Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Katedra Biochemii i Analizy Żywności

Mgr inż. Paulina Zielińska

Identyfikacja białek soi o właściwościach alergennych w produktach mięsnych

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. Dorota Piasecka-Kwiatkowska

Poznań 2018

Streszczenie

Wzrastające spożycie soi na całym świecie związane jest przede wszystkim z jej bogatym składem chemicznym. Soja w żywności może występować w postaci całych nasion, mąki, oleju czy dodatków funkcjonalnych – izolatów i koncentratów białek sojowych oraz lecytyny sojowej. Dzięki właściwościom emulgującym, teksturyzującym i wypełniającym, dodatki funkcjonalne znalazły zastosowanie w produkcji wyrobów o wysokiej zawartości tłuszczu, np. produktów mięsnych. Białka roślinne, w szczególności białka sojowe, których obecności producent nie zadeklarował na etykiecie, mogą być źródłem tzw. „ukrytych alergenów" i stanowić zagrożenie dla osób uczulonych.

Powszechne dodawanie białek sojowych w procesie produkcji żywności, a przy tym coraz większa liczba osób uczulonych na soję, wymaga stosowania odpowiednich, czułych metod analitycznych, które pozwolą na wykrycie alergenów sojowych dodawanych do żywności nawet w niewielkiej ilości. Detekcja alergennych białek soi w żywności wymaga zastosowania nie tylko odpowiedniej metody ich oznaczania, ale również właściwego sposobu przygotowania próbki do dalszych analiz. Obecnie stosowane metody ekstrakcji alergenów sojowych z żywności nie uwzględniają specyficznych właściwości poszczególnych produktów. Prowadzić to może do zafałszowań wyników oznaczeń zawartości alergenów.

Celem pracy było wskazanie optymalnej metody wyodrębniania alergennych białek soi z produktów mięsnych. Sprawdzono również możliwości detekcyjne komercyjnie dostępnych przeciwciał rozpoznających białka sojowe. W badaniach wykorzystano 18 różnych metod izolacji alergenów sojowych z nasion soi, sojowych dodatków funkcjonalnych oraz farszów parówkowych o różnym stopniu przetworzenia i zawartości białek sojowych. Do ekstrakcji wykorzystano 6 rozpuszczalników o różnej wartości pH, a proces izolacji prowadzono równolegle w 3 wariantach. Skuteczność zastosowanych metod izolacji alergennych białek soi oceniono na podstawie oznaczenia zawartości białka rozpuszczalnego w otrzymanych ekstraktach, porównano także profile białkowe uzyskanych ekstraktów oraz sprawdzono właściwości immunoreaktywne wyizolowanych białek wobec surowic krwi osób uczulonych oraz właściwości antygenowe wobec komercyjnych przeciwciał rozpoznających białka sojowe (Sigma S2519), sojowy inhibitor trypsyny (abcam a34549) oraz wytworzonych specjalnie na potrzeby tej pracy przeciwciał specyficznych wobec alergennego peptydu Gly m Bd 30K (Novazym NP34).

Wykazano, że na ekstraktywność alergennych białek soi wpływał rodzaj zastosowanego buforu i warunki, w jakich prowadzony był proces izolacji. Znaczenie miał także rodzaj

matrycy, z której białka te były izolowane. Wyniki analiz z surowicami krwi osób uczulonych wykazały, że wszystkie ekstrakty z nasion soi oraz izolatu białka sojowego zawierały białka o właściwościach immunoreaktywnych.

Białka sojowe zawarte w nasionach soi najlepiej rozpuszczały się w buforach PBS-7,4, PBS-T-7,4, Tris-8,6 oraz Tris-T-8,6. Najbardziej optymalną metodą wyodrębniania białek alergennych z nasion soi była ekstrakcja za pomocą buforu Tris-8,6 wspomagana sonikacją w temperaturze 37°C, a sojowego inhibitora trypsyny – izolacja z użyciem buforu PBS-7,4 w temperaturze 37°C. Natomiast w przypadku sojowych dodatków funkcjonalnych oraz farszów parówkowych, najskuteczniejszymi rozpuszczalnikami białek sojowych były Tris-TBSM-7,4 oraz Tris-TBSM-8,6. Najwięcej alergennych peptydów w ekstraktach z izolatu białka sojowego oznaczono w próbie otrzymanej z użyciem buforu Tris-TBSM-8,6 w temperaturze pokojowej. Dlatego metodę tę wskazano jako najbardziej optymalną do wyodrębniania alergennych białek soi z produktów mięsnych.

W niniejszej pracy podjęto także problem możliwości zastosowania komercyjnie dostępnych przeciwciał do identyfikacji alergenów sojowych w produktach mięsnych. Poliklonalne przeciwciała rozpoznające białka sojowe (Sigma S2519) okazały się nieodpowiednie do detekcji alergenów sojowych w tych produktach ze względu na wystąpienie reakcji krzyżowych z białkami zwierzęcymi, mimo deklaracji producenta o ich braku. Niepełną odpowiedź na temat alergenności produktów mięsnych wykazały przeciwciała abcam a34549, które są specyficzne wobec sojowego inhibitora trypsyny, który jednak nie jest głównym alergenem soi. Natomiast trudności z doborem właściwej sekwencji aminokwasowej zsyntetyzowanego peptydu użytego do immunizacji spowodowały, że próba wytworzenia monospecyficznych przeciwciał rozpoznających w badanych produktach alergenny peptyd Gly m Bd 30K (Novazym NP34) nie powiodła się.

28.03.2018

Paulina Zielińska