



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA

Túlérzékenységi reakciókat kiváltó összetevők tulajdonságainak tanulmányozása valós élelmiszermátrixokban

Tézisfüzet

Szerző: Török Kitti
Okleveles biomérnök
Témavezető: Dr. Tömösközi Sándor
Egyetemi docens

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék

2014

1 Bevezetés, célkitűzések

Az élelmiszerekkel szemben jelentkező túlérzékenységi reakciók (allergia, cöliákia) komoly élelmiszerbiztonsági problémát jelentenek. A fő kezelési mód minden esetben az élelmiszer elkerülése, ennek megvalósítása azonban problémás lehet.

A tünetek kiváltásáért az adott élelmiszer összetevők egyes fehérjei felelősek. Az allergének (antigének) ellenanyaghoz való kötődés az ún. epitópokon keresztül megy végbe. Az epitópok a fehérje azon immunreaktív szakaszai, melyet az ellenanyagok felismernek. A különböző élelmiszerkomponensek azonban változatos fehérje összetétellel rendelkeznek, több olyan fehérjét tartalmaznak, amelyben található túlérzékenységi reakciót kiváltó epitópok, valamint egy antigén felületén is több epitóp helyezkedhet el, melyek az immunreakciókban egymástól függetlenül vesznek részt. Elmondható továbbá, hogy valós élelmiszerekben a feldolgozási folyamatok hatására a fehérjék kölcsönhatásba léphetnek más fehérjékkel valamint az élelmiszer mátrix egyéb komponenseivel is. A különböző feldolgozási folyamatok során az immundomináns epitópokban is történhet változás, ami potenciálisan érintheti a fehérje kedvezőtlen élettani hatást kiváltó részét. A jelenlegi szakirodalom azonban nem egységes ebben a témában. Mind a reakciót kiváltó fehérjék száma, mind az egyes fehérjék epitóp szekvenciái, mind pedig a fehérjék viselkedése vitatott kérdések.

A túlérzékenységi reakciót kiváltó összetevők élelmiszerekből történő meghatározása élelmiszerbiztonsági és gazdasági szempontból is fontos kérdés. Az allergiában, cöliakiában szenvedő fogyasztók biztonsága érdekében elengedhetetlen a megbízható élelmiszerek elérhetősége, valamint a megfelelő tájékoztatás. Ehhez szükség van megfelelő technológiára az élelmiszerek gyártásában, valamint megbízható analitikai módszerekre az ellenőrzéshez. A túlérzékenységi reakciókat kiváltó komponensek minőségi és mennyiségi meghatározására számos módszer létezik. Nem állnak rendelkezésre azonban referencia módszerek és általánosan elfogadott tanúsított referencia anyagok sem. Ezek hiánya nagyban nehezíti a módszerek érvényesítését. A rutin analitikában az ELISA módszer terjedt el nagyfokú specifitása és könnyű kezelhetősége miatt. A kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kitekről azonban elmondható, hogy a különböző tesztek jelentősen eltérhetnek egymástól. A célfehérjék is különbözőek lehetnek, például a tejfehérjék jelenlétének kimutatására és mennyiségi mérésére alkalmas ELISA kitek esetén léteznek kazeineket és/vagy β -laktoglobulint meghatározó kitek is. A célfehérjék mellett az alkalmazott extrakciós oldatok, a minta előkészítés módszertana, a kalibráló anyagok és az analitikai teljesítményjellemzők is nagyon eltérhetnek. Ennek következtében az ugyanannak a komponensnek a meghatározására

fejlesztett különböző ELISA kitek kisebb nagyobb mértékben eltérő eredményeket produkálhatnak.

Az élelmiszerek gyakran egynél több allergén összetevőt tartalmaznak, így a módszerfejlesztés egy viszonylag új irányát a multikomponens analízist lehetővé tevő technikák fejlesztése jelenti. Kézenfekvőnek tűnik tehát az igény olyan modellmátrixok létrehozására, melyek lehetőséget biztosítanak több allergén egyidejű jelenlétének vizsgálatára és a kapcsolódó módszertan érvényesítésére is.

