

## Studija o nalazu pšeničnog glutena u različitim životnim namirnicama\*

Spirić Danka<sup>1</sup>, Borović Branka<sup>1</sup>, Velebit Branko<sup>1</sup>, Lakićević Brankica<sup>1</sup>, Babić Jelena<sup>1</sup>, Milijašević Milan<sup>1</sup>, Janković Vesna<sup>1</sup>

*Sadržaj:* Gluten je skladišni protein iz zrna pšenice, raži, ječma i njihovih hibridnih vrsta. Gluten, odnosno njegova prolaminska frakcija gliadin, je alergen koji izaziva zapaljenje crevne mukoze, kod osetljivih, genetski predisponiranih osoba. Oboljenje koje gluten izaziva – celijakija, može se sprečiti jedino doživotnom primenom „gluten free“ dijetete. Prema Codexu alimentariusu, namirnice sa sadržajem glutena manjim od 20 mg/kg pogodne su za „gluten free“ dijetu, a namirnice sa sadržajem glutena od 20 do 100 mg/kg mogu se deklarirati kao „namirnice sa smanjenim sadržajem glutena“. Cilj ovog rada je bio da se ispita bezbednost proizvoda koji su deklarirani kao pogodni za ishranu ljudi obolelih od celijakije i namirnica koje po svom sastavu ne sadrže gluten i proteine žitarica. ELISA metodom ispitan je 561 uzorak; 472 proizvoda koji po svojoj prirodi ne sadrže soju i 89 proizvoda deklariranih kao „gluten-free“ dijetetske namirnice. U svim uzorcima sa deklaracijom „bez glutena“/„gluten free“ koje smo ispitali, sadržaj glutena je bio manji od limita detekcije metode (3 mg/kg). U soji, koja po svojoj prirodi ne sadrži gluten, utvrđen je gluten u tragovima u 11% uzoraka. Sadržaj glutena od 3 do 20 mg/kg, nađen je u manje od 1%, a samo dva uzorka od ispitanih 472, imala su vrednosti sadržaja glutena veće od 100 mg/kg. Rezultati su obrađeni statističkim programima Origin 8 i Statistica 7, metodama deskriptivne statistike.

*Ključne reči:* gluten, R5 ELISA, soja, namirnice.

### Uvod

Gluten je frakcija proteina koja se nalazi u plodovima pojedinih vrsta žitarica. Najviše ga ima u endospermu zrna pšenice, raži i ječma, u maloj količini u ovsu, a kukuruz i pirinač ne sadrže gluten. Proteinski kompleks glutena, podeljen je na prolamine, rastvorljive u alkoholu, i gluteline koji su nerastvorljivi u alkoholu. Gliadin i druga komponenta glutena, glutenin, nalaze se u odnosu 1:1. Gliadin se sastoji iz alfa, beta, gama i omega gliadina (Lester, 2008). Podela je sačinjena prema brzini razdvajanja tokom elektroforeze i prema razlici u amino-kiselinskim sekvencama. Glutenin se sastoji od subjednica male i velike molekulske mase (LMW–low molecular weight i HMW–high molecular weight).

Namirnice koje sadrže gluten su namirnice u koje se, u nekoj od tehnoloških faza, u njihov sastav uključuju pšenica, raž, ječam, ili ovas. U tabeli 1

prikazane su grupe namirnica i očekivana zastupljenost glutena u njima.

Namirnice u kojima je najmanja verovatnoća nalaženja glutena su voće, povrće, meso, proizvodi od mleka i namirnice koje se dobijaju preradom sirovina koje ne sadrže žitarice. Intolerancija na gluten se najčešće javlja kod osetljivih i genetski predisponiranih osoba (Briani i dr., 2008; Rostami i dr., 2004). Iz navedenih razloga ove osobe treba da se celog života pridržavaju posebnog režima ishrane, odnosno da iz svoje ishrane isključe namirnice koje sadrže gluten. Obazrivost osoba koje se pridržavaju dijetete „bez glutena“ neophodna je i pri konzumiranju proizvoda na bazi žitarica koji su prošli niz tehnoloških postupaka kojima je ekstrahovan gluten, jer, usled nepotpune ekstrakcije, postoji mogućnost pojave tragova glutena. Osobina pšeničnog glutena da vezuje i emulguje, korišćena je često u industriji mesa pri proizvodnji kobasica, pašteta i drugih proizvoda od mesa (Wangang i dr., 2010). Iz tih razlo-

**\*Napomena:** Prezentovani rezultati proistekli su iz projekta „Unapređenje metoda kontrole bezbednosti i kvaliteta proizvoda od mesa radi potpunije zaštite zdravlja i interesa potrošača“ ev. br. TR20145, koji u okviru Programa istraživanja u oblasti tehnološkog razvoja finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

<sup>1</sup>Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Kačanskog 13, 11 000 Beograd, Republika Srbija.

