

Búzalisztek gliadin (glutén)-tartalmának gyors meghatározása automatizált enzimimmun-analitikai eljárással

Kerekes László

Somogy megyei Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás
Kaposvár

Érkezett: 1994. április 30.

A búza endosperm tartalék fehérjéinek különleges tulajdonsága, hogy a tésztakésztítést követően a keményítő és más oldható komponensek kimosása után rugalmas, alakítható masszát képeznek, melyet sikernek (glutén) nevezünk. Az utóbbi teszi lehetővé a jó minőségű sütőipari termékek előállítását. A glutént alkotó fehérjéket az etilalkoholban oldható gliadinokra és a híg savban, híg lúgban oldható gluteminekre csoportosították. A kis molekulatömegű gliadin komponenseket csökkenő elektroforetikus mobilitásuk alapján α -, β -, γ -, ω -gliadinnak nevezték el. A csoportosítás azonban a kéntartalom alapján is ismert. E szerint az ω -gliadint a kénben szegény, az α -, β -, γ - gliadint pedig a kénben gazdag prolaminek csoportjába sorolták (POMERANZ, 1988.).

A gabonafélék fehérjéit hagyományosan különböző elektroforetikus módszerekkel lehet szétválasztani és azonosítani. E technikák között a poliakrilamid-gélelektroforézist (PAGE), az izoelektromos fókuszálást (IEF) és a kombinált két dimenziós eljárásokat (IEF-PAGE) egyaránt alkalmazzák (KAISER és KRAUSE, 1985).

Ezek a módszerek - a kapillár elektroforézis kivételével - kevésbé érzékenyek és hatékonyak, valamint mennyiségi meghatározásra nem alkalmasak. Az újabban elterjedő, specifikus antigén - ellenanyag kapcsolódáson alapuló, immunkémiai módszerek közül az enzimmel jelzett immunabszorbens vizsgálat (ELISA) a leginkább megfelelő technika az élelmiszerek gluténtartalmának meghatározására (LÜTHY, 1987.).

A glutén ELISA fontos egyrészt élelmezés-egészségügyi vonatkozásban az úgynevezett gluténmentes élelmiszerek ellenőrzése szempontjából (YÜRÜKER et al. 1989), másrészt lehetőség a búzalisztek egzakt minősítésére a gliadin specifikus kvantitatív meghatározása révén a gabona- és sütőiparban jelenleg alkalmazott nehézkes, nedves siker-tartalom meghatározás helyett. A gyakorlatban általában a direkt "sandwich" (TRONCONE et al., 1986; AUBRECHT et al., 1992), vagy az indirekt „two-site” (MIZZS et al., 1989) enzimimmun-analitikai módszert használják, mivel a mikrotiter lemezhez közvetlenül kötött gliadin antigén

fehérje-térszerkezetében jelentős változás következik be (KIZSHAW et al., 1986). A gliadin-tartalom meghatározásnál nem hőkezelt termékeknél leggyakrabban α -gliadint és az úgynevezett összes gliadint (α , β , γ - gliadin) mérték ELISA módszerrel (FRITSCHY et al., 1985). Hőkezelt élelmiszereknél, pl. sütőipari termékeknél a hőhatás időtartamától és az alkalmazott hőmérséklettől függően az α -gliadin-tartalom nagymértékben, a lisztbeni eredeti értékének 0,5 - 40 %-ára csökkent (MEIER et al., 1984.). Ugyanakkor SKERRITT és munkatársai (1985) megállapították, hogy a hőkezelés után az alacsony kéntartalmú ω -gliadin nagyon hőstabil. Kutatásaik eredményeképpen igen érzékeny, specifikus monoklonális antitest alapú tesztet fejlesztettek ki, mely hőkezelt élelmiszerek gliadin (glutén) tartalmának meghatározására is alkalmas. A rutin laboratóriumi célra a "gluten assay kit"-et az ausztráliai Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (C.S.I.R.O.) laboratóriumában fejlesztették ki.

A módszertani munka célja volt a glutén ELISA adaptálása automatikus enzimimmun-analitikai mérőrendszere és a megbízható számítógépes kiértékelési eljárás megvalósítása.

Anyagok és módszer

Vizsgálataim során különböző kiörlésű búzalisztek: BZ-80 (kenyérliszt), BZ-55 (finomliszt), BFF-55 (rétesliszt) gliadin-tartalmának mérését végeztem direkt "sandwich" ELISA-módszerrel. A vizsgálatokhoz a Cortecs Diagnostics (UK) cég (forgalmazó: NOACK Magyarország Kft., Budapest) biokitjét használtam.