A Tanszéken folyó kutatómunka alapját olyan referencia anyag jelölt modelltermékek fejlesztése jelentette, melyek meghatározott mennyiségben tartalmaznak tej, tojás vagy gliadin fehérjéket feldolgozott élelmiszert modellező mátrixban. Ennek során a kutatócsoportunk korábban a modelltermékek receptjeit, valamint az előállításuk módszertanát dolgozta ki. A kifejlesztett eljárás biztosítja a kis mennyiségben (ppm) jelenlévő, allergénforrásként használt referencia tejpör, referencia tojáspor illetve gliadin izolátum homogén eloszlását. A modelltermékek készítése során az előállítási folyamat minden lépéséből történő mintavétel lehetővé tette, hogy a feldolgozási folyamat fázisainak (különös tekintettel a hőkezelésre) a mérhető allergén tartalomra gyakorolt hatását is tanulmányozni lehessen. Megállapítást nyert, hogy a termék előállítás egyik lépését képviselő hőkezelés (sütés) jelentősen csökkenti a mérhető fehérjekoncentrációt. A kutatócsoportunk fejlesztésének eredményeként megvalósított gliadin tartalmú referencia anyag jelölt modellmátrix pedig először nyújtott lehetőséget, azonos célú, vagyis sikér/gliadin tartalom mérésére alkalmas ELISA kitek kontrollált körülmények között történő összehasonlítására. A kísérletsorozat eredményei egyértelműen mutatják, hogy a kitek által szolgáltatott analitikai eredmények rendkívül széles tartományban szórnak, a natív fehérjék esetében 60-600 %, a hőkezelt mátrixoknál 15-400 %-os tartományban szolgáltatott visszanyerési értékeket. Ezek az előzetes eredmények határozottan rámutatnak a jelenleg alkalmazott allergén analitikai módszerek, elsősorban az ELISA tesztek bizonytalanságának mértékére, jellegére és bizonyos esetekben a hibák forrására is. A feltárt hibák mértéke jelentősnek mondható egy olyan területen, ahol a szabályozás allergének esetében zéró toleranciát, illetve glutén esetében 20 illetve 100 ppm határértéket követel meg. Ennek eredményeként csökkenti a fogyasztók biztonságát, rontja az adott terület élelmiszerbiztonsági helyzetét, bizonytalanná teszi az ellenőrzés és a szankcionálás lehetőségeit, vagyis érinti a teljes vertikum valamennyi szereplőjének tevékenységét. Ezért kulcskérdésnek tűnik a feltárt hibák azonosítása és azok alapján a vizsgálati módszerek fejlesztése.

Ennek érdekében a doktori értekezésem alapjául szolgáló kutatás célkitűzései a következők:

- Az élelmiszer feldolgozás során alkalmazott egyes technológiai lépések – hidratáció, hőkezelés – célfehérjékre gyakorolt hatásának vizsgálata, az ELISA módszerekkel mérhető koncentráció csökkenés okainak feltárása.
- Az egyéb mátrixalkotó makrokomponensek hatásának vizsgálata allergén fehérjék meghatározhatóságára.
- Több allergénforrást (tej, tojás, glutén, szója) együttesen tartalmazó feldolgozott élelmiszert modellező mintamátrixok kidolgozása és jellemzése.
- A referencia anyag jelölt modelltermékek stabilitásának vizsgálata.

2 Anyagok és módszerek

A kutatómunkánk során egyedi vagy több allergén komponenst együttesen tartalmazó sütőipari termékeket modellező laboratóriumi mintamátrixokat fejlesztettünk és jellemeztünk. A vizsgálatokat a termék előállítás mindhárom jellemző fázisban – alapanyag porkeverék, tészta és hőkezelt (sütött) termék – elvégeztük. A modelltermékek kidolgozásának alapjául Kormosné Bugyi Zsuzsanna (2012)¹ doktori munkájában fejlesztett PWG gliadin izolátummal készült referencia anyag előállításának módszertana szolgált. Jelenlegi munkámban a négy, hazánkban leggyakrabban előforduló allergiát kiváltó komponenst (tej, tojás, szója és gliadin) egyenként vagy együttesen tartalmazó modelltermékek fejlesztését valósítottuk meg. Mivel ez a tevékenység a kutató-fejlesztő munka részét képezi, ezért ezen munkafázis eredményeit a 3.1 fejezetben ismertetem részletesen. A modelltermékek kidolgozásához referencia anyagokat (IRMM-BCR 380R referencia tejpor, NIST 8415 referencia tojáspor, NIST 3234 referencia szójaliszt, PWG gliadin izolátum²) használtunk allergénforrásként, azonban ezek az anyagok kémiai összetételi adatokra és nem allergén vizsgálatokra hitelesített anyagminták. A nyers tészta és a sütemény modelltermékek egy részét az analitikai vizsgálatokat megelőzően a mintaelőkészítés és a mátrixhatás vizsgálatának céljából zsírtalanítottuk.

¹Kormosné Bugyi Zsuzsanna (2012): Élelmiszer-allergének mennyiségi meghatározására alkalmas analitikai módszerek alkalmazási környezetének fejlesztése. Doktori értekezés.

²van Eckert R., Berghofer E., Ciclitira P.J., Chirido F., Denery-Papini S., Ellis H.J., Ferranti P., Goodwin P., Immer U., Mamone G., Mendez 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.

Az ELISA mérések kivitelezéséhez az R-Biopharm Ridascreen Fast Milk, Ridascreen Fast Ei/Egg Protein, Ridascreen Fast Soya, Ridascreen Gliadin és a Romerlabs AgraQuant Casein, AgraQuant Egg white, AgraQuant Soy, AgraQuant Gluten G12 kitéket használtuk. A modelltermékek fehérjeprofilióját és -alegység összetételét SDS-PAGE, Lab-on-a-chip és SE-HPLC módszerekkel vizsgáltuk. A mért eredmények statisztikai értékelését az átlagok és szórások vizsgálatával, F- és t-próbák elvégzésével, valamint varianciaanalízissel végeztük. A 2-, 3- és 4-faktoros ANOVA eredményeket használtuk az analitikai hiba összetevőinek kvantitatív meghatározására.