**Tabela 1.** Vodič za dijetu „bez glutena“ (Shendry i dr., 2009)**Table 1.** Gluten-Free Diet Guidelines (Shendry et al., 2009)

<b>Izbegavati sledeće namirnice/Avoid following food stuffs (in any form)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sve vrste brašna (klice, mekinje, ljuspice, griz, durum, graham brašno, einkorn brašno, bulgur, kus-kus, raž, ječam, tritikale, ovas)/All wheat forms (germ, bran, spelt, semolina, durum, faro, graham, einkorn, bulgar, conscous), rye, barley, triticale, oat</li> <li>• Izbegavati proizvode koji sadrže laktozu tokom akutnog pogoršanja stanja/Avoid lactose products during acute exacerbations</li> </ul>
<b>Dozvoljeno/Allowed</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Voće, povrće, riba, meso, kukuruz, pirinač, krompir, tapioka, kvinoa, amarant, lan, orahova brašna, arrowroot, leguminoze, pasulj, garfava, šećerna trska, proso, tef brašno/Vegetables, fruits, fish and meat, rice, corn (maize), potato, tapioca, quinoa, amaranth, flax, nut flours, arrowroot, beans, garfava, lentil, sorghum, buckwheat, millet, xanthum gum, guar gum</li> </ul>
<b>Obazrivost kod sledećih proizvoda na bazi žita/Caution with these potentially grain-based products</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Skrobovi, slad (u vidu aroma, ekstrakta, sirupa), šećerne glazure, soja sos, punjenja, penasti i gumeni dezerti/Food starch, malt (flavoring, extract, syrup), icing sugar, soy sauce, fillings, gum base, hydrolyzed vegetable or plant protein, white vinegar, some fat substitutes, some medications</li> <li>• Hidrolizovani proteini biljaka i povrća, belo vinsko sirće, biljne zamene za masnoću i neki medicinski i kozmetički preparati/Hydrolyzed vegetable or plant protein, white vinegar, some fat substitutes, some medications</li> </ul>

ga je pri konzumiranju ovih namirnica potrebna obazrivost osoba koje se pridržavaju dijetu „bez glutena“.

Preosetljivost na gluten je označena kao celijakija, celijačna bolest, i osim režima ishrane u obliku dijetu bez glutena, ne postoji lek za ovaj hronični poremećaj. Fragmenti gliadina iz hrane odgovorni su za proliferaciju T-limfocita intestinalne mukoze (Thompson i Mendez, 2008). Prvi simptomi oboljenja su, najčešće, mučnina, povraćanje, dijareja i gubitak telesne mase (Guandalini i Gupta, 2002). Mnogi pacijenti nemaju kliničke znake, već je bolest u latentnom obliku, a dijagnostiku se serološkim testovima ili biopsijom creva (Di Sabatino i Roberto, 2009). Režim ishrane u vidu izbegavanja hrane u kojoj se može naći gluten, umanjuje mogućnost pojave drugih autoimunih oboljenja (Niewinski, 2008;

Briani i dr., 2008). Pored antitela specifičnih za uzročnika celijakije, gliadina, kod pacijenata su u crevnoj mukozi prisutna i autoantitela tkivne transglutaminaze, TG2 Ab. Prisustvo ovih autoantitela direktno dovodi do poremećaja fizioloških procesa na nivou intestinalnih ćelija mukoze, što indirektno dovodi do atrofije crevnih resica i dalje do ozbiljnih oštećenja jetre (Sollid i Jabri, 2005). Izostanak pravovremenog lečenja, tj. nepridržavanje „gluten-free“ dijetu, olakšava pojavu drugih autoimunih oboljenja kojima su osobe sa celijakijom genetski sklone: maligna oboljenja digestivnog trakta, osteoporoza i diabetes melitus (Ciclitira i dr., 2005). Zastupljenost celijakije u različitim državama gde su sprovedena istraživanja pojave oboljenja, prikazana su u tabeli 2.

Rezultati nekih autora (Ress i dr., 2007; Rostami i dr., 2004; Fasano i dr., 2003) ukazuju da

**Tabela 2.** Prevalenca celijakije u Evropi i svetu (prema Guandalini i dr., 2002)**Table 2.** Prevalence of celiac disease in Europe and World (according Guandalini et al., 2002)

Prevalenca celijakije/ <i>Prevalence of celiac disease</i>	Prevalenca prema kliničkoj dijagnozi/ <i>Area Prevalence on clinical diagnosis</i>	Prevalenca prema skriningu/ <i>Prevalence from screening</i>
Danska/Denmark [53]	1:10.000	1:330
Finska/Finland [54]	1:1000	1:130
Nemačka/Germany [55, 56]	1:2300	1:500
Italija/Italy [57]	1:1000	1:184
Holandija/Netherlands [58, 59]	1:4500	1:198
SAD/US [5]	1:10.000	1:250
Švedska/Sweden [60]		1:100
Prosek/Average	1:3345	1:241

je prevalenca celijakije 1:300, a pri tome je 1% populacije nosilac gena za celijakiju.

