

Oves jako alternativa k obilninám ze skupiny Triticeae pro celiaky

(Oats as an alternative to Triticeae cereals for celiacs)

Kosová*, K., Dvořáček, V.

Odbor genetiky a šlechtění rostlin, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Souhrn: Oves setý (*Avena sativa* L.) se v poslední době ukazuje jako perspektivní alternativa k obilninám ze skupiny Triticeae (pšenice, ječmen, žito) pro lidi trpící některou z forem nesnášenlivosti lepku, z nichž nejvýznamnější je celiakie. Zásobní proteiny ovesného zrna aveniny obsahují ve srovnání s homologickými proteiny pšenice (gluteniny a gliadiny), ječmene (hordeiny) a žita (sekaliny) méně glutaminu a prolinu a jsou lépe hydrolyzovatelné proteasami trávicího ústrojí, navíc je jejich celkový obsah v zrna nižší. Ukazuje se však, že existuje vysoká genetická (alelická) variabilita v sekvencích aveninů a hydrolyzovaných peptidů mezi různými genotypy ovsa. Klinické testy ukazují, že většina genotypů ovsa nevykazuje imunologickou reakci, avšak některé genotypy ovsa ano. Bylo popsáno několik aveninových peptidů obsahujících epitopy reagující na protilátky proti glutenovým peptidům (R5 moAb, G12 moAb). Pro bezpečnost ovsa z hlediska celiakie je tedy nutný výzkum alelické variability aveninů a jejich hydrolyzovaných peptidů z hlediska jejich celiakální reaktivity. Pro přípravu bezlepkových produktů z ovsa je nutná kontrola jeho původu (genotypů) a celiakální reaktivity. Alternativním přístupem je pak možnost snížení obsahu glutenových peptidů pomocí technologických postupů spočívajících v hydrolyze glutenových peptidů pomocí bakteriálních nebo houbových inokulátů.

Klíčová slova: oves; celiakie; lepek; aveniny; genetická variabilita; imunoreaktivita aveninových peptidů

Abstract: Oats (*Avena sativa* L.) becomes considered a promising alternative to Triticeae cereals (wheat, barley, rye) for persons suffering from any kind of gluten intolerance, especially celiac disease. Oat prolamins avenins reveal lower content in grain with respect to Triticeae prolamins; moreover, their molecules contain less glutamine and proline thus yielding shorter peptides during hydrolysis in gut. Clinical tests revealed no immunogenic response to anti-gluten primary antibodies in most oat genotypes tested; however, gluten levels exceeding the limit of 20 ppm were determined in certain oat genotypes. Some avenin-derived peptides revealing epitopes interacting with anti-gluten primary antibodies such as R5 moAb or G12 moAb were already described. In order to consider oats as a gluten-free product, studies of avenin and avenin-derived peptides genetic variability and potential immunoreactivity are necessary. Control of oat genetic resources arises as a need in the process of oat-derived gluten-free food preparation. An alternative approach represents gluten reduction in oat products by food processing technologies based on gluten fermentation by special bacterial or fungal inoculates.

Key Words: oats; celiac disease; avenins; genetic variability; avenin-derived peptide immunoreactivity

Úvod

Oves setý (*Avena sativa* L.) představuje možnou alternativu k obilninám ze skupiny Triticeae (pšenice, ječmen, žito) pro osoby trpící některou z forem nesnášenlivosti lepku, z nichž nejvýznamnější formu představuje celiakie (CD). Celiakie je geneticky podmíněná forma nesnášenlivosti lepku, tj. souboru obtížně hydrolyzovatelných peptidů bohatých na aminokyseliny glutamin a prolin, vznikajících v trávicím ústrojí při hydrolyze zásobních proteinů z rodiny prolaminů. Lidé trpící celiakií jsou nositeli alel HLA-DQ2.2/2.5/8 receptorů na membránách dendritických buněk (DC), a právě tyto receptory rozpoznávají specifické sekvence (epitopy) glutenových peptidů. Navázání glutenových peptidů na HLA-DQ2/8 receptory je podmínkou pro indukci imunitní reakce, jejímž důsledkem jsou záněty a atrofie sliznice proximální části tenkého střeva (jejunum, ileum). Významnou úlohu v imunitní odezvě lidského těla na gluten hraje trávicí enzym tkáňová transglutaminasa (tissue transglutaminase tTG2), která katalyzuje deamidaci glutaminových zbytků na kys. glutamovou, čímž zvyšuje jejich reaktivitu k HLA-DQ2.2/2.5 receptorům. Kromě deamidace glutaminu na kys. glutamovou dochází i k transamidaci, tj. k navázání glutenových peptidů na tTG2 a jejich společnému navázání na HLA-DQ2.2/2.5 receptory; tělo pak vytváří protilátky nejen proti glutenu, ale i proti vlastnímu enzymu tTG2 a celiakie je tak vlastně autoimunitní nemocí (Balakireva a Zamyatnin 2016). Z glutenových peptidů je považován za nejreaktiv-