3 Eredmények és értékelés

3.1 Reális élelmiszereket modellező kísérleti mátrixok fejlesztése

Az allergénforrás változásának ELISA módszerrel történő elemzéséhez, valamint a hőkezelés hatásainak méretkizárásos kromatográfiával (SE-HPLC) történő vizsgálatához a gliadin tartalmú modelltermékben a PWG gliadint standard búzalisztre cseréltük. A búzaliszt fehérje, illetve szárazsíkér tartalma alapján meghatároztuk a szükséges búzaliszt mennyiségét a 10 és 50 ppm gliadin tartalmú, valamint a 2 %-os búzafehérje tartalmú végtermékek eléréséhez.

A mátrixhatás vizsgálatához az egyedi és multi komponens tartalmú modellmátrixokat kevésbé standardizálható, kereskedelmi forgalomban kapható gluténmentes lisztkeverék mellett a jelenlegi tudásunk szerint allergénmentesnek számító amaránt liszttel is elkészítettük.

Ahhoz, hogy az alkalmazott fehérjeforrásoknak a technológiai műveletek során bekövetkező összetételi változásait a számunkra rendelkezésre álló, közvetett következtetések levonására alkalmas analitikai módszerekkel (elektroforetikus technikák) vizsgálni tudjuk, a mérést zavaró egyéb fehérje komponensektől mentes modelltermékek összeállítására volt szükség, melyekben a vizsgált fehérjék koncentrációját a mérés érzékenységének megfelelő szintre kellett növelni. Ez esetben a kísérleti követelményeknek megfelelő, ellenőrzött allergénmentes kukoricakeményítő alapú egyedi és multi mátrixokat állítottunk elő, melyben a fehérjeforrások egyedi koncentrációja 2 % volt.

Mindhárom esetben új mátrixok előállításának módszertanát dolgoztuk ki. A mátrixokban a fehérjeeloszlás homogenitását ELISA módszerrel, a keményítőalapú termékek esetében fehérjetartalom méréssel állapítottuk meg. Az eredményeink statisztikai értékelése azt mutatta, hogy valamennyi mintamátrix a vizsgálati

céloknak megfelelő fizikai-kémiai tulajdonságokkal és homogenitással rendelkezett. A keményítő alapú terméknek a későbbi referenciaanyag fejlesztési munkában is jelentős szerepe lehet.

3.2 Mátrixhatás vizsgálata

A gluténmentes lisztkeverékkel és az amaránt liszttel készült modelltermékek ELISA eredményeinek összehasonlító elemzésénél megállapítottuk, hogy az amaránt liszttel készült mátrixokban szignifikánsan alacsonyabb koncentrációk mérhetők mind a négy túlérzékenységi reakciót kiváltó komponens esetében. A használt lisztek fizikai-kémiai jellemzői és fehérjeprofíljuk különbözik, így előfordulhat, hogy az allergén fehérjék fizikai-kémiai kölcsönhatásokat alakítottak ki az amaránt liszt komponenseivel, mely változtatott az oldhatósági tulajdonságaikon, extrahálhatóságukon, illetve az antitesthez történő kapcsolódás mértékén. Valószínűsíthető tehát, hogy a tapasztalt eltérések oka ezen különbségekben keresendő.

Vizsgáltuk továbbá a lipidek, mint mátrixalkotó komponensek hatását a fehérjék meghatározására egy, az ELISA mintaelőkészítést megelőző zsírtalanítási lépés beiktatásával. A tej- és gliadin fehérjéket tartalmazó mátrixok esetében szignifikánsan nőtt a visszanyerés értéke a zsírtalanítás után; a tojás és a szója esetében viszont mintatípusonként változó, nem minden esetben szignifikáns, és eltérő irányú változást mértünk az ELISA tesztekkel. Úgy tűnik tehát, hogy a zsírtalanítás hatása nem általánosítható, függ a célfehérje típusától és a fehérje extrakció során alkalmazott mintaelőkészítési módszertől, illetve az alkalmazott ELISA teszt típusától is. Eredményeink azt jelzik tehát, hogy a lipid extrakció befolyásolhatja az analitikai eredményt, különösen a nagy zsírtartalmú vizsgálati minták esetében. Az eredmény kézenfekvőnek tűnhet, hiszen a gliadin kitek kivételével a fehérjék vizes fázisú extrakcióját alkalmazzák a vizsgált tesztek. A zsírtalanítást azonban, mint mintaelőkészítő lépést eddig a rutinanalitikában használt egyetlen kit sem írja elő. Eredményeink alapján a zsírtalanítást a kitek mintaelőkészítő lépéseként történő alkalmazására javasoljuk a meghatározás pontosságának javítása érdekében a magas zsírtartalmú élelmiszerek esetén.

A harmadik típusú mátrixhatás vizsgálat szintén a reális termékeket jobban modellező fehérjeforrás komplexitásának változtatására irányult. Analitikai szempontból jobban kezelhető olyan mintamátrix/referenciaanyag használata, melyben a hozzáadott komponens jól definiált, izolált fehérje, melynek esetünkben a PWG gliadin izolátum felelt meg. Azonban a reális élelmiszerminták túlnyomó többsége búzalisztból, illetve annak frakcióiból származó fehérjéket – és egyéb komponenseket tartalmaz. Ennek a különbségnek az analitikai