Az eredetileg készülék-modulokra leírt módszert adaptáltam az Auto-EIA II. automatikus, enzimimmun-analitikai mérőrendszerre (1. táblázat) megfelelő vezérlő program kidolgozásával. Így elkerültem a standardok, a minta és reagens oldatok kézi pipettázásából, a mikrotiterlemez mosási műveleteinek elégtelenségéből származó hibákat.

A mintaelőkészítés során az egyneműsített lisztből 10 g-ot 100 ml 40 % (V/V) etanol/víz elegyben extraháltam 10000 rpm-en 30 másodpercig, majd szobahőmérsékleten 2500 rpm-en 10 percig centrifugáltam. A tiszta felső rétegből 100 μ l-t két lépésben - a glutén precipitációjának elkerülésére - azonnal 1:2500 arányban hígítottam konyhasó tartalmú foszfát-puffer (PBS) oldattal. Az enzimimmun-vizsgálathoz ezt a tiszta, hígított mintakivonatot használtam. A vizsgálat kivitelezésére szobahőmérsékleten omega-gliadin ellen termelt antitesttel előzetesen bevont műanyag mikrotiterlemezen (mikroküvetében) került sor. A mikroküvetékbe először 100 μ l gliadin standardot, majd 100 μ l mintakivonatot juttattam. A mintakivonatban lévő glutén koncentrációjától függően több-kevesebb gliadin lesz jelen

az oldatban és kötődik a mikroküvetében rögzített antitesthez. A reakció lefutása után a nem kötődött anyagokat szivatással és többszöri alapos gépi mosással eltávolítottam. Tekintettel a mosási művelet kritikus voltára, úgynevezett "soak" (áztató) technikát alkalmaztam, hogy a hamis immunválasz teljesen elkerülhető legyen.

1. táblázat: Az Auto-EIA II. automatikus immun-analitikai mérőműszer néhány technikai adata (LABSYSTEMS, Helsinki)

Típus: FP-1300	Technikai jellemzők
Optikai rendszer	Vertikális fotométer, 8 db színszűrő: 340-690 nm fényforrás: kvarc-halogénlámpa (8 V/50 W) lineáris tartomány: 0,2-2,0 A max. dev. <2 %
Optikai fényút / térfogat	3 nm = 100 µl minimum 6 nm = 200 µl normál 9 nm = 300 µl maximum
Kapacitás	96 mikroküvetta / mikrotiterlemez
Folyadékadagoló rendszer	Minta térfogat: 1-300 µl reagens térfogat: 10-300 µl
Inkubációs hőmérséklet	37 °C, 40 °C és szobahőmérséklet
Tömeg	18 kg