Prema Codexu alimentariusu (118/1979, amm. 1983, rev. 2008), hrana sa oznakom „gluten-free“ (bez glutena) su namirnice koje se sastoje od jednog ili više sastojaka koji ne sadrže pšenicu, raž, ječam, ovas ili njihove hibride, a kod kojih sadržaj glutena ne prelazi 20 mg/kg u trenutku dospeća do krajnjeg potrošača. Takođe, oznaku „gluten-free“ mogu nositi i namirnice koje sadrže ili se sastoje od jedne ili više žitarica (pšenica, raž, ječam, ovas ili njihovih hibrida) koje su podvrgnute specijalnim tehnološkim procesima uklanjanja glutena, i kod kojih sadržaj glutena ne prelazi 20 mg/kg. Posebna kategorija hrane sa smanjenim sadržajem glutena su namirnice koje se sastoje ili sadrže pšenicu, raž, ječam, ovas ili njihove hibride, a kod kojih je sadržaj glutena u intervalu od 20 mg/kg do 100 mg/kg. Za detekciju glutena u namirnicama mogu da se koriste: imunološke metode, metode lančane polimerazne reakcije (*Debnath i dr.*, 2009), metoda masene spektrometrije – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time-of-flight mass analyzer MALDI/TOF MS (*Li i dr.*, 2009) i metode tečne hromatografije - High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC-IPAD) (*Rombouts i dr.*, 2009). Imunološke metode kojima se detektuje gluten prisutan u namirnicama zasnovane su na reakciji primarnih antitela i prolaminskih frakcija glutena iz uzorka. Od 1990, kada su sintetisana prva antitela za detekciju glutena, do danas korišćena su sledeća antitela: MAb 401.21, PN3 MAb i R5 MAb (*Van Eckert*, 2010). Prvobitno korišćena antitela MAb 401.21 razvili su *Skerit i Hill* (1990), a validovala AOAC, (Association of Analytical Chemists 1991), kroz „ring“-tesove. Ova antitela reaguju, uglavnom, sa komponentom omega gliadina, a korišćena su u komercijalnim kitovima: BioKits Gluten Assay Kit (Tepnel BioSystems Ltd.), UK, RIDA-SCREEN Gluten Kit R6101, stari test sistem R-Biopharm AG, Germany, i Transia Plate Gluten (Transia GmbH), UK. PN3 Mab antitela reaguju sa alfa prolaminima, kako sa gliadinom tako i sa sekalinom, aveninom i hordeinom, iz raži, ovasa, odnosno ječma. Za ova antitela utvrđeno je da ne reaguju sa subjedinicama glutenina HMW (*Bermudo i dr.*, 2005). Monoklonalna antitela R5, prvobitno sintetisana za reakciju sa sekalinom, pokazala su isti stepen reaktivnosti sa gliadinom i hordeinom, dok sa aveninom nisu reagovala. Svaki od ova tri proteina detektuje različite kombinacije proteina (*Van Eckert i dr.*, 2010). PN3-mAb antitela uglavnom reaguju sa alfa gliadinima, a R5 uglavnom sa alfa, gama i omega gliadinima. 401.21-mAb antitela reaguju sa

omega gliadinima, u većoj meri sa LMW nego sa HMW gluteninima, a mnogo manje sa alfa i gama gliadinima. Prema revidiranom Codex alimentariusu (118/1979, amm. 1983, rev.2008), ELISA metode koje koriste R5 monoklonalna antitela predstavljena su kao najpogodnije imunološke metode za detekciju glutena u namirnicama.

Cilj našeg rada je bio da se jednom opsežnom studijom ispita bezbednost proizvoda na našem tržištu, koji su deklarirani kao pogodni za ishranu ljudi obolelih od celijakije i namirnica, koje po svom sastavu ne sadrže gluten i proteine žitarica.