eredményekben azonosítható hatását kívántuk vizsgálni izolált gliadinnal illetve búzaliszttal készült modelltermékek segítségével. Mérési eredményeink azt mutatják, hogy a búza, mint gliadin forrás alkalmazása esetén a mért koncentrációk szignifikánsan magasabbak, mint a gliadin izolátummal készült termékek esetében. Míg az izolátummal készült termékekben mérhető koncentráció az elméleti koncentráció közelében vagy az alatt van, addig a búzaliszt esetében annál lényegesen magasabb. Az eltérés mértéke azonban mintatípusonként változott. Az itt kapott eredmények ráirányítják a figyelmet a jelenlegi allergén analitikában jelen lévő egyik legnagyobb problémára: az analitikai pontosság kérdésére és ennek következtében az érvényben lévő szabályozás gyenge pontjaira. Ezek az analitikai hibák a glutén/gliadin esetében számszerűsíthetők, melyet a fejlesztett modelltermékek segítségével elsőként meg is tettünk. A jelenség valamennyi fehérje, illetve komplex fehérjeforrás esetére általánosítható.

Végezetül az egyik leginkább jellemező élelmiszer-összetételi szituációt jellemeztük több allergén fehérje együttes jelenlétének vizsgálatával. Az eredmények alapján elmondható, hogy bizonyos mintáknál különbségek figyelhetők meg az egyedi és multi komponens tartalmú mátrixok analitikai eredményei között. Megállapítható azonban az is, hogy sem az alapanyag, sem a kit, sem pedig a feldolgozottsági szintek esetén nem állíthatók fel egyértelmű tendenciák a visszanyerés értékek és a párhuzamosok közti szórások alakulásában, a hatások a legtöbb esetben nem szignifikánsak.

Az egyedi és multi komponensű minták összehasonlítása és az alapanyag változtatásának vizsgálata ugyanannak a kísérlet sorozatnak a részét képezi, így lehetőségünk volt ezen faktorok hatásának komplex statisztikai értékelésére. A szóráskomponensek meghatározása arra ad választ, hogy az eltérő mért eredményeket milyen mértékben befolyásolták az egyes faktorok (jelen esetben a különböző alapanyag használata és a több komponens egyidejű jelenléte), illetve a párhuzamosok közti szórások. Az ANOVA analízis alapján elmondható, hogy a mért eredmények ingadozását legnagyobb részt az alapanyag megválasztása adja. Ezen hatás már akkora különbséget eredményez a mért értékekben, mely az egyedi és multi minták között tapasztalt különbséget elnyomja.

A doktori munkám során ebben a témakörben elvégzett kísérletek felhívják a figyelmet a változatos összetételű élelmiszerek okozta analitikai nehézségekre, az allergén fehérjék viselkedésének pontosabb megismeréséhez azonban további, különböző összetételű modelltermékek kidolgozására és vizsgálatára van szükség.

3.3 Feldolgozási folyamatok hatása

Az élelmiszer feldolgozás során különböző környezeti hatások érik az összetevőket, ezek közül talán a leginkább jellemzőek a hőkezelés, a pH és ionerősség változás, a nagy nyomású és enzimes kezelések. A hőkezelés hatására bekövetkező fehérje denaturáció jól ismert jelenség, amely az allergén komponensek analitikai eredményeire is hatással lehet: részben a fehérje molekulák egészében bekövetkező szerkezeti és összetételi változások, részben kémiai reakciók eredményeképpen létrejövő komplex-képződés (összetett fehérjék), részben pedig konkrétan az epitóp esetleges változása miatt. A jelenséget az irodalom tárgyalja, de az analitikai eredményeket befolyásoló hatásának mértéke és az e mögött álló jelenségek megértését segítő szakmai információk mennyisége – főleg fehérje specifikusan – erősen korlátozott.

Minden vizsgált komponens esetében elmondható, hogy a porkeverékhez képest kismértékű csökkenés tapasztalható a nyers tészták ELISA eredményeiben. Ezzel szemben a hőkezelés után jelentős, statisztikai értelemben szignifikáns csökkenés figyelhető meg a mérhető koncentrációban.

Az analitikai eredményt befolyásoló faktorok hatásának vizsgálatára kísérlettervet állítottunk össze. Mivel a feldolgozás ELISA eredményekre gyakorolt hatását mind az egyedi, mind a multi komponens tartalmú modelltermékeken, mindkét alapanyag használata esetén elvégeztük, így lehetőségünk volt ezen három faktor komplex statisztikai értékelésére. Az eredmények ingadozásának legnagyobb hányadát a tej, tojás és szója esetében a feldolgozottság mértéke adja, míg a gliadin tartalmú modelltermékeknél továbbra is a használt alapanyag jelenti a legfőbb hatást. Erre magyarázat lehet, hogy a gliadin tartalom meghatározás során a hőkezelés hatására bekövetkező csökkenés mértéke lényegesen kisebb, mint a másik három komponens esetén, lévén a gliadin fehérje hőérzékenysége kisebb.

Vizsgáltuk továbbá az ugyanannak a komponensnek a meghatározására alkalmas különböző gyártótól származó, részben más célfehérjéket alkalmazó ELISA tesztek által szolgáltatott eredmények közötti eltéréseket is. Általánosságban megállapítható, hogy az azonos célra használt ELISA kitek eredményei között különbség, egyes esetekben (pl. tejpör, szójaliszt tartalmú mátrixok) szignifikáns eltérés mutatkozik, a mért különbségek azonban a vizsgált mintamátrix jellegétől (natív fehérje vagy hőkezelt mátrix) is függenek. Mindemellett, néhány kivételtől eltekintve (pl. szójaliszt tartalmú tészta), a mért koncentrációk mindkét kit esetén szignifikáns eltérést mutatnak az elméleti koncentrációtól is.

