

HELSINGIN YLIOPISTO

Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos

EKT-sarja 1507

ASPERGILLUS NIGER -PROLIINIENDOPEPTIDAASI  
PROLAMIINIEN ELIMINOINNISSA

Sanna Luoto

Helsinki 2011

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos — Institution — Department Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä — Författare — Author Sanna Luoto			
Työn nimi — Arbetets titel — Title <i>Aspergillus niger</i> -proliiniendopeptidaasi prolamiinien eliminoinnissa			
Oppiaine — Läroämne — Subject Elintarviketeknologia (viljateknologia)			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterintutkielma		Aika — Datum — Month and year Toukokuu 2011	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 81
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Tutkielman kirjallisuusosassa perehdyttiin vehnän, rukiin ja ohran, eli Triticeae-prolamiinien erityisasemaan keliakianäkökulmasta tarkasteltuna ja prolamiinien hydrolyysiin proliinispesifeillä entsyymeillä. Lisäksi tarkasteltiin prolamiinien immunologisia määrittämenetelmiä.</p> <p>Keliakiassa haitalliset gluteenipeptidit sisältävät runsaasti proliinia ja ovat hankalia pilkkoa muilla kuin proliinispesifeillä peptidaaseilla. Suurin osa immunologisen reaktion aiheuttavista gluteenilähtöisistä peptideistä voidaan pilkkoa idätetyn viljan endogeenisillä entsyymeillä happamissa olosuhteissa, mutta jäljellejäävä prolamiinipitoisuus ylittää edelleen gluteenittomille tuotteille sallitun rajan. Kokeellisen työn tavoitteena oli eliminoida happamalla mallasinkubaatiolla valmistettujen vehnä-, ohra- ja ruismallasautolysaattien sisältämä jäännösprolamiini <i>Aspergillus niger</i> -homeen tuottamalla proliinispesifillä endopeptidaasilla (AN-PEP) siten, että hydrolysaattia voitaisiin käyttää gluteenittomissa leivontasovelluksissa. Proteiinien hydrolyysiä tarkkailtiin kokoeksklusiokromatografialla (SEC), vapaan aminotyypen (FAN) muodostumisena ja SDS-PAGE-elektroforeesilla. Jäännösprolamiinien pilkkoutumista seurattiin immunologisella R5-ELISA-menetelmällä.</p> <p>AN-PEP-inkubaatiolla saatiin aikaan voimakasta prolamiinien pilkkoutumista; mallasautolysaattien jäännösprolamiinista pilkkoutui yli 96 %. SEC- ja FAN-analyysien perusteella inkubaatioaikaa kannatti jatkaa yli 4 h, jolloin polypeptidit pilkkoutuivat edelleen pienemmiksi hydrolyysituotteiksi. Vehnä- ja ruismallashydrolysaattien prolamiinipitoisuuden todettiin laskevan 22 h inkubaation aikana alle tason 100 mg/kg R5-ELISA-menetelmällä määritettynä. Matalimmat prolamiinipitoisuudet saavutettiin AN-PEP-pitoisuudella 35 µl / g mallasautolysaattia.</p> <p>Codex Alimentarius -komission säädöksen mukaan keliakiaruokavalioon soveltuvat ns. erittäin vähägluteeniset tuotteet saavat sisältää gluteenia enintään 100 mg/kg. Erityisesti AN-PEP-käsiteltyä ruismallasraaka-ainetta voitaisiin mahdollisesti käyttää tuomaan rukiista aromia gluteenittomiin leipiin. Ennen kuin mallashydrolysaatit ovat valmiita kaupallisiin sovelluksiin, on tarkasteltava niiden todellisia mahdollisuuksia parantaa elintarvikkeiden makua ja aromia sekä todettava uuden teknologian turvallisuus keliakikoille.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Proliiniendopeptidaasi, PEP, proteolyysi, prolamiinit, mallas, gluteeniton			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto, Helda			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information			