## Materijal i metode

U toku perioda od deset meseci ispitan je ukupno 561 uzorak različitih vrsta namirnica. Od ukupnog broja ispitanih uzoraka 89 je deklarirano oznakom „bez glutena“, a preostali uzorci su namirnice ili sirovine koje, prema Codex alimentariusu (118/1979, amm. 1983, rev. 2008), zbog porekla sirovine i tehnološkog procesa prerade, mogu da nose oznaku „hrana po svojim prirodnim svojstvima bez glutena“. Svi ispitani uzorci koji su prema važećem Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti dječetskih proizvoda (Sl. glasnik RS 45/10) označeni deklaracijom „bez glutena/gluten free“, analizirani su akreditovanom ELISA metodom za određivanje sadržaja glutena sa komercijalnim kitovima proizvođača Immunolab i Tepnel. Kit proizvođača Tepnel korišćen je samo u početku. Nakon što je paralelnim ispitivanjima utvrđeno da rezultati analiza uzoraka ispitanih ovim kitom daju lažno pozitivan odgovor, za ispitivanje preostalih 561 uzorka korišćen je kit proizvođača Immunolab. Reakcija ovog kita bazirana je na „sendvič“ tipu ELISA reakcije gliadina iz uzorka/standarda i monoklonalnih R5 antitela specifičnih za fragmente gliadina (*Van Eckert i dr.*, 2010), koji izazivaju stimulaciju T-ćelija mukoze tankog creva (*Heap i dr.*, 2009). Deklarirani limit detekcije kita proizvođača Immunolab je 0,3 mg/kg (Test Instruction Gluten/Gliadin, GLU-E02 Immunolab, Deutschland). Antitela koja su korišćena u metodi ovog proizvođača reaguju, uglavnom, sa omega gliadinom, koji je jedini termostabilan. U zavisnosti od standarda koji se koriste prilikom ispitivanja (alfa-, beta-, gama- ili omega gliadin), odgovor može biti jačeg ili slabijeg intenziteta (*Thompson i Mendez*, 2008). Za internu kontrolu prinosa reakcije korišćeno je kukuruzno brašno. Nakon procesa ekstrakcije, dokazano je da je sadržaj glutena u ovim uzorcima ispod limita detekcije. Rastvor glutena dobijen je iz referentnog materijala 8418 Wheat Gluten, U.S. Department of Commerce National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg,

MD 20899. Ovim rastvorom obogaćeni su uzorci kukuruznog brašna, koje je u prethodnom ogledu dalo vrednost glutena ispod limita detekcije.

**Ekstrakcija gliadina:** Gliadin je prolamin rastvorljiv u 40–90% alkoholu, i nerastvorljiv u 0,5 M NaCl, dok je glutenin nerastvorljiv u alkoholu i fiziološkom rastvoru. Ove osobine osnova su za proces ekstrakcije gliadina u vodenom rastvoru etanola. Samleveni i homogenizovani uzorci ekstrahovani su u 40% etanolu (1 g uzorka : 10 ml rastvora etanola), vorteksovani i centrifugirani 10 minuta na 3000 obrtaja u minuti. Nakon toga, supernatant je dodatno razblažen rastvorom Tris pufera, 1:100, zbog osobine  $\beta$ -merkaptetoetanolu da ometa ELISA reakciju.

**Princip reakcije:** U ogledu je korišćeno po 100  $\mu$ l razblaženog ekstrakta. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 časa i ispiranja nevezanog sadržaja, dodat je konjugovani enzim „horse-radish“ peroksidaza (HRP) i uzorci su inkubirani još 30 minuta. Nevezana količina antigliadin peroksidaze je isprana i dodat je hromogen tetrametilbenzidin (TMB). Bojena reakcija prekinuta je dodavanjem 0,5 M  $H_2SO_4$ . Dobijene vrednosti absorbanci očitane su na MultiscanAscent spektrofotometru pri talasnoj dužini od 450 nm. Dobijeni rezultati su obrađeni i interpolirani u statističkim programima Origin 8 i Statistica 7, metodama deskriptivne statistike.

## Rezultati ispitivanja i diskusija

U tabeli 3 prikazani su rezultati koji su dobijeni za namirnice „bez glutena“. Na osnovu prikazanih rezultata može se videti da su dobijene vrednosti bile manje od 3 mg/kg glutena, tj. bile su ispod limita detekcije za sve ispitane uzorke. Prinos glutena u obogaćenom uzorku kukuruza kretao se od 87% – 95%.

U deklarisanom sastavu proizvoda nije bilo naznake da se u ovim dijetetskim namirnicama nalaze pšenica, ječam, raž ili ovas, ili da su prethodno podvrgnuti ekstrakciji glutena i smanjenju sadržaja toksičnih prolamina. Može se zaključiti da su, sa sta-

novišta „gluten free“ proizvoda, ove namirnice proizvedene tako što je korišćena dobra proizvođačka praksa i sprečena unakrsna kontaminacija, i tako što su korišćene sirovine koje ne sadrže pšenični gluten. Na grafikonu 1 prikazan je nalaz glutena u različitim „gluten free“ namirnicama. Isti uzorci analizirani su kitovima dva različita proizvođača.

S obzirom da su od deset uporedo ispitanih uzoraka označenih „gluten-free“ oznakom, četiri pokazala vrednost gliadina od preko 10 mg/kg, što odgovara vrednosti 20 mg/kg glutena, kit proizvođača Tepnel nije dalje korišćen za određivanje sadržaja glutena u namirnicama.