Mindezen megállapítások statisztikai módszerekkel történő megerősítése és a faktor hatások mértékének becslésére az egy kísérletsorozatban vizsgált négy faktor, az alapanyag,

az allergénforrások száma, a feldolgozottsági szint és az alkalmazott ELISA teszt esetén négyfaktoros varianciaanalízist végeztünk. Ennek során megállapítható, hogy a használt kit is jelentősen befolyásolja az analitikai eredményt, a tej és a gliadin esetén az eredmények szórásának legnagyobb hányadát adja. A kísérleti eredményeinkből tehát megállapítható, hogy mind a négy vizsgált komponens meghatározására hatással vannak ugyan az egyéb mátrixalkotók és a feldolgozási folyamatok, a hatások mértéke azonban a vizsgált komponensektől (és az arra alkalmazott módszerektől) függően változó.

A feldolgozási folyamat során az ELISA tesztek által mért koncentrációváltozás tehát statisztikai értelemben is bizonyított. Látható, hogy a hatás jellege azonos, mértékében azonban a fehérjeforrástól függő eltérések azonosíthatóak. Az ennek hátterében álló jelenségek tanulmányozásához elektroforetikus vizsgálatokat végeztünk. Az SDS-PAGE és a LOC eredményekből is látható, hogy a porkeverékek és a nyers tésták fehérje mintázata nem különbözött jelentősen. Azonban a hőkezelt termékek gélképén a kis molekulatömegű fehérjék már nem azonosíthatók, a nagyobb molekulatömegű fehérjékhez tartozó sávok intenzitása pedig jelentősen csökkent. A fehérjék oldhatóságának növelését célzó, egyes ELISA tesztek és az elektroforetikus vizsgálatok esetében is általánosan használt redukálószeres extrakció alkalmazása a legtöbb esetben javította a fehérjék oldhatóságát, így a gélen történő azonosíthatóságát, ám messze nem jelentett teljes körű megoldást a fehérjék oldhatóságának javításában, vagyis a jellemző fehérjealegységek a hőkezelt termékekben hiányoztak. A hőkezelés hatására kialakult nagy molekulatömegű aggregátumokat, illetve összetett komplexeket ezzel az eljárással nem lehet az analitikai eredményeket lényegesen javító mértékben oldatba vinni. Ezt a megfigyelést a gliadinok esetében SE-HPLC módszerrel elvégzett vizsgálatok is igazolták. Trendszerűen is alátámasztható, az ELISA módszerekkel mért eredmények változása és az SE-HPLC-vel mért fehérjefrakciók mennyiségének csökkenése között összefüggés mutatható ki. Az ELISA által mért gliadin tartalom csökkenés mértéke hasonló a kromatográfiás csúcsterületek változásának mértékével.

Egyértelműen kijelenthető tehát, hogy a hőkezelés hatására az ELISA módszerekkel mérhető fehérjetartalom csökkenés hátterében elsősorban a fehérje denaturációval, illetve összetett vegyületek képződésével magyarázható oldhatóság csökkenés áll és lényegesen kisebb hatása van (lehet) komplex feldolgozott (hőkezelt) mátrixokban az epitópok szerkezetváltozásának és így az immunaktivitásból eredő analitikai hibának. Ez valamennyi, vizsgált fehérjeforrás esetére kiterjeszhető állítás, de természetesen az oldhatóság változásának mértéke fehérjénként eltérő. Ez kijelöli a módszerfejlesztések irányait is, vagyis az analitikai eredmények megbízhatósága szempontjából elsődleges fontosságú a

mintaelőkészítés fejlesztése a fehérjeoldhatóság javítása érdekében. Ezért az adott fehérjékre specifikus oldhatóságot javító eljárásokat kell alkalmazni, törekedni kell olyan célfehérjék kiválasztására (ha nem a túlérzékenységi reakciót kiváltó epitópokat mérjük), melyek kevésbé hőérzékenyek.

3.4 Stabilitásvizsgálat

A Tanszéken folyó allergénanalitikai kutatásaink végső célja olyan tanúsított referencia anyagok létrehozása, melyek meghatározott mennyiségben tartalmaznak egy vagy több allergén/toxikus komponenst valós élelmiszermátrixban. A referencia anyagoknak számos követelménynek kell megfelelniük, ezek közül az egyik az adott anyag stabilitásának, eltarthatóságának igazolása. Doktori munkám során a gliadin tartalmú sütemények esetében volt lehetőségünk hosszú távú tárolási vizsgálatokra, melyet 12 hónapon át három tárolási körülmény (szobahőmérséklet, hűtő, fagyasztó) alkalmazásával végeztünk el.

