

VYUŽITÍ FLUORESCENČNÍCH METOD K DETEKCI SÓJOVÉHO PROTEINU V MASNÝCH VÝROBCÍCH USE FLUORESCENCE METHODS FOR THE DETECTION OF SOY PROTEIN IN MEAT PRODUCTS

Michaela Talandová, Matej Pospiech, Martina Eliášová, Bohuslava Tremlová

Abstract: The aim of the study was to prove the methodology for determination of soy protein in meat products by fluorescence microscopy. For detection was chosen a histological procedure optimized by using of cryo slices. In this procedure was not necessary to use dewaxing of slices, which reduces the time required for analysis. Our results were then compared with the ELISA method and immunohistochemical examination, where the percentage of matches for comparing fluorescence with ELISA were 75.59% and fluorescence with immunohistochemistry examination were 91.34%.

Keywords: immunohistochemistry, fluorescence microscopy, meat products, food allergy

ÚVOD

Pro snížení celkových nákladů v masném průmyslu je za dobrou strategii považováno používání levnějších rostlinných bílkovin jako náhrada masa. Bílkoviny z různých rostlinných zdrojů, jako je sójová, nebo pšeničná bílkovina jsou pro své vlastnosti používány jako plnivo a pojivo do masných výrobků. Hlavními kritérii pro použití rostlinných bílkovin v masných výrobcích jsou nižší výrobní náklady, dále pojivová schopnost, stabilita a vytváření homogenní textury (**Modi et al., 2003**). Sójové bílkoviny jsou široce používány po celém světě také díky jejich výživové hodnotě, funkčním vlastnostem nízkým nákladům na pěstování a snadnou využitelnost pro technologické zpracování, což umožňuje použití sójové bílkoviny v celé řadě potravinářských výrobků (**Saz and Marina, 2007**). Na druhou stranu je však sója spolu s kravským mlékem, vejci, pšenicí, arašídy, ořechy, rybami, korýši a měkkýši odpovědná za přibližně 90 % potravinových alergií a patří také mezi potraviny způsobující anafylaxi (**Sicherer and Sampson, 2000**). Potravinové alergie mohou být podle způsobu senzibilizace rozděleny do dvou tříd a to do I. a II. třídy potravinových alergií. U třídy I. dochází k potravinové alergii po senzibilizaci přes gastrointestinální trakt. Mezi typické zástupce této třídy patří právě sója (**Bohle et al., 2003**). Dosud bylo v sóji nalezeno 21 alergenních bílkovin (**Wilson et al., 2005**). Tři z nich a to bílkovina Gly m Bd 60K, Gly m Bd 30K a Gly m Bd 28K, jsou hlavními sójovými alergenními proteiny (**Ogawa et al. 2000**). Jedinou možností ochrany proti nežádoucím imunitním reakcím pro osoby s potravinovými alergiemi je striktně daný alergen ze své stravy vyloučit. Sice narůstá počet studií pojednávajících o snížení nebo strátu alergenicity, přesto však nejsou tyto postupy běžnou praxí. Většina populace s potravinovou alergií je tak stále závislá na přísném vyloučení potravin způsobujících nežádoucí alergické reakce z jejich stravy. Tento problém je také zakotven v legislativě Evropské unie a to ve směrnici 2011/1169/ES kterou se mění směrnice 2000/13/ES, která podmiňuje uvádění složek přítomných v potravinách. Mnoho výrobců potravin také preventivně varuje alergické spotřebitele upozorněním na obale výrobku, že ve