nější peptid o délce 33 aminokyselin (33 mer; p57-89) odvozený z repetitivní oblasti pšeničného α 2-gliadinu, vůči němuž byla vytvořena monoklonální protilátka moAbG12. V sekvenci tohoto α 2-gliadinového 33meru bylo identifikováno šest epitopů rozpoznávaných HLA-DQ2.5 receptorem (Balakireva a Zamyatnin 2016; De Re et al. 2017). V současnosti představuje jedinou účinnou léčbu celiakie celoživotní bezlepková dieta (Gluten-free diet GFD). Zrno ovsa obdobně jako zrna obilnin ze skupiny Triticeae obsahuje několik skupin zásobních proteinů: albuminy, globuliny, gluteliny a prolaminy. Ovesné prolaminy zvané aveniny jsou sice homologní k pšeničným gluteninům a gliadinům, ječmenným hordeinům a žitným sekalinům, ale zároveň se od nich v některých ohledech odlišují. Ovesné aveniny se dle sekvence dělí do tří skupin (aveniny A, B, C); všechny tři skupiny mají ve svých molekulách tři konzervativní oblasti A, B a C a dvě variabilní oblasti, které právě obsahují úseky bohaté na glutamin (G) a prolin (P); na rozdíl od pšeničných gliadinů jsou však u aveninů tyto oblasti kratší, což se projevuje i na celkově menším podílu G+P na celkovém obsahu aminokyselin u aveninů ve srovnání s jinými prolaminami (Real et al. 2012). Všechny aveniny rovněž patří do skupiny tzv. S-rich prolaminů; aveniny skupin B a C obsahují ve svých molekulách 8 cysteinových zbytků a tvoří intramolekulární disulfidické vazby, aveniny skupiny A obsahují ve svých molekulách 9 cysteinových zbytků a tvoří i intermolekulární disulfidické vazby vedoucí ke tvorbě pšeničí obdobných gluteninových oligomerů (Real et al. 2012). Navíc celkový obsah aveninů v oves-

ných zrnech je nižší ve srovnání s pšeničnými, žitnými a ječmennými prolaminami a dosahuje pouze cca 2 % z celkové hmotnosti ovesného zrna a cca 15 % z celkového obsahu proteinů v zrnu (Real et al. 2012).

Studie zabývající se glutenovými peptidy vzniklými hydrolyzou aveninů a jejich imunoreaktivitou:

Z hlediska bezpečnosti potravin pro celiaky je nařízením EU stanoven limit obsahu glutenu 20 ppm v tzv. bezlepkových potravinách bezpečných pro celiaky; oves je dle nařízení EU považován za bezpečnou potravinu vhodnou pro zařazení do tzv. GFD („gluten-free diet“; nařízení Evropské komise 41/2009). Naopak Austrálie a Nový Zéland stále nepovažují oves za potravinu bezpečnou pro celiaky (Joint Australian and New Zealand Food Standards Code, 2007).

Studie zabývající se imunologickou reaktivitou aveninových peptidů vůči standardně používaným primárním protilátkám proti glutenovým peptidům R5 moAb (RIDASCREEN ELISA kit) a G12 moAb. Protilátka R5 moAb se váže na epitopy QQPFP, QQQFP, LQPFP, a QLPFP, a rovněž v menší míře na epitopy QLPTF, QQSFP, QQTFF, PQPFP, a QQPYP, a je využívána k detekci glutenových peptidů u pšenice, ječmene a žita (Kahlenberg et al. 2006). Dalším typem anti-glutenové protilátky je G12 moAb, která se váže na epitopy QPQLPY, QPQQPY a QPQLPF a která vykazuje limitovanou reaktivitu s aveniny, a protilátka moAb 401.21 rovněž nazývaná Skerritt, která se váže na epitopy PQQPFPQE a PQQPPFEE (Skerritt et al. 2000). Stručný přehled studií zaměřených na detekci glutenových peptidů v různých genetických varietách ovsa je uveden v *tabulce 1*.