A gluténmentes liszt alapú mintákról elmondható, hogy folyamatos csökkenés látszik a mérhető koncentrációban, a visszanyerés értékek 66 %-ig esnek vissza a 12. hónap végére. Ugyanakkor a statisztikai értékelés alapján egyik tárolási körülmény esetén sem tapasztalható szignifikáns változás az időben. Az amaránt liszttel készült sütemények esetén az egyes időpontban mért átlagértékek nagyfokú ingadozást mutatnak, a visszanyerés értékek 78 és 135 % között változnak. A statisztikai értékelés alapján elmondható, hogy a szobahőmérsékleten és a hűtőben tárolt minták esetén szignifikánsan változik a koncentráció az időben, ezzel ellentétben a fagyasztóban tárolt minták nem különböznek szignifikánsan az egyes időpontokban.

3.5 Konklúzió

Dolgozatomban egyes élelmiszerallergiát illetve cöliákiát okozó fehérje komponensek illetve források ELISA módszerekkel történő meghatározását befolyásoló mátrixhatások és technológiai műveletek hatásainak vizsgálatával foglalkoztunk és azok értelmezésére tettünk kísérletet. A célkitűzések megvalósítására a négy leggyakrabban problémát okozó fehérjeforrást (tejszó, tojás, szójaliszt, gliadin) külön-külön és együttesen tartalmazó, eltérő feldolgozottsági szintű, a reális élelmiszermátrixok összetételét és fizikai-kémiai tulajdonságait modellező mintamátrixokat dolgoztunk ki. Ilyen formán az elsők között hoztunk létre olyan kísérleti környezetet, melyben a modelltermékek alkalmassá váltak két fejlesztési irány, az analitikai hibák feltárásának és a referenciaanyagok fejlesztésének szimultán megvalósítására. Azt tapasztaltuk, hogy legtöbb esetben mind a fehérje, mind a nem

fehérje típusú összetevők befolyásolják az analitikai eredményt. A hőkezelés hatására a fehérjék denaturációja olyan összetétel és valószínűsíthetően szerkezeti változásokat eredményez, melynek hatására elsősorban a vizsgált összetevők oldhatósága változik meg. Ehhez képest az egyéb tényezők – például az epitópok denaturációja és ezzel az ELISA módszereknél alkalmazott immunreaktivitás változásának hatása elenyésző.

A kísérleti modelltermékek az analitikai eredményeket befolyásoló egyéb hatások jellegének és mértékének becslésére is lehetőséget adnak. Az erre a célra összeállított kísérletterv és az eredmények statisztikai értékelése egyértelműen mutatja, hogy a technológiai műveletek (esetünkben a hőkezelés) hatása mellett a mintamátrix jellege (a gyakorlatban a vizsgált élelmiszer minta típusa, annak fizikai-kémiai tulajdonságai), valamint az alkalmazott módszer (esetünkben különböző gyártmányú, eltérő mintaelőkészítést, célfehérjét és számítási módszert alkalmazó ELISA kitek), mint kísérleti faktorok hatása szignifikánsan befolyásolja az analitikai eredményeket. Ezek a faktorok a mérések ismétléséből származó analitikai bizonytalanságot meghaladó hibát okoznak. Az egyes faktorok hatásának mértéke allergén komponensenként eltérő, ezek becslését az alkalmazott statisztikai módszerekkel megtettük.

Eredményeink alapján bizonyítottnak tűnik továbbá, hogy a több allergén fehérje egyidejű jelenlétének hatása – amennyiben azok az adott allergén vizsgálatoknál értelmezhető kis mennyiségben vannak jelen – az analitikai bizonytalanságot a fent említett faktoroknál lényegesen kevésbé befolyásolják, hatásuk elhanyagolható. Ez a rutinanalitika számára azt jelenti, hogy a jelenleg alkalmazott kitek használata esetén többféle allergén együttes jelenléte az élelmiszerben az analitikai eredmények megbízhatósága tekintetében nem jelent kockázatot. Másrészt egyértelművé vált, hogy modellmátrixaink, azok elkészítésére általunk kidolgozott módszertan alkalmas lehet multi komponens tartalmú referenciaanyagok előállítására is. Modell élelmiszertermékeink stabilitásvizsgálata alapján a mátrixaink hűtött körülmények között hosszabb ideig is (legalább egy év) is eltarthatóak, tehát elvileg alkalmasak lehetnek kereskedelmi forgalmazásra, referencia anyagként történő hasznosítására is.

Összességében tehát egyértelműnek látszik, hogy feldolgozott élelmiszerek esetében az ELISA módszerek eredményeinek megbízhatóságát elsősorban a mintaelőkészítési eljárások fejlesztésével, a célfehérjék oldhatóságának növelésével lehet javítani. A mintaelőkészítés kérdése a multi komponens meghatározásra alkalmas módszerek fejlesztése esetében tovább nehezedik, mivel a különböző fehérjék különböző összetételű oldószerekkel extrahálhatók, így nehéz egy olyan univerzális oldószer előállítása, mely megfelelő hatékonysággal képes

minden analit extrahálására natív és feldolgozott élelmiszerekből egyaránt. Az immunanalitikai módszerek esetében a célfehérje megválasztása is kulcskérdés mivel azok mennyiségét a genetikai és környezeti tényezők befolyásolják, ami az analitikai eredményekben és a számítási módszerekben is okoz bizonytalanságot. Nem tisztázott azonban, hogy az eltérő eredmények az eltérő antitestek alkalmazásából vagy a mintaelőkészítő extrakciós oldatok használatából fakadó hatékonyságának különbségéből származik. Az antitestekhez való affinitás tanulmányozása azonban nem lehetséges az extrakciós oldatok javításának megoldása nélkül. Így tehát a mintaelőkészítési problémák megoldása elsődleges fontosságú az analitikai eredmények megbízhatóságának javítása érdekében. Az említett problémák megoldása még jelentős erőfeszítéseket igényel. Ugyanakkor modellmátrixaink referenciaanyag jelöltként vagy belső anyagmintaként lehetővé tehetik a különböző módszerekkel kapott eredmények közötti összhang megteremtését, az eltérések okainak feltárását, segítséget nyújthatnak a módszerek érvényesítésének megvalósításához, vagyis az allergén analitika megbízhatóságának javításához, mely élelmiszerbiztonsági, gazdasági és szabályozási szempontból is fontos követelmény.

