Chip, RP-HPLC, HPLC-MS) bevezetése is szükséges. Az elválasztástechnikai módszerek és más gliadin források bevonásával az érzékenységet kiváltó fehérje komponensek búza fajtákban lévő mennyiségi eltéréseinek, variabilitásának vizsgálata és az ebből eredő analitikai hiba nagyságrendjének megállapítása is lehetővé válik.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatómunkát az EU 6. Keretprogramja által finanszírozott MoniQA Kiválóságághálózat (Monitoring and Quality Assurance in the Food Supply Chain, FOOD-CT-2006-036337) támogatta.

IRODALOM

- Besler, M. (2001): Determination of allergens in foods. *Trends in Analytical Chemistry*. 20. 11: 666–672.
- Briani, C.–Samaroo, D.–Alaedini, A. (2008): Celiac disease: From gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 7: 644–650
- Bugyi, Zs.–Török, K.–Hajjas, L.–Adonyi, Zs.–Poms, R. E.–Popping, B.–Diaz-Amigo, C.–Kerbach, S.–Tömösközi, S. (2012): Development of Incurred Reference Material for Improving Conditions of Gluten Quantification. *Journal of AOAC International*. 95. 2: 382–387.
- Camafeita, E.–Solís, J.–Alfonso, P.–López, J. A.–Sorell, L.–Méndez, E. (1998): Selective identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-light mass spectrometry of different types of gluten foods made with cereal mixtures. *Journal of Chromatography A*. 823: 299–306.
- Codex Alimentarius (2008): Codex Standard for Food for Special Dietary Use fo Persons Intolerant to Gluten. CODEX STAN 118–1979. http://www.codexalimentarius.net/download/standards/291/cxs_118e.pdf
- Európai Közösségek Bizottsága (2009): A Bizottság 41/2009/EK rendelete (2009. január 20.) a gluténérzékenyeknek szánt élelmiszerek összetételéről és címkézéséről. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:171:0048:0050:HU:PDF>
- Gessendorfer, B.–Koehler, P.–Wieser, H. (2009): Preparation and characterization of enzymatically hydrolyzed prolamins from wheat, rye, and barley as references for the immunochemical quantitation of partially hydrolyzed gluten. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. 395: 1721–1728.
- Gessendorfer, B.–Wieser, H.–Koehler, P. (2010): Optimisation of a solvent for the complete extraction of prolamins from heated food. *Journal of Cereal Science*. 52: 331–332.
- Hischenhuber, C.–Crevel, R.–Jarry, B.–Mäki, M.–Monoret-Vautrin, D. A.–Romano, A.–Troncone, R.–Ward, R. (2006): Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 23: 559–575.
- Khan, M. R.–Anjum, F. M.–Din, A.–Hussain, S.–Shabbir, M. A.–Nadeem M. (2010): Immunochemical characteristics of wheat proteins. *Food and Agricultural Immunology*. 21: 279–294.
- Krska, R.–Welzig, E.–Baumgartner, S. (2004): Immunoanalytical detection of allergenic proteins in food. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. 378: 63–65.
- Lacom, M.–Immer, U. (2010): Standardization in allergen determination. *Accred Qual Assur*. 15: 207–216.
- Mena, C. M.–Lombardía, M.–Hernando, A.–Méndez, E.–Albar, P. J. (2012): Comprehensive analysis of gluten in processed foods using a new extraction method and a competitive ELISA based on the R5 antibody. *Talanta*. 91: 33–40.

- Mujico, J. R.–Lombardía, M.–Mena, M. C.–Méndez, E.–Albar, J. P. (2011): A highly sensitive real-time PCR system for quantification of wheat contamination in gluten-free food for celiac patients. *Food Chemistry*. 128: 795–801.
- Niewinski, M. M. (2008): Advances in Celiac Disease and gluten-free diet. *Journal of the American Dietetic Association*. 108: 661–672.
- Poms, R. E.–Anklam, E. (2004): Polymerase Chain Reaction Techniques for Food Allergen Detection. *Journal of AOAC International*. 87. 6: 1391–1397.
- Taylor, S. L.–Nordlee, J. A.–Niemann, L. M.–Lambrecht, D. M. (2009): Allergen immunoassays-considerations for use of naturally incurred standards. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. 395: 83–92.
- Thompson, T.–Méndez, E. (2008): Commercial Assays to Assess Gluten Content of Gluten-Free Foods: Why They Are Not Created Equal. *Journal of the American Dietetic Association*. 108: 1682–1687.
- van Eckert, R.–Berghofer, E.–Ciclitira, P. J.–Chirido, F.–Denery-Papini, S.–Ellis, H. J.–Ferranti, P.–Goodwin, P.–Immer, U.–Mamone, G.–Méndez, E.–Mothes, T.–Novalin, S.–Osman, A.–Rumbo, M.–Stern, M.–Thorell, L.–Whim, A.–Wieser, H. (2006): Towards a new gliadin reference material isolation and characterisation. *Journal of Cereal Science*. 43: 331–341.
- van Eckert, R.–Bond, J.–Rawson, P.–Klein, Ch. L.–Stern, M.–Jordan, T. W. (2010): Reactivity of gluten detecting monoclonal antibodies to a gliadin reference material. *Journal of Cereal Science*. 51: 198–204.
- Vereckei, E.–Szodoray, P.–Poor, Gy.–Kiss, E. (2011): Genetic and immunological process in the pathomechanism of gluten-sensitive enteropathy and associated metabolic bone disorders. *Autoimmunity Reviews*. 10: 336–340.