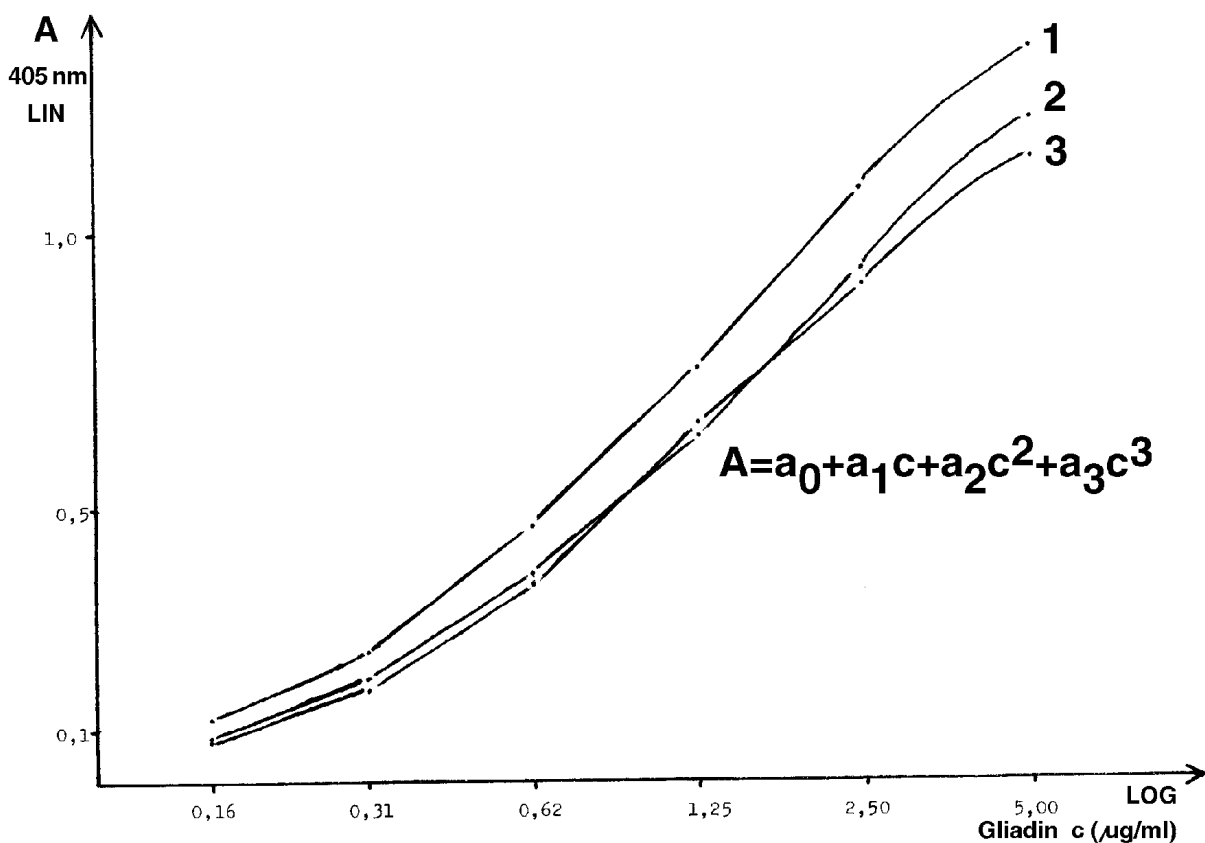
Mosófolyadékként konyhasós Tris-pufferoldatot (TBS) használtam. A mikroküvetében rögzített antitesthez kötött gliadin mennyiségét 100 µl PBS-ben oldott, BSA-t (Bovine Albumin Solutions) is tartalmazó peroxidáz enzimmel jelzett monoklonális egér anti- ω -gliadinnal történt reakció alapján határoztam meg. Az inkubációs idő letelte után a felesleges konjugátumot ismételt gépi mosással eltávolítottam, majd a kötött peroxidáz enzim aktivitását érzékeny 2,2'-azino-bis[3-etil-benz-tiazolin-6-szulfonsav] (ABTS) substrát peroxid citrát pufferes oldatának hozzáadását követő, a peroxidáz jelenlétében kifejlődő zöld színeződés alapján állapítottam meg. A színeképződés arányos a gliadin-koncentrációval a hígított extraktban.

A zöld szín kifejlődését az inkubációs periódus végén a standard sor legnagyobb koncentrációjú tagja (5,0 µg/ml gliadin) abszorbanciájának programozott ismételt mérésével (feltétel: $A_{405\text{ nm}} > 1,0$) számítógépes ellenőrzéssel optimalizáltam. Az abszorbancia-mérés 1,1 - 1,4 egység között tekinthető a legkedvezőbbnek a maximális standard-koncentráció értéknél. A megfelelő színeképződés után az enzimes reakciót 50 µl, 1,5 % (m/v) nátrium-fluorid oldat adagolásával állítottam le. A mért abszorbanciához tartozó antigén koncentrációt 0,16-5,00 µg gliadin koncentrációjú standardokkal egyidejűleg felvett kalibrációs görbe segít-

ségével 405 nm hullámhossznál végzett vertikális fotometrálist, követő számítógépes kiértékeléssel határoztam meg. A kapott koncentráció értékeket a minta hígítási faktorával és az átszámítási tényezővel szorozva az eredményt glutén %-ban kaptam meg.

Eredmények és értékelés

A kalibrációs görbék mérési pontjait, párhuzamosan minden mérési sorozat mikrotiterlemezén felvettem. Az 1. ábra a különböző időpontokban 3 alkalommal mért abszorbancia értékek és a gliadin-koncentráció közötti nemlineáris összefüggést mutatja. Az enzimés színreakció lefolyásának optimalizálása során a kalibrációs görbék a mérés szempontjából legkedvezőbb abszorbancia értékeket vették fel. A maximális, 5,00 µl/ml koncentrációjú standardhoz tartozó átlagos abszorbancia érték 1,12-1,32 közötti, ami a tesztbeni előírásnak megfelel.