4 Tézisek

1. A reális élelmiszerminták tulajdonságait modellező kísérleti mintamátrixok laboratóriumi előállítására alkalmas eljárást dolgoztunk ki. A kifejlesztett modelltermékek az allergén analitikában alkalmazott kis (ppm-es) koncentráció tartományban, meghatározott mennyiségben tartalmaznak tej, tojás, szója vagy gliadin fehérjéket. A modelltermékek lehetőséget biztosítanak a mátrixalkotók és feldolgozási folyamatok hatásainak vizsgálatára. Javaslatot tettünk továbbá olyan modelltermékek kidolgozására, melyek segítségével pontosabb képet kaphatnánk a valós élelmiszermátrixokban végbemenő folyamatokról (2, 4, 5).
2. Létrehoztunk olyan mintamátrixot, mely egyidejűleg négy allergén komponenst (tejport, tojásport, szójalisztet és gliadint) tartalmaz. A komponensek homogén eloszlását biztosítottuk és a reprodukálható előállítási folyamatot kidolgoztuk. A több komponens egyidejű jelenléte nem okozott szignifikáns hatást az egyes komponensek meghatározása során, így további vizsgálatokat követően referencia anyagként történő hasznosításuk is lehetséges (2, 6).
3. Vizsgáltuk a mátrixalkotó komponensek hatását az analitikai eredményre, mely során megállapítottuk, hogy az allergénforrások, az alapanyagok és a lipid komponensek hatással vannak a mérhető allergén tartalomra. Ezen hatások figyelembe vétele

- szükségszerű a mintaelőkészítési (fehérje extrakciós) módszerek fejlesztése és a modelltermékek referencia anyagként történő hasznosítása során (3, 6).
4. Nyomon követtük az allergénforrások fehérje alegység összetételének változását reális élelmiszermátrixban a feldolgozási folyamat lépései során. Megállapítottuk, hogy az alegység összetétel jelentős változásokon megy át a hőkezelés hatására, melyek a fehérjék oldhatóságának csökkenéséhez vezet (1, 3).
 5. A négy vizsgált túlérzékenységi reakciót kiváltó komponens esetén eltérő mértékben változott a fehérjék oldhatósága. A multi komponens meghatározásra alkalmas módszerek és multi komponens tartalmazó referencia anyagok fejlesztése során is figyelembe kell venni a különböző oldhatósági tulajdonságokat (1, 2, 6).
 6. Tanulmányoztuk az alkalmazott ELISA módszer hatását az analitikai eredményre. A vizsgált komponensek meghatározására készült ELISA tesztek célfehérjei különböznek, extrakciós módszereik eltérnek, és különböző eredményeket produkálnak ugyanazon termék vizsgálata esetén. Szükséges tehát az ELISA módszertan harmonizációjára, melyhez megoldást jelenthet a kísérleti mintamátrixok referenciaanyagként történő alkalmazása (2, 4, 6).

5 Alkalmazási lehetőségek

A kutatómunka során fejlesztett modelltermékek segítségével lehetővé válik a túlérzékenységi reakciókat kiváltó élelmiszer komponensek mind jobb megismerése, valamint alkalmasak lehetnek referencia anyagként történő használatra is. A kifejlesztett előállítási módszertan lehetőséget biztosít újabb modelltermékek gyártására, melyekkel pontosabb képet kaphatnánk a fehérjék és az egyéb élelmiszerkomponensek kölcsönhatásairól. Újabb modelltermékek bevonásával és a kidolgozott statisztikai módszertan segítségével pontosabban becsülhető lenne az ELISA módszerek által szolgáltatott analitikai eredmények bizonytalansága. Az így kapott információk segítséget nyújthatnak a módszerfejlesztések során, továbbá felhasználhatók a szabályozási környezet és az analitikai lehetőségek összehangolásához, valamint elősegítheti az allergén analitikai módszertanok harmonizációját.