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Department of Food and Environmental Sciences	
Tekijä — Författare — Author Sanna Luoto			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Proline endopeptidase from <i>Aspergillus niger</i> in the prolamin elimination			
Oppiaine — Läroämne — Subject Food Technology (Cereal Technology)			
Työn laji — Arbetets art — Level Master's Thesis		Aika — Datum — Month and year May 2011	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 81
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>The literature review dealt with celiac-toxic Triticeae prolamins and their enzymatic degradation. Also the immunochemical methods for prolamin analysis were introduced.</p> <p>The gluten-derived immunogenic peptides are proline-rich and thereby remarkably resistant to proteolytic degradation. Most of the triggering prolamins can, however, be degraded by combining endogenous cereal enzyme activity with acidic incubation. Despite of this residual prolamins still exist and their concentration exceeds the threshold considered to be safe for gluten intolerants. The objective of the experimental work was to further hydrolyse the residual prolamins present in malt autolysates of wheat, barley and rye, with a food grade proline endopeptidase from <i>Aspergillus niger</i> (AN-PEP). Size-exclusion chromatography (SEC), free amino nitrogen (FAN) and SDS-PAGE analysis determined the extent of protein hydrolysis. Actual prolamin degradation was observed with immunological methods.</p> <p>Hydrolysis of residual prolamins was extensive in all malt systems – more than 96% of the prolamins were hydrolysed. The SEC and FAN data revealed that continuation of the hydrolysis overnight converted the polypeptides into smaller hydrolysis products. According to enzyme-linked immunosorbent assay analyses, 22 h incubation decreased the prolamin contents of wheat and rye malt hydrolysates below the level of 100 mg/kg. This level was achieved with AN-PEP concentration of 35 µL/g in relation to freeze-dried autolysate.</p> <p>According to the Codex Alimentarius, food products containing gluten up to 100 mg/kg can be labelled 'very low gluten' and thus included in coeliac diet. AN-PEP treated rye malt ingredient could especially be a promising low-gluten ingredient to enhance the flavour of often poor-quality gluten-free bread. Before commercial applications can be devised the potential as a flavouring agent as well as the clinical safety of the product must be evaluated.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Proline endopeptidase, PEP, proteolysis, prolamin, malt, gluten-free			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited The Digital Repository of University of Helsinki, Helda			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information			

## ESIPUHE

Tämä maisterintutkielma tehtiin Helsingin yliopiston elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksen viljaryhmässä. Tutkimusaihe saatiin työn pääohjaajan ETT Jussi Loposen ja hollantilaisen elintarvikeainekesän valmistavan DSM Food Specialtiesin yhteistyönä. Työn valvojana toimi professori Hannu Salovaara, jonka lisäksi ohjausryhmään kuuluivat yliopistonlehtori Tuula Sontag-Strohm ja FM Päivi Kanerva. Tutkimus liittyi Suomen Akatemian ELVIRA-tutkimusohjelmaan (Ravitsemus, elintarvikkeet ja terveys 2007–2010) kuuluvaan MANGLIN-hankkeeseen ”Gluteeni intoleranssi: Uusia näkymiä esiintyvyyteen, immunogenetiikkaan, elintarvikkeiden prosessointiin ja turvallisuuteen”.

Kiitän lämpimästi kaikkia heitä, joilta sain apua työni edetessä. Suurin kiitos kuuluu työni ohjaajalle Jussi Loposelle kannustavista neuvoista ja opastuksesta koko projektin ajan. Lisäksi kiitän koko ohjausryhmää arvokkaista näkemyksistä ja tutkimusteknikko Outi Brinckii korvaamattomasta avusta laboratorioanalyysiin liittyen. Kiitos myös lähipiiril-  
leni ja opiskelutovereilleni tuesta ja kannustuksesta.

Helsingissä 13.5.2011

Sanna Luoto

# SISÄLLYSLUETTELO

## TIIVISTELMÄ

## ABSTRACT

## ESIPUHE

## TÄRKEIMMÄT TUTKIMUKSESSA KÄYTETYT LYHENTEET

1	JOHDANTO	8
2	KIRJALLISUUSKATSAUS	10
2.1	Prolamiinit keliakiassa	10
2.1.1	Triticeae-viljojen prolamiinit	10
	Vehnän gliadiit ja gluteniinit	
	Ohran hordeiinit	
	Rukiin sekaliinit	
2.1.2	Keliakia ja gluteenipeptidit	15
	Keliakian patogeneesi	
	Haitalliset peptidit	
2.2	Prolamiinien entsyymattinen hydrolyysi	20
2.2.1	Peptidaasit ja niiden vaikutus hydrolysaatin ominaisuuksiin	20
2.2.2	Prolamiinien keliakiatoksisuuden eliminointi entsyymien avulla	22
	Mallastus	
	Hapantaikinafermentaatio	
	Keliakian peptidaasilääkehoito	
2.2.3	AN-PEP ja muita proliinispesifejä entsyymejä	27
	<i>Aspergillus niger</i> -proliiniendopeptidaasi	
	<i>Flavobacterium meningosepticum</i> -proliiniendopeptidaasi	
	<i>Sphingomonas capsulata</i> -proliiniendopeptidaasi	
	<i>Myxococcus xanthus</i> -proliiniendopeptidaasi	
	Aspergillopepsiini	
	Dipeptidyylipeptidaasi IV	
2.3	Prolamiinien immunologiset määrittämenetelmät	32
2.3.1	Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys, ELISA	33
	Prolamiinispesifiset vasta-aineet	
	Standardit	
	Kompetitiivinen ja sandwich-ELISA	
	Kehittämistarpeita	
2.3.2	Muita immunologisia menetelmiä	38
	Immunoblottaus	
	Immunopresipitaatio	