1. ábra: Különböző időpontokban "sandwich" ELISA-módszerrel meghatározott gliadin kalibrációs görbék

A kiértékelést a szokásos, kevésbé pontos grafikus (kvázilineáris) közelítés helyett számítógépes nemlineáris függvény illesztést követően alkalmas iterációs eljárással végeztem. Azt tapasztaltam, hogy a különböző függvény-illesztések közül a harmadfokú polinomiális egyenlet adja a legjobb eredményt mindegyik mérési sorozatnál. Ezt igazolják a 2. táblázat statisztikai mutatói az 1. ábra görbéinek adatpárjaira illesztett $y = a_0 + a_1x + a_2x^2 + a_3x^3$ típusú egyenlet regresszió analízisével. A kiszámított

köbös összefüggés nagyon szoros és $P=1\%$ szinten szignifikáns, amit a táblázat F-próbája mutat. Összehasonlítóképpen a pontsorokra egyeneseket illesztve a közelítés lényegesen rosszabb.

2. táblázat: Regressziós táblázat a harmadfokú polinomiális egyenlet illesztésének regressziós analíziséhez gliadin S ELISA-nál

Tényező	1. mérés	2. mérés	3. mérés
Regressziós négyzetgyök:	1,1269	0,8560	0,9199
szabadsági fok:	3	3	3
négyzetátlag:	0,3756	0,2853	0,3066
Maradék négyzetösszeg:	4-8399E-04	3,4451E-04	1,7017E-04
szabadsági fok:	2	2	2
négyzetátlag:	2,4199E-04	1,7226E-04	8,5086E-05
Teljes négyzetösszeg:	1,1274	0,8564	0,9201
szabadsági fok:	5	5	5
F-érték:	1552,28	1656,53	3603,96
Determinációs koefficiens:	0,9996	0,9996	0,9998
A becslés standard deviációja:	1,5556E-02	1,3125E-02	9,2242E-03

A különböző búzaliszt típusokat képviselő minták gliadin (glutén) mérési eredményeit a 3.táblázat foglalja össze.

3. táblázat: Búzaliszt minták gliadin (glutén)-tartalma (Sw ELISA)

Liszt típus	Gliadin koncentráció *($\mu\text{g/ml}$)	Hígítási tényező	Gliadin-tartalom (%)	Glutén-tartalom **(%)
BL-80	1,61	2500	4,04	8,07
BL-55	0,995	2500	2,49	4,98
BL-55	1,12	2500	2,81	5,62
BL-55	1,21	2500	3,02	6,05
BL-55	2,18	2500	5,45	10,9
BFF-55	1,65	2500	4,12	8,25
Átlagos érték:	-	-	3,66	7,31
Szórás:	-	-	1,10	2,20
CV (%):	-	-	30,1	30,1

* az extraktban

** a gliadin-tartalom alapján becsült érték.

A táblázat szerint a mért gliadin-koncentráció alapján számított gliadin (glutén)-tartalom viszonylag széles intervallumban változik. A vizsgált minták átlagos gliadin-, ill. gluténtartalma 3,66, ill. 7,31 %. (Az

adatok a déldunántúli régió malmaiban véletlenszerűen mintázott lisztekre vonatkoznak.)

A vizsgálati tapasztalatok és eredmények alapján megállapítható, hogy az automata műszer biztosította lehetőségek kihasználásával a búzalisztek és "gluténmentes" termékek egzakt minősítésére a gliadin (glutén) tartalom alapján korszerű, gyors és nagy kapacitású sorozat vizsgálati eljárás alakítható ki, amennyiben annak alkalmasságát egy interlaboratóriumi körvizsgálat igazolja. Hőkezelt gabonaalapú élelmiszerek (pl. sütőipari termékek) gluténtartalma jól becsülhető a mért gliadin-tartalom alapján. Ezen kívül ez a mérés a hőkezelt húskészítmények, húskonzervek készítésénél felhasznált búzaliszt kimutatására, glutén-tartalmának ismeretében mennyiségének mérésére is alkalmas.