výrobku může být alergen přítomen. Průzkumy komerčně dostupných produktů ukazují, že přítomnost nebo absence preventivního varování příliš neodpovídá skutečné přítomnosti alergenu ve výrobku, (**Spanjersberg et al., 2007, Pele et al., 2007**), což by mohlo vést k potenciálně nebezpečným situacím (**Spanjersberg et al., 2010, Sheth et al., 2010**). Studie v Kanadě ukázala, že přibližně u 17 % osob s potravinovými alergiemi dochází k nechtěnému vystavení se alergenům v důsledku neúmyslné kontaminace výrobku během jeho výroby, kdy toto upozornění na obale chybí (**Sheth et al., 2010**). Naopak je mnoho výrobků, které alergeny neobsahují a přesto, toto upozornění mají na etiketě uvedeno. V důsledku toho může nastat situace, kdy alergický spotřebitel bude takoveto preventivní informace na výrobku ignorovat (**Hefle et al., 2007**). Aby došlo ke zlepšení situace, je nutný vývoj dostatečně citlivých metod, které umožní přesné určení alergenní potraviny a aby tak došlo k eliminaci počtu potravin s preventivním označením na obale. Vývoj takoveto metody pro detekci sójového proteinu v masných výrobcích byl cílem naší práce.

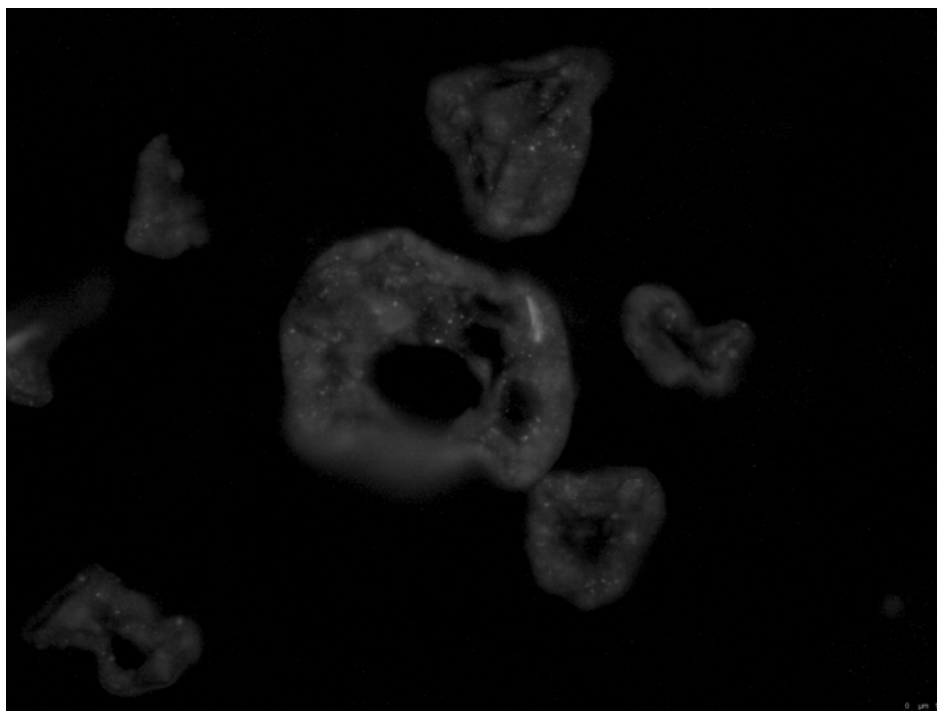
MATERIÁL A METODA

Vyšetřovaným materiálem bylo 129 masných výrobků zakoupených z tržní sítě, u kterých byla vyhodnocována přítomnost sójového proteinu, jehož množství musí být ve výrobcích pečlivě sledováno. Jako metoda detekce byla zvolena fluorescenční mikroskopie jakožto metoda citlivější a selektivnější než světelná mikroskopie. Vzorky byly nakrájeny na kostky o velikosti 1 x 1 x 0,5cm a zpracovány ve formě kryořezů. Vlastní zpracování bylo z důvodu lepší fixace řezu zahájeno vložением vzorků do acetonu, následovalo promytí v PBS, blokace nespecifické vazby pomocí Goat normal séra a aplikace primární protilátky antisoy Rabbit. Vzorky byly nechány přes noc v lednici a druhý den byl proveden oplach v PBS. Dále byla na vzorky aplikována biotinylovaná sekundární protilátka, následovalo další promytí v PBS a nakonec byl na vzorky nanesen fluorochrom Texas Red. Pro kontrolní vzorky byl použit imunohistochemický postup dle **Pospiecha (2011)**. Po té byly řezy zamontovány a vyšetřeny pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica type-11307072057/BZ:09 a dále zpracovávány programem Leica IM 50. Získané snímky byly uloženy ve formátu TIFF. Výsledky byly srovnány s ELISA vyšetřením.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Výzkum byl zaměřen na detekci sójového proteinu, který je řazen mezi alergeny a může způsobovat anafylaxi (Sicherer and Sampson, 2000). Tento protein se do masných výrobků přidává kvůli pojivové schopnosti, stabilitě a vytváření homogenní textury (Modi et al., 2003). Bylo zpracováno 129 masných výrobků z tržní sítě, kdy přítomnost či nepřítomnost sójového proteinu deklaroval výrobce na obale výrobku. Vyšetřovací metodou byla zvolena fluorescenční imunohistochemie. Sójový protein byl detekován u 87,4 % vzorků na základě své specifické struktury a dále za pomoci fluorescence, které bylo dosaženo pomocí imunohistochemického postupu a barvením pomocí fluorochromu Texas Red. Imunohistochemické postupy jsou obecně založeny na reakci mezi alergenem a příslušnou značenou protilátkou. Navázání značené protilátky bylo hodnoceno ve fluorescenčním mikroskopu s I3 filtrem. Pro fluorochrom Texas Red je doporučován filtr červený (Biocompare, 2005). Vyšetření bylo založeno na vytvoření fluorescenčního zbarvení, které signalizuje pozitivní reakci antigenu s protilátkou. Na obrázku č. 1 je sójový protein bílošedé barvy a je tak tedy možné odlišit jej od bílkoviny masa, která nefluoreskuje a je černá. V preparátech bylo možné sójový protein detekovat také na základě jeho specifické morfologické struktury, kdy sójová bílkovina má charakteristický tvar prstencovitých, popř.

srpovitých až kruhovitých částic (Horn, 1987). Jak ve své studii uvádí Spanjersberg et al. (2007) průzkumy komerčně dostupných produktů ukazují, že přítomnost nebo absence preventivního varování příliš neodpovídá skutečné přítomnosti alergenu ve výrobku, což by mohlo vést k potenciálně nebezpečným situacím (Spanjersberg et al., 2010, Sheth et al., 2010). Z tohoto pohledu se jako důležité jeví vypracování spolehlivých metod detekce tohoto alergenu.



Obr. č. 1. Mikrofotografie sójového proteinu v masném výrobku (zvětšení 400x)

Námi získané výsledky jsme srovnali s výsledky z metody ELISA a imunohistochemického vyšetření. Získané hodnoty z nálezu sójového proteinu u jednotlivých metod udává tabulka č. 1. Tabulka č. 2 znázorňuje procenta shody, kdy je srovnávána fluorescence s imunohistochemickým vyšetřením a s ELISOU.

Tab. č. 1. Detekce sójového proteinu jednotlivými metodami

Nález sójové bílkoviny (Suma výsledků)	Fluorescence (%)	Imunohistochemie (%)	ELISA (%)
pozitivní	111 (87,40)	108 (83,72)	96 (74,42)
negativní	13 (10,24)	14 (10,85)	16 (12,40)
dubiózní	3 (2,36)	7 (5,43)	17 (13,80)

Tab. č. 2. Procenta shody fluorescence a dalších metod

Srovnání fluorescence s:	Procenta shody
Imunohistochemie	91,34
ELISA	75,59

Jak z tabulky č. 1 tak z tabulky č. 2 vyplývá, že imunohistochemie s fluorescencí dávaly obdobné výsledky. Procenta shod pro srovnání těchto dvou metod byla 91,34. Hůř

dopadlo srovnání fluorescence s metodou ELISA. Tento výsledek byl nejspíš zapříčiněn výrazným nárůstem dubinózních výsledků ve srovnání se zbylými dvěma metodami.