Práce zaměřené na detekci gluten-reaktivních peptidů odvozených od aveninů ukazují na variabilní délku a imunoreaktivitu těchto peptidů. Comino et al. (2016) detekovali několik imunoreaktivních aveninových peptidů interagujících s protilátkou moG12 proti pšeničnému α 2-gliadinovému 33meru. Imunoreaktivní peptidy odvozené od gliadin-like aveninů skupiny B a C: QL6 (QPQLQL), QQ6 (QPQLQQ), PV10 (PYPEQQEPFV), EF27 (EQY-QPYPEQQEPFVQQPPFVQQEQPF); imunoreaktivní peptidy odvozené od glutenin-like aveninů typu A jsou QL14 (QPF-FMQQQPFMQPL), QM27 (QYQPYPEQQPFMQQQPFMQ-PLLQQQM). Peptidy různé délky se liší svojí imunoreaktivitou v klinických testech; krátké peptidy QL6 a QQ6 nevykazují žádný stimulační efekt na dendritické buňky (DCs), resp. receptory HLA-DQ2/8. Pouze delší peptidy EF27 a QM27 indukovaly proliferační odezvu T-buněk obdobnou stimulaci vyvolané gliadinovým 33mer peptidem. Peptidy střední délky PV10 a QL14 se sice váží na HLA-DQ2/8 receptory na povrchu DCs, ale mají zřejmě na rozdíl od delších peptidů jiný mechanismus endosomální internalizace, tudíž neindukují odezvu T buněk vedoucí k rozvoji molekulárních symptomů typických pro celiakii jako jsou proliferace T buněk, uvolnění interferonu γ (γ IFN) či tvorba autoprotilátek proti tkáňové transglutamináze tTG2 (Comino et al. 2011, 2016).

Studie zaměřené na odrůdovou variabilitu v imunoreaktivitě různých genetických materiálů ovsa ukazují významné genotypové rozdíly; například Ballabio et al. (2011) zjistili odlišnou odezvu na RIDASCREEN ELISA kit u 36 kultivarů ovsa. Většina kultivarů měla hodnoty gluten-like proteinů hluboko pod limitem 20 ppm, avšak odrůdy (variety) Expander, HJA76037N, Kynon a BG2 měly koncentrace gluten-like proteinů velmi blízké k limitu 20 ppm, a několik genotypů jako komerční pluchatý kultivar Dakar, experimentální nahý genotyp BG3, nahý kultivar Nave a genotyp BG4 významně překročily limit 20 ppm nutný pro bezlepkové produkty, a genotypy BG3 a Dakar dokonce překročili detekční limit 80 ppm pro RIDASCREEN Gliadin ELISA kit. Obdobně Benoit et al.

(2017) testovali pomocí ELISA 19 odrůd ovsa z hlediska jejich reaktivity k protilátce R5 proti α -gliadinovému epitopu LQPFP, a k tzv. Skerritt protilátce, přičemž našli pozitivní reakci u odrůd Brazilian Check, Kanota, a Curt indikující přítomnost imunogenních peptidů v hydrolyzátech aveninů izolovaných z těchto odrůd. Při použití protilátky Skerritt byly naměřeny výrazně vyšší koncentrace glutenových peptidů oproti stanovením pomocí R5 protilátky.