Irodalom

- Pomeranz, Y. (1988): Advances in Cereal Science and Technology, Vol. IX. In: J.H. Skerritt: Immunochemistry of Cereal Grain Storage Proteins. Chapter B.p. 263-338. Published by the Association of Cereal Chemists Incorporated St. Paul, Minnesota, USA.
- Kaiser, K.P., Krause, I. (1985): Analytik von Proteinen in Lebensmitteln mit elektrophoretischen und chromatographischen Verfahren, Z. Lebensm. Unters. Forsch. **180**, 181-201.
- Lüthy, J., Windemann, H. (1987): Immunchemischen Methoden in der Lebensmittelanalytik. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **78**, 147-167.
- Troncone, R., Vitale, M., Donatiello, A., Farris, E., Rossi, G. and Auricchio, G. (1986): A sandwich enzyme immunoassay for wheat gliadin, J. Immunological Methods, **92**, 21-23.
- Aubrecht E., Tóth Á. (1992): A búzaliszt gliadin-tartalmának vizsgálata ELISA-módszerrel. Élelmiszervizsgálati Közl.: **38**(2), 97-101.
- Mills, E. N. C., Spinks, C. A., Morgan, M. R. A. (1989): A Two-site Enzymelinked Immunosorbent Assay for Wheat Gliadins, Food & Agricultural Immunology, **1**, 19-27.
- Kilshaw, P. J., McEwan, F. J., Baker, K. C. and Cant, A. J. (1986): Studies on the specificity of antibodies to ovalbumin in normal human serum: technical considerations in the use of ELISA methods, Clin. Exp. Immunol., **66**, 481-489.
- Fritschy, F., Windemann, H. und Baumgartner, E. (1985): Bestimmung von Weizengliadinen in Lebensmitteln mittels ELISA, Z. Lebensm. Unters. Forsch., **181**, 379-385.
- Meier, P., Windermann, H. und Baumgartner, E. (1984): Zur Bestimmung des Gliadiningehaltes in glutenhaltigen und "glutenfreien" erhitzten Lebensmitteln, Z. Lebensm. Unters. Forsch., **178**, 361-365.
- Skerritt, J. H., Diment, J.A. and Wrigley, C. W. (1985): A Sensitive Monoclonal-antibody-based Test for Gluten Detection: Choice of Primary and Secondary Antibodies, J. Sci. Food Agric., **36**, 995-1003.
- Yürüker, B., Windemann, H. und Lüthy, J. (1989): Wie glutenfrei ist eine glutenfreie Diät?, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., **80**, 72-76.

Búzalisztek gliadin (glutén)-tartalmának gyors meghatározása automatizált enzimimmun-analitikai eljárással

Kerekes László

A szerző búzalisztek és "gluténmentes termékek" gliadin (glutén) tartalmának meghatározására direkt "sandwich" ELISA módszert adaptált automatikus enzimimmun-analitikai mérőrendszer (AUTO-EIA II, Labsystems) megfelelő programozásával. A gliadin-koncentráció meghatározásánál - a szokásos grafikus kiértékelés helyett - harmadfokú polinomiális egyenlet számítógépes illesztését követő iterációs eljárást alkalmazott. A módszer hőkezelt gabonataralmú élelmiszerek gliadintartalmának mérésére, illetve gluténtartalmának becslésére is alkalmas.

Fast determination of gliadin (gluten) content of wheat flours by an enzyme immune-analytical procedure

Kerekes, L.

A direct, "sandwich" ELISA method was adapted to an automatic enzyme immune analytical measuring system (AUTO-EIA II, Labsystems) for the determination of gliadin (gluten) in wheat flour and "gluten-free" products, elaborating a relevant computer program. Instead of the usual graphical evaluation, an iterative procedure was used for the determination of gliadin concentration, following a computerized fitting of a third degree polynomial equation. The method is capable for the measurement of gliadin content in heat-treated wheat-containing foods and for the estimation of their gluten content.

Schnellbestimmung des Gliadin(Gluten)-gehalts von Weizenmehlen mit automatisiertem enzymimmunanalytischem Verfahren

Kerekes, L.

Zur Bestimmung des Gliadin(Gluten)-gehaltes von Weizenmehlen und "glutenfreien Produkten" wurde eine direkte "Sandwich" ELISA-Methode für das automatische enzymimmunanalytische Meßsystem (AUTO-EIA II., Labsystems) mit der Ausarbeitung eines entsprechenden Rechnerprogramms angewandt. Bei der Bestimmung der Gliadinkonzentration wurde anstelle der üblichen graphischen Auswertung ein Iterationsverfahren eingesetzt, das rechnerisch einer polinomialen Gleichung dritten Grades folgt. Die Methode ist für die Messung des Gliadiningehaltes von hitzebehandelten getreidehaltigen Lebensmitteln bzw. auch für die Schätzung des Glutengehaltes geeignet.