ZÁVĚR

Byla vyvinuta fluorescenční mikroskopická metoda pro detekci sójového proteinu. Pro vyšetření jsme modifikovali histologický postup parafinových řezů s imunohistochemickým zvýrazněním sójového proteinu pomocí fluorochromu. Místo klasických parafinových bločků byly použity kryorezy z důvodu lepší vazby antigen-protilátka. Při tomto postupu nebylo nutné použít odparafinování řezů, čímž byl postup zkrácen. Imunofluorescenční metoda pro detekci sójového proteinu byla ověřena na základě vyšetření 129 masných výrobků zakoupených z tržní sítě pozitivních bylo 111 vzorků, negativních 13 a dubinózní byly vzorky 3. Pro ověření metody bylo provedeno srovnání s ELISA metodou a s imunohistochemickým vyšetřením. Výsledky poukazují na možnost použití této metody na průkaz sójového proteinu v masných výrobcích.

LITERATURA

- Biocompare [online]. United States of America: biocompare, December 12, 2005 [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: http://www.biocompare.com/documents/fluor_wavelengths.pdf
- BOHLE, B., RADA KOVICS, A., JAHN-SCHMIDT, B., HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. et al. 2003. Bet v 1, the major birch pollen allergen, imitates sensitization to Api g 1, the major allergen in celery: evidence at the T cell level. In *Eur. J. Immunol.*, 2003, vol. 33, no. 12, p. 3303–3310.
- HEFLE, T. J., FURLONG, L., NIEMANN, H., LEMON-MULE, S., SICHERER, S. L., TAYLOR. 2007. Consumer attitudes and risks associated with packaged foods having advisory labeling regarding the presence of peanuts. In *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, vol. 120, p. 120.
- HORN, D. 1987. Zum Nachweis pflanzlicher Eiweisszubereitungen in Fleischerzeugnissen mit histologischen Untersuchungsverfahren. In *Fleischwirtschaft*. 1987, vol. 67 no. 5, p. 616–618.
- MODI, V. K., MAHENDRAKAR, N. S., NARASIMHA RAO, D., SACHINDRA, N. M. 2003. Quality of buffalo meat burger containing legume flours as binders. In *Meat Science*, 2003, vol. 66, p. 143–149.
- OGAWA, T., SAMOTO, M., TAKAHASHI, I. 2000. Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. In *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 2000, vol. 46, p. 271–279.
- PELE, M., BROHEE, M., ANKLAM, E., VAN HENGEL, A. J. 2007. Peanut and hazelnut traces in cookies and chocolates: relationship between analytical results and declaration of food allergens on product labels. In *Food Addit Contam*, 2007, vol. 24, p. 1334–1344.
- SAZ, J. M., MARINA, M. L. 2007. High performance liquid chromatography and capillary electrophoresis in the analysis of soybean proteins and peptides in foodstuffs. In *Journal of Separation Science*, 2007, vol. 30, p. 431–451.
- SHETH, S. S., WASERMAN, S., KAGAN, R., ALIZADEHFAR, R., PRIMEAU, M. N., ELLIOT, S. et al. 2012. Role of food labels in accidental exposures in food-allergic individuals in Canada. In *Ann. Allergy Asthma Immunol*, 2012, vol. 104, p. 60–65.
- SICHERER, S. H., SAMPSON, H. A. 2000. Peanut and tree nut allergy. In *Curr. Opin. Pediatr.*, 2000, vol. 12, no. 6, p. 567–573.
- SPANJERSBERG, M. Q., KNULST, M. Q., KRUIZINGA, A. G., VAN DUIN, G., HOUBEN, G. F. 2007. Concentrations of undeclared allergens in food products can reach levels that are relevant for public health. In *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2007, vol. 27, p. 169–174.
- SPANJERSBERG, M. Q., KRUIZINGA, A. G., RENNEN, M. A., HOUBEN, G. F. 2007. Risk assessment and food allergy: the probabilistic model applied to allergens. In *Food Chem Toxicol*, 2007, vol. 45, p. 49–54.
- WILSON S. L., BLASCHEK, S., K., DE MEJIA, E. G. 2005. Allergenic proteins in soybean: processing and reduction of P34 allergenicity. In *Nutrition Reviews*, 2005, vol. 63, p. 47–58.

Poděkování: Výzkum byl podpořen projektem IGA VFU 2/2012/FVHE

Kontaktní adresa: Mgr. Michaela Talandová, VFU Brno, FVHE, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, talandovam@vfu.cz