Závěr

Ovesné zásobní proteiny aveniny vykazují ve srovnání s homologními prolaminami pšenice, ječmene a žita nižší podíl vzhledem k celkovému obsahu zásobních proteinů obiliek a rovněž nižší podíl obtížně hydrolyzovatelných aminokyselin glutaminu a prolinu. Ze strukturního hlediska mají aveniny dva kratší repetitivní úseky bohaté na G+P oproti dlouhým repetitivním sekvencím pšeničných S-poor gliadinů, což vede při následné hydrolyze ke vzniku kratších glutenových peptidů, které nevedou k indukci imunitní odezvy a rozvoji molekulárních symptomů typických pro celiakii (IgE protilátky proti glutenovým peptidům, autoprotilátky proti tTG2, γ IFN, proliferace T buněk). Studie zabývající se genotypovými rozdíly v celiakální reaktivitě ovsa však ukazují, že oves vykazuje vysokou genetickou variabilitu ve složení zásobních proteinů aveninů a v délce a sekvenci hydrolyzovaných peptidů. Studie sledující reaktivitu hydrolyzovaných aveninů na standardní anti-glutenové monoklonální primární protilátky R5 a G12, případně tzv. Skerritt protilátku, pomocí ELISA testů, ukázaly genetickou variabilitu v reakci na tyto protilátky, přičemž některé genotypy ovsa vysoce překročily limit 20 ppm glutenu definovaný pro bezlepkové potraviny. Při využití ovsa jako bezlepkové potraviny vhodné pro celiaky je tedy nutné věnovat pozornost použité odrůdě, resp. genetickému zdroji, z něhož surovina pochází. Možnou alternativou jsou i technologické přístupy založené na snížení obsahu lepku s využitím bakteriální či houbové fermentace (Rizello et al. 2007).

Kontakt: kosova@vurv.cz

Poděkování: Práce vznikla za podpory řešení projektu MZe ČR č. QK1810102 a RO0418.

/Recenzováno/

Literatura

- Balakireva A.V., Zamyatnin A.A. Jr. 2016. Properties of gluten intolerance: gluten structure, evolution, pathogenicity and detoxification capabilities. *Nutrients* 8: 644.
- Ballabio C., Uberti F., Manferdelli S., Vacca E., Boggini G., Redaelli R., Catassi C., Lionetti E., Penas E., Restani P. 2011. Molecular characterization of 36 oat varieties and in vitro assessment of their suitability for coeliacs' diet. *J. Cereal Sci.* 54: 110–115.
- Benoit L., Masiri J., del Blanco I.A., Meshgi M., Samadpour M. 2017. Assessment of avenins from different oat varieties using R5-based sandwich ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65: 1467–1472.
- Comino I., Real A., de Lorenzo L., Cornell H., López-Casado M.Á., Barro F., Lorite P., Torres M.I., Cebolla Á., Sousa C. 2011. Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in celiac disease. *Gut* 60: 915–922.
- Comino I., Bernardo D., Bancel E., de Lourdes Moreno M., Sánchez B., Barro F., Šuligoj T., Ciclitira P.J., Cebolla A., Knight S.C., Branlard G., Sousa C. 2016. Identification and molecular characterization of oat peptides implicated on celiac immune response. *Food and Nutrition Research* 60: 30324.

Tabulka 1. Genotypy ovsa vykazující zvýšenou hladinu lepku (vyšší než 20 ppm) detekovanou protilátkami proti lepku.

Genotyp	Lepek (ppm)	Primární protilátka (kit)	Citace
Dakar	80	R5-based ELISA (RIDASCREEN Gliadin kit)	Ballabio et al. (2011)
Expander	20.91		
HJA76037N	20.59		
Kynon	19.29		
BG2	38.4		
BG4	41		
Nave (nahý)	75.5	R5-based sandwich ELISA; Skerritt S-ELISA	Benoit et al. (2017)
Brazilian Check	195 (R5), 2568 (Skerritt)		
Kanota	99 (R5), 238 (Skerritt)		
Curt	50 (R5), 238 (Skerritt)	G12 moAb based ELISA	Comino et al. (2011)
OM719	1340		
OH727	344		
OE717	Pozitivní odezva k protilátce G12 moAb na imunoblotu. Imunoreaktivní peptidy QL6, QQ6, PV10, QL14, EF27, QM27	G12 moAb	Comino et al. (2016)
Nave (nahý)	Pozitivní odezva TEER založená na permeabilitě monovrstvy T84 buněk	Králičí polyklonální protilátka proti pšeničnému gliadinu; R5-based ELISA RIDASCREEN	Silano et al. (2014)



PRO OBILÍ SPÁSA,
BIZON PLEVEL SPÁSA

Corello®

Corello na podzim
a Mustang Forte na jaře
jsou nejlepší volbou ošetření
ozimé pšenice,
tritikale a žita.

*Ekskluzivní
cena
ošetření*

Mustang®



Info • 602 129 528



Info: 602 275 038

Commission Regulation n. 41/2009 concerning the composition and labelling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten. Official Journal of the European Union dated 21.01.2009, L16/3

De Re V., Magris R., Cannizzaro R. 2017. New insights into the pathogenesis of celiac disease. *Frontiers in Medicine* 4: 137. doi: 10.3389/fmed.2017.00137

Joint Australian and New Zealand Food Standards Code. Standard 1.2.8. 2007. Available at: <http://www.foodstandards.gov.au/foodstandardscode>

Kahlenberg F., Sanchez D., Lachman I., Tuckova L., Tlaskalova H., Mendez E., Mothes T. 2006. Monoclonal antibody R5 for detection of putatively celiac-toxic gliadin peptides. *European Food Research Technology* 222: 78–82.

Real A., Comino I., de Lorenzo L., Merchán F., Gil-Humanes J., Giménez M.J., López-Casado M.A., Torres M.I., Cebolla A., Sousa C., Barro F., Pistón F. 2012. Molecular and immunological characterization of gluten proteins isolated from oat cultivars that differ in toxicity for celiac disease. *PLoS One* 7(12): e48365.

Rizzello C.G., De Angelis M., Di Cagno R., Camarca A., Silano M., Losito I., De Vincenzi M., De Bari M.D., Palmisano F., Maurano F., Gianfrani C., Gobbetti M. 2007. Highly efficient gluten degradation by Lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Applied and Environmental Microbiology* 73(14): 4499–4507

Silano M., Pozo E.P., Uberti F., Manfredelli S., Del Pinto T., Felli C., Budelli A., Vincentini O., Restani P. 2014. Diversity of oat varieties in eliciting the early inflammatory events in celiac disease. *European Journal of Nutrition* 53: 1177–1186.

Skeritt J.H., Hill A.S., Andrews J.L. 2000. Antigenicity of wheat prolamins: detailed epitope analysis using a panel of monoclonal antibodies. *Journal of Cereal Science* 32: 259–279.



před není úniku!

Nurelle D

Spolehlivý účinek proti přenašečům viróz v obilninách (mšice, křísi).

Efektivní ochrana proti osenici a dalším škůdcům řepky na podzim.

Přípravek má dlouhodobou reziduální účinnost.

CORTEVA agriscience

Info: **602 275 038**

Predikce technologické kvality bílkovin kompozitní mouky s netradičními produkty

(Prediction of proteins technological quality of composite flour with non-traditional products)

Švec, I., Hrušková, M.

Ústav sacharidů a cereálií, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Souhrn: Obohacení pšeničné mouky různými rostlinnými materiály by mělo naplnit dva cíle – obohatit nabízené portfolio konečných produktů a vyvážit výživové skóre výrobků z pšeničné mouky. Éra zapomenutých cizích, často i zámořských rostlin je částečně na ústupu a jsou střídány plodinami domácími na evropském kontinentu. Tyto materiály nepochybně představují ječmen nebo lněné semeno; obě suroviny jsou bohaté zdroje dietní vlákniny, druhá uvedená i nenasycených mastných kyselin. Semena lněného semínka mohou být použita v neupravené formě, nebo jsou mlety do celozrnné (plnotučné) mouky. Efektivnějším využitím se zdá být oddělení oleje a výroba mouky z výlisků – pokrutin, tzv. lněné vlákniny. Použití této rostliny, přirozeně bezlepkové, může přinést určité technologické potíže, takže předpovídání kvality bílkovin je na místě. Tradičně se k tomuto účelu používá sedimentační Zelenyho test a moderní metoda profil retenčních kapacit. Předložená práce nabízí statistické srovnání obou analytických metod pro předpovídání kvality bílkovin v trojsložkových kompozitech na bázi pšeničné mouky a lněné vlákniny (ze zlatého i hnědého lnu). Testované netradiční materiály byly celozrnné mouky z tmavých semen chia, žlutých quinoi a hnědočervených canahui plus nopálová mouka, přidané do premixu až do 10 hmot. % (32 trojsložkových kompozitních vzorků). Pro Zelenyho test byla potvrzena jeho robustnost pro kvantifikaci kvality bílkovin, jako hlavní vliv byl určen kombinovaný efekt typu netradiční plodiny a výše přídavku. Retenční kapacita závisela hlavně na trojici hodnocených faktorů. Pomocí shlukové analýzy je potenciálně možno stanovit rozdíly v kvalitě bílkovin pro kompozity pšeničné mouky podle retenční kapacity kyseliny mléčné.

Klíčová slova: kompozitní pšeničná mouka, netradiční plodina, Zelenyho test, retenční kapacita, hierarchická shluková analýza