3	KOKEELLINEN TUTKIMUS	40
3.1	Koeasetelma ja tavoite	40
3.2	Materiaalit ja menetelmät	40
3.2.1	Mallasautolysaatit ja AN-PEP-aktiivisuuden säilyminen	41
	Mallasautolysaattien valmistus ja ominaisuudet	
	Esikokeet ja niiden tulokset	
3.2.2	Mallasautolysaattien jatkohydrolyysi AN-PEP-entsyymillä	44
3.2.3	Hydrolysaatin ominaisuuksien määrittäminen	45
	Proteiinifraktioiden koon määrittäminen kokoekskluusio-	
	kromatografialla	
	Vapaan aminotypen pitoisuuden määrittäminen	
	Proteiinien elektroforeettinen erottaminen	
3.2.4	Hydrolysaatin prolamiinien määrittäminen	49
	Prolamiinien tunnistaminen immunoblottausmenetelmällä	
	Prolamiinipitoisuuden määrittäminen R5-ELISA-menetelmällä	
3.2.5	Tulosten tilastollinen analysointi	50
3.3	Tulokset	51
3.3.1	Proteiinien pilkkoutuminen hydrolyysin aikana	51
	Mallashydrolysaattien proteiinifraktioiden koko (SEC)	
	Vapaan aminotypen pitoisuus (FAN)	
	Proteiinikoostumus (SDS-PAGE)	
3.3.2	Prolamiinit hydrolysaatissa	56
	Hydrolysaatin sisältämät prolamiinit (Western blot)	
	Prolamiinipitoisuus (R5-ELISA)	
3.4	Pohdinta	60
3.4.1	Prolamiinien eliminaatio mallashydrolysaateissa	60
3.4.2	Hydrolyysin eteneminen	62
3.4.3	Prosessin tarkastelua	63
3.4.4	Mallashydrolysaatin käyttökohteita	64
3.4.5	Turvallisuusnäkökohtia	66
4	PÄÄTELMÄT	67
	LÄHDELUETTELO	68
	LIITTEET	
	Liite 1. Aminohappojen lyhenteet	77
	Liite 2. Tutkimuksessa käytetyt reagenssit ja laitteet	78

## TÄRKEIMMÄT TUTKIMUKSESSA KÄYTETYT LYHENTEET

AN-PEP	<i>Aspergillus niger</i> -proliiniendopeptidaasi
FM-PEP	<i>Flavobacterium meningosepticum</i> -proliiniendopeptidaasi
SC-PEP	<i>Sphingomonas capsulata</i> -proliiniendopeptidaasi
MX-PEP	<i>Myxococcus xanthus</i> -proliiniendopeptidaasi
POP	proliinioligopeptidaasi
HMW	suurimolekyylipainoinen (engl. high molecular weight)
LMW	pienimolekyylipainoinen (engl. low molecular weight)
GMP	gluteniinimakropolymeeri
N	amino-
C	karboksyyli-
SDS	natriumlauryylisulfaatti (engl. sodium dodecyl sulphate)
FAN	vapaa aminotyyppi (engl. free amino nitrogen)
SDS-PAGE	natriumlauryylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi
ELISA	entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
IP	immunopresipitaatio
SEC	kokoekskluusiokromatografia (engl. size-exclusion chromatography)
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia
HLA-DQ2/8	keliakikoilla esiintyvä kudostyyppi (engl. human leucocyte antigen)
CD4+-T	immunopuolustukseen osallistuvien imusolujen tyyppi
tTG	kudostransglutaminaasientsyymi (engl. tissue transglutaminase)
EC	engl. Enzyme Commission

## 1 JOHDANTO

Vehnä, ruis ja ohra sisältävät gluteeniyliherkille henkilöille haitallisia prolamiini-varastoproteiineja. Prolamiinien korkeasta glutamiini- ja proliinipitoisuudesta johtuen ne eivät pilkkoudu ihmisen ruoansulatusentsyymeillä täysin, vaan niistä vapautuu runsaasti glutamiini- ja proliinipitoisia polypeptidejä (Hausch ym. 2002; Shan ym. 2002). Kyseiset peptidit aiheuttavat geneettisesti alttiille henkilöille T-soluvälitteisen immuunivasteen ja keliakiaoireet (Sollid 2002). Tällä hetkellä keliakian ainoa hoito on ns. keliakiaruokavalio, josta haitalliset prolamiinit on poistettu täysin.