U tabeli 4 prikazani su rezultati ispitivanja sadržaja glutena u uzorcima soje i proizvoda od soje.

U 55 od 472 ispitana uzorka (11%), određen je sadržaj glutena, u opsegu koncentracija od 3 do 20 mg/kg, dok je u 8 (< 1%), sadržaj glutena prelazio 20 mg/kg. Samo su dva uzorka, od ispitanih 472, imala vrednosti glutena veće od 100 mg/kg.

Soja je leguminoza i u svom zrnu ne sadrži toksične prolamine, uzročnike celijakije. Dobijeni rezultati za gluten u uzorcima soje, do 20 mg/kg; od 20 mg/kg do 100 mg/kg i preko 100 mg/kg, posledica su kontaminacije uzoraka, ili ukrštene reakcije nekog od sastojaka proizvoda i antitela sa mikrotitar ploče. Kontaminacija je moguća već i kod deklariranih „gluten-free“ proizvoda. Prema podacima iz literature, od 17 „gluten free“ deklariranih uzoraka čak tri su imala više od 20 mg/kg glutena, a jedan od njih je bio sojino brašno (*Olexova i dr.*, 2004). *Størsrud i dr.* (2003) su u četrnaest procenata proizvoda deklariranih kao „gluten free“ ustanovili više od 200 mg/kg glutena. U opsežnim ispitivanjima analizirano je 3000 proizvoda na prisustvo glutena, a u čak trećini „gluten free“ proizvoda sa tržišta Evrope, utvrđeno je više od 20 mg/kg glutena (*Valdés i dr.*, 2003). R5 ELISA metodom ustanovljeno je da je 15% uzoraka koji su prirodno bez glutena i 5% deklariranih kao „gluten free“ bilo kontaminirano glutenom (*Gélinas i dr.*, 2008). Zbog toga navedeni autor predlaže deklarisanje proizvoda: „može sadržati gluten“ ili „proizvedeno u fabrici gde se prera-

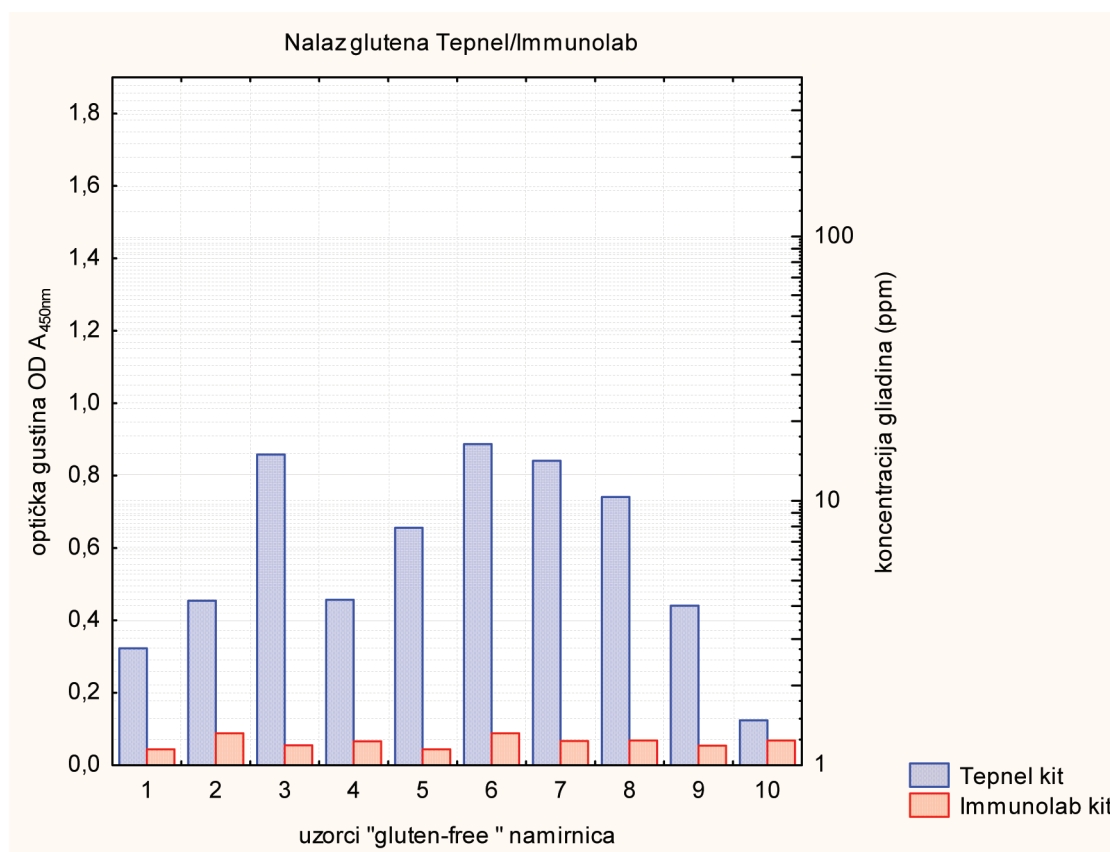
**Tabela 3.** Nalazi glutena u „gluten free“ namirnicama

**Table 3.** Gluten findings in „gluten free“ food stuffs

Vrsta uzorka/ <i>Type of sample</i>	Ukupno/ <i>Total</i>	< 3mg/kg*	< 3mg/kg–20 mg/kg	> 20 mg/kg
Dečija kašica/ <i>Baby food</i>	13	13	0	0
Dečiji sok/ <i>Baby juice</i>	8	8	0	0
Povrtna supa/ <i>Vegetable soup</i>	16	16	0	0
Dečije žitarice/ <i>Children's cereals</i>	48	48	0	0
Pašteta/ <i>Meat paté</i>	4	4	0	0

3 mg/kg\* – limit detekcije metode/detection limit of the method





**Grafikon 1.** Prikaz nalaza glutena dobijenih korišćenjem ELISA kitova različitih proizvođača  
**Graph 1.** Gluten finding obtained by using ELISA kits from different producers

**Tabela 4.** Sadržaj glutena u uzorcima soje i proizvoda od soje  
**Table 4.** Gluten content in soy bean samples and soy products

Vrsta uzorka/ Type of sample	Ukupno/ Total	3mg/kg	3 mg/kg - 20 mg/kg	20-100 mg/kg	> 100 mg/kg
Sojino zrno/Soy bean seed	51	48	3	0	0
Sojino brašno/Soy bean flour	123	98	25	0	0
Sojine ljuspice/ Soy bean hulls	143	134	8	1	0
Sojin griz/Soy bean grits	37	22	10	3	2
Sojine flekice/ Soy bean flakes	91	86	5	0	0
Sojin lecitin/Soy lecithin	9	9	0	0	0
Sirće (alkoholno)/ Vinegar (alcohol)	1	1	0	0	0
Sojini komadići/ Soy bean chunks	9	7	2	0	0
Sojini odresci/ Soy bean stakes	3	2	1	0	0
Sojina pašteta/Soy bean paté	1	0	1	0	0
Sojino ulje/Soy bean oil	3	3	0	0	0
Sojino mleko u prahu/ Soy bean powder milk	1	1	0	0	0
Ukupno/Total	472	411	55	4	2

đu je pšenica“. S obzirom na ovako visok procenat nalaza glutena u „gluten free“ proizvodima, nije iznenađujući podatak da je 13 od 59 uzoraka, koji prirodno ne sadrže gluten, imalo sadržaj glutena između 20 mg/kg i 200 mg/kg (Thompson, 2004).

Za ekstrakciju glutena iz uzoraka su korišćene plastične kivete za jednokratnu upotrebu sa čepovima i etanol iz originalnih litarskih boca. Prostorija za pripremu uzoraka, stolovi i oprema su očišćeni i nije manipulirano drugim uzorcima kod kojih se prisustvo glutena moglo očekivati. Mikrotitarske ploče su tokom inkubacije prekrivane samolepljivom folijom, a ručnim ispiranjem bunarčića izbegnuta je njihova međusobna kontaminacija. Uzorci koji su pokazali pozitivan nalaz glutena ponovo su analizirani, sa kompletnim koracima ekstrakcije i inkubacije. Primjenjene mere i principi dobre laboratorijske prakse svode na minimum mogućnost da nalaz glutena bude posledica kontaminacije nakon prispeća uzorka.

Prema deklaraciji proizvođača kita Tepnel, odnosno Immunolab, ne postoji ukrštena reakcija antigliadin antitela sa mikrotitarske ploče i proteina pirinča, kukuruza, soje, prosa, kakao praha, mleka, jaja, goveđeg mesa, i mogućnost unakrsne kontaminacije može biti vezana samo za, eventualno, prethodno izlaganje uzoraka nekim od prolamina žitarica sa kojima monoklonalna antitela imaju spo-

**Tabela 5.** Ukrštena reakcija antitela iz kita  
**Table 5.** Cross reaction of antibodies from the kit

Žitarica/Cereals	Ukrštena reakcija/ Cross reaction (%)
Ječam/Barley	100
Raž/Rye	5
Triticosecale	40

sobnost ukrštene reakcije (tabela 5).

Pšenični gluten može da kontaminira sirovine koje su po svom prirodnom sastavu bez glutena u toku manipulacije ovim proizvodima. Rotacija useva, žetva, transport i skladištenje, ključne su tačke rizika

za kontaminaciju ovih sirovina. Pilot studijom koja je sprovedena u SAD, gde je ispitivan sadržaj glutena u žitaricama koje ne sadrže gluten po svom poreklu, nađeno je u sedam od 22 uzorka više od 20 mg/kg glutena. Za prolamine ovsu nije dokazano njihovo direktno toksično delovanje na pacijente obolele od celijačne bolesti. Međutim, u sprovedenom istraživanju (Størsrud i dr., 2003), u 9 od 12 uzoraka ovsu iz proizvodnog pogona detektovan je sadržaj glutena veći od 20 mg/kg.

## Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je neophodno ispitivanje namirnica i sirovina koje ulaze u sastav proizvoda namenjenih dijete osoba sa intolerancijom na gluten. Potrebno je i da proizvođači usavrše odgovarajuće ELISA kitove sa niskim pragom osetljivosti za gluten i visokom specifičnošću za isti, da bi se izbegle lažno pozitivne reakcije i da bi se sa maksimalnom sigurnošću mogli utvrditi fragmenti gliadina, odgovorni za proliferaciju T-limfocita intestinalne mukoze. Namirnice koje po svojoj prirodi ne sadrže gluten, takođe bi trebalo ispitati na prisustvo glutena, jer postoji mogućnost kontaminacije, tako da proizvod gubi mogućnost deklarisanja „bez glutena“, ili „namirnica sa smanjenim sadržajem glutena“. Da bi se naglasila razlika između proizvoda koji po svojoj prirodi ne sadrže gluten od istih tih proizvoda koji nisu namenski dijetetski proizvodi za osobe obolele od celijakije, poslednjih godina, sve je češće deklarisanje proizvoda: „može sadržati gluten“ ili „proizvedeno u fabrici gde se prerađuje pšenica“. Ovakav način obeležavanja namirnica vraća poverenje osoba na specijalnom režimu ishrane u bezbednost dostupnih proizvoda.

U našim ispitivanjima u 55 od 472 ispitana uzorka (11%) određen je sadržaj glutena u opsegu koncentracija od 3 do 20 mg/kg, dok je u 8 (< 1%) uzoraka sadržaj glutena prelazio 20 mg/kg. Samo dva uzorka, od ispitanih 472, imala su vrednosti glutena veće od 100 mg/kg.

## Literatura

Bermudo R., Griffin M. C., Garzon R. P. B., Ellis M., Ciciltira H. J., O'Sullivan P. J., 2005. Monoclonal antibody-based competitive assay for the sensitive detection of coeliac disease toxic prolamins. *Analytica Chimica Acta* 551, 105–114.

Briani C., Samaroo D., Alaedini A., 2008. Celiac disease: From gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 7, 644–650.

Ciciltira P. J., Ellis H. J., Knut E. L. A., 2005. Gluten-free diet – what is toxic? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 19, 359–371.

Codex standard for foods for special dietary use for persons, intolerant to gluten codex stan 118-1979, Adopted in 1979; amended 1983; revised 2008.

Debnath J., Martin A., Gowda L. R., 2009. A polymerase chain reaction directed to detect wheat glutenin: Implications

- for gluten-free labelling. Food Research International, 42, 2009, 782–787.
- Di Sabatino A., Roberto C. G., 2009.** Coeliac Disease. Lancet, 373, 1480–93.
- Fasano A., Berti I., Gerarduzzi T., 2003.** Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. Archives of Internal Medicine, 163, 3, 286–92.
- Gélinas P., McKinnon C. M., Mena M. C., Méndez E., 2008.** Gluten contamination of cereal foods in Canada. International Journal of Food Science and Technology, 43, 1245–1252.
- Guandalini S., Gupta P., 2002.** Celiac disease A diagnostic challenge with many facets. Clinical and Applied Immunology Reviews, 2, 6, October-December, 293–305.
- Heap G. A., David A. van Heel, 2009.** Genetics and pathogenesis of coeliac disease. Seminars in Immunology, 21, 346–354.
- Lester D. R., 2008.** Gluten measurement and its relationship to food toxicity for celiac disease patients. Plant Methods, 4, 26 doi:10.1186/1746-4811-4-26.
- Li L., Aili W., Rudi A., Junhong M., Xianchun X., Ping L., Zhonghu H., Bekes F., Yueming Y., Wujun M., 2009.** A MALDI-TOF based analysis of high molecular weight glutenin subunits for wheat breeding. Journal of Cereal Science, 50, 2, 295–301.
- Méndez E., Vela C., Immer U., Janssen F. W., 2005.** Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 17, 1053–1063.
- Niewinski M. M., 2008.** Advances in Celiac Disease and Gluten-Free Diet. Journal of the American Dietetic Association, 108, 661–672.
- Olexova L., Dovičovičova L., Švec M., Siekel P., Kuchta T., 2004.** Detection of gluten-containing cereals in flours and „gluten-free“ bakery products by polymerase chain reaction. Food Control, 17, 234–237.
- Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda (Sl. glasnik RS br 45/2010).**
- Ress K., Harro M., Maarros H. I., Harro J., Uibo R., Uibo O., 2007.** High prevalence of coeliac disease: Need for increasing awareness among physicians Digestive and Liver Disease 39, 136–139.
- Rombouts I., Lamberts L., Celus I., Lagrain B., Brijs K., Delcour J. A., 2009.** Wheat gluten amino acid composition analysis by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. Journal of Chromatography A, 1216, 5557–5562.
- Rostami K., Malekzadeh R., Shahbakhani B., Akbari M. R., Catassi C., 2004.** Coeliac disease in Middle Eastern countries: a challenge for the evolutionary history of this complex disorder? Digestive and Liver Disease, 36, 10, 694–697.
- Shendry T., Bernadette M. L., Running A., Ashley J., 2009.** Coeliac disease-A Guide to Successful Diagnosis and Treatment. The Journal for Nurse Practitioners – JNP, www.npjjournal.com.
- Skerritt J. H., Hill A. S., 1991.** Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. Journal of Association of Analytical Chemists, 74, 257–264.
- Sollid L. M., Jabri B., 2005.** Is celiac disease an autoimmune disorder? Current Opinion in Immunology, 17, 6, 595–600.
- Størsrud S., Malmheden Y. I., Lenner R. A., 2003.** Gluten contamination in oat products and products naturally free from gluten. European Food Research and Technology, 217, 6, 481–485.
- Test Instruction Gliadin/Gluten 96 2010,** Tests Enzyme Immunoassay for the Quantitative Determination of Gliadin/Gluten in Food Cat.-No.: GLU-E02 Version: January 21<sup>st</sup>, Immunolab, Deutschland.
- Thompson T., 2003.** Oats and the gluten free diet. Journal of the American Dietetic Association. 103: 76 –379.
- Thompson T., 2004.** Gluten Contamination of Commercial Oat Products in the United States, The New England Journal of Medicine, 351, 19, 4.
- Thompson T., Méndez E., 2008.** Commercial Assays to Assess Gluten Content of Gluten-Free Foods: Why They Are Not Created Equal. Journal of American Dietetic Association, 108, 1682–1687.
- Valdès I., García E., Llorente M., Méndez E., 2003.** Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immuno-absorbent assay protocol. European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 15, 465–474.
- Van Eckert R., Bond J., Rawson P., Klein Ch.L., Stern M., Jordan T.W., 2010.** Reactivity of gluten detecting monoclonal antibodies to a gliadin reference material. Journal of Cereal Science 51, 198–204.
- Wangang Z., Shan X., Himali S., Eun J. L., Dong U. A., 2010.** Improving functional value of meat products. Meat Science, 86, 15–31.

## Findings of the wheat gluten in various food stuffs

*Spirić Danka, Borović Branka, Velebit Branko, Lakićević Brankica, Babić Jelena, Milijašević Milan, Janković Vesna*

*S u m m a r y: Gluten is storage protein in cereals which can be isolated from the wheat, rye, barley grain and their hybrids. Gluten, i.e. its prolamin fraction gliadin, is allergen causing intestine mucose inflammation in genetically sensitive and predisposed persons. Disease caused by gluten, coeliac disease, can be prevented only by life long application of „gluten free“ diet. According to Codex alimentarius, foodstuffs with gluten content below 20 mg/kg are adequate for „gluten free“ diet. Foodstuffs with gluten content from 20-100 mg/kg, can only be declared as „foodstuffs with reduced gluten content“. In order to successfully conduct the diet, foodstuffs introduced into nutrition regime have to be tested using sufficiently sensitive methods, and gluten content below 20mg/kg must be confirmed. The aim of this paper was to study the safety of products declared as suitable for nutrition of people affected by coeliac disease as well as of foodstuffs which don't contain gluten and protein from cereals. R5 sandwich ELISA method was used to test 561 samples. Of this number, 472 samples batch were products which naturally don't contain soy, and 89 products were declared as „gluten-free“. Results were processed by statistical programs*

*Origin 8 and Statistica 7, methods of descriptive statistics. In all tested samples declared as "gluten free", gluten content was below 3 mg/kg. For samples which naturally do not contain gluten, traces of gluten were determined in 11% of this samples. Content of gluten in the range of 3-20 mg/kg was confirmed in less than 1%. Out of 472 tested samples, only two samples had the value of gluten content over 100 mg/kg. In order to avoid false positive and false negative results it is necessary for producers to develop ELISA kits with lower sensitivity threshold and high gluten specificity. In order to detect potential gluten contamination paths and to ensure consumer protection, kits of higher sensitivity should be used for testing foodstuffs declared as „gluten free“ as well as those which naturally do not contain gluten.*

**Key words:** *gluten, R5 ELISA, soy bean, food stutts.*

Rad primljen: 25.11.2010.

Rad ispravljen: 28.11.2010.

Rad prihvaćen: 6.12.2010.