6 Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. K Török, L Hajas, V Horváth, E Schall, Zs Bugyi, S Tömösközi (2014): Heat induced changes of proteins measured in allergen ELISA kits. *Acta Alimentaria*, elfogadva. IF: 0,475
2. K Török, V Horváth, Á Horváth, L Hajas, Zs Bugyi, S Tömösközi (2014): Investigation of incurred single- and multi-component model food matrices for determination of food proteins triggering allergy and coeliac disease. *European Food Research and Technology*, 239: 923-932. IF: 1,436
3. K Török, L Hajas, Zs Bugyi, G Balázs, S Tömösközi (2014): Investigation of the effects of food processing and matrix components on the analytical results of ELISA using an incurred gliadin reference material candidate. *Acta Alimentaria*. DOI: 10.1556/AAlim.2014.0018 IF: 0,475
4. S Tömösközi, K Török, Zs Bugyi, L Hajas: Reference Materials for allergen testing. Eds. George Siragakis and Dimosthenis Kizis (2014): Food Allergen Testing: Molecular and Immunochemical and Chromatographic Techniques. *Wiley-Blackwell* 215-236. ISBN: 978-1-118-51920-2
5. K Török, Zs Bugyi, L Hajas, Zs Adonyi, S Tömösközi (2011): Az élelmiszerallergének mérésének lehetőségei ma- kihívások, megoldások, a fejlesztés irányai. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*, 57 (2): 83-91. IF: 0,040
6. K Török, L Hajas, V Horváth, E Schall, Zs Bugyi, S Tömösközi: Investigation of analytical errors with statistical tools in case of ELISA-based allergen methods. *European Food Research and Technology*, beadva. IF: 1,436

Egyéb közlemények:

Zs Bugyi, K Török, L Hajas, Zs Adonyi, B Popping, S Tömösközi (2013): Comparative study of commercially available gluten ELISA kits using an incurred reference material. *Quality Assurance and Safety of Crops&Foods*, 5(1): 79-87. IF: 0,642

Zs Bugyi, K Török, L Hajas, Zs Adonyi, C Diaz-Amigo, B Popping, R Poms, S Kerbach, S Tömösközi (2012): Development of incurred reference material for improving conditions of gluten quantification. *Journal of AOAC International*, 95 (2): 382-387. IF: 1,229

Zs Bugyi, J Nagy, K Török, L Hajas, S Tömösközi (2010): Towards development of incurred materials for quality assurance purposes in the analysis of food allergens. *Analytica Chimica Acta*, 672: 25-29. IF:4,310

Zs Bugyi, K Török, L Hajas, S Tömösközi (2012): Egy mindennapi élelmiszer-alapanyag, a búza. Barát vagy ellenség? *Élelmiszer Tudomány Technológia*, 4: 5-9.

K Török, L Hajas, Zs Kormosné Bugyi, S Tömösközi (2010): Élelmiszer-feldolgozási folyamatok allergén fehérjékre gyakorolt hatásának vizsgálata. *Élelmiszer Tudomány Technológia*, 2. különszám: 7-11.

Szóbeli előadások:

6th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prága, Csehország, 2013. november 5-8.

Kitti Török, Vanda Horváth, Lívia Hajas, Zsuzsanna Bugyi, Sándor Tömösközi: Towards a multi component incurred reference material for food allergen analysis

4th International MoniQA Conference, Budapest, 2013. február 26.- március 1.

Kitti Török, Lívia Hajas, Zsuzsanna Bugyi, Sándor Tömösközi: Reference material candidate for gluten analysis- Exactness, stability, method comparison, further development

11th European Young Cereal Scientists and Technologists Workshop, Barcelona, Spanyolország, 2012. május 9-11.

Kitti Török, Zsuzsanna Bugyi, Lívia Hajas, Tamás Langó, Ágnes Horváth, Sándor Tömösközi: Development of incurred reference material for gliadin quantification

3rd International MoniQA Conference, Várna, Bulgária, 2011. szeptember 27-29.

Kitti Török, Zsuzsanna Bugyi, Lívia Hajas, Zsanett Adonyi, Tamás Langó, Sándor Tömösközi: Food allergens-the way towards method validation

Poszterek:

6th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prága, Csehország, 2013. november 5-8.

Kitti Török, Vanda Horváth, Lívia Hajas, Zsuzsanna Bugyi, Sándor Tömösközi: Towards a multi component incurred reference material for food allergen analysis

5th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prága, Csehország, 2011. november 1-4.

Kitti Török, Attila Bagdi, Zsuzsanna Bugyi, Lívia Hajas, Tamás Langó, Zsanett Adonyi, Sándor Tömösközi: A study on properties of gliadin reference material candidate

EuroFoodChem XVI., Gdansk, Lengyelország, 2011. július 6-8.

Kitti Török, Zsuzsanna Bugyi, Livia Hajas, Zsanett Adonyi, Sándor Tömösközi: Challenges and solutions in reference material development for quantification of food allergens

10th European Cereal Scientists and Technologists Workshop, Helsinki, Finnország, 2011. május 23-25.

Kitti Török, Zsuzsanna Bugyi, Livia Hajas, Zsanett Adonyi, Sándor Tömösközi: Cereal protein sensitivity, analysis, regulation

Hungalimentaria 2011, „Élelmiszer- és takarmányellenőrzés: Gyorsabban-Pontosabban-Biztonságosabban”, Budapest, 2011. április 19-20.

Török Kitti, Bugyi Zsuzsanna, Hajas Livia, Adonyi Zsanett, Tömösközi Sándor: Gliadin meghatározására alkalmas ELISA módszerek összehasonlítása, a validálás feltételrendszerének javítása

Doktoráns konferencia, BME, Budapest, 2011. február 4.

Török Kitti, Bugyi Zsuzsanna, Hajas Livia, Adonyi Zsanett, Tömösközi Sándor: Gliadin meghatározására alkalmas ELISA módszerek összehasonlítása, a validálás feltételrendszerének javítása