Prolamiinien haitallisuus keliakikoille voidaan kuitenkin eliminoida entsyymaattisesti (Marti ym. 2004; Piper ym. 2004; Shan ym. 2004; Gass ym. 2007). Tehokkain biokemiallinen menetelmä prolamiinien eliminoimiseksi on proliinispesifien entsyymien käyttö. Toksiset aminohapposekvenssit voidaan pilkkoa niin pieniksi, etteivät ne enää aiheuta immunologista reaktiota. *Aspergillus niger* -homeesta eristetty proliiniendopeptidaasi (AN-PEP) on osoittautunut erittäin tehokkaaksi pilkkomaan keliakiassa haitallisia gluteenilähtöisiä peptidejä happamissa olosuhteissa (Edens ym. 2005; Lopez ja Edens 2005; Stepniak ym. 2006; Sebela ym. 2009). AN-PEP:in soveltuvuutta keliakian ruokavaliohoion tueksi on tutkittu lähinnä ns. peptidaasipillerinä, mutta AN-PEP:ia voitaisiin soveltaa myös gluteenittomien elintarvikkeiden prosessoinnissa.

Viljanjyvän itäessä endogeeninen entsyymituotanto hajottaa jyvän endospermin varastoproteiinit uuden kasvin rakennusaineiksi. Tätä luontaista entsyymiaktiivisuutta voidaan hyödyntää keliakikoille haitallisten prolamiinien eliminointiin. Itävän jyvän proteolyttinen aktiivisuus on tehokkaimmillaan happamissa olosuhteissa (Mikola 1986; Dunaevsky ym. 1989). Loponen ym. (2009) osoittivat, että yhdistämällä mallastus ja hapantaikinafermentaatio saatiin aikaan voimakasta proteiinien pilkkoutumista; yli 99,5 % ruismaltaan prolamiineista pilkkoutui. Uttuneet pilkkoutumistuotteet olivat pieniä eikä niitä enää tunnistettu prolamiinipitoisuuden määrittämiseen käytetyllä ns. kompetitiivisella ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) -menetelmällä. Pilkkoutuneiden prolamiinien immunoreaktiivisuus oli siis vähentynyt. Koko massan jäännösprolamiinin pitoisuus 0,5 % vastasi kuitenkin vielä useita satoja mg gluteenia / kg:ssa tuotetta. Jotta saatu tuote olisi kaupallisesti kiinnostava, olisi sen gluteenitason oltava alle 100 mg/kg ja mielellään alle 20 mg/kg (EC 2009). Monet gluteenittomien tuotteiden valmistajat edellyttävät jo raaka-aineiltaan alle 20 mg/kg:n gluteenipitoisuutta, vaikka esimerkiksi



leivonnassa yksittäinen ainesosa sekoittuu muihin gluteenittomiin raaka-aineisiin, jolloin sen mahdollisesti sisältämä hyvin matala prolamiinipitoisuus laimenee edelleen.

Viljan luontaista entsyymiaktiivisuutta hyödynnetään useissa elintarvikeprosesseissa, esimerkiksi hapanleivän ja oluen valmistuksessa. Panimoprosessissa mäsäyksessä maltaan proteolyttinen aktiivisuus pilkkoo proteiineja, jonka jälkeen proteiinit ja peptidit saostetaan ja suodatetaan pois. Olut on siis esimerkki tuotteesta, jossa gluteenipitoisista ainesosista voidaan valmistaa gluteeniton tuote. Mallashydrolysaatteja käytetään makua tuovana ainesosana myös keliakiaruokavalioon soveltuvissa elintarvikkeissa.

Viljaprolamiinien pilkkoutumistuotteet, eli pienet peptidit ja etenkin vapaat aminohapot, voivat toimia flavoriyhdisteiden esiasteina myös leivonnassa (Hansen ja Schieberle 2005). Mallastettua ja hapatettua ruista, joka sisältää paljon vapaita aminohappoja, voitaisiin mahdollisesti käyttää tuomaan gluteenittomiin leipiin happamalle ruisleivälle ominaista aromia. Suomalaiset keliakikot kaipaavat hapanta ruisleipää ja erityisesti sen makua, joten tavoite on kaupallisesti merkityksellinen. Keliakian esiintyvyys on kasvussa (Lohi ym. 2007), joten myös gluteenittomien tuotteiden markkina kasvaa. Laadukkaiden tuotteiden kehitykselle on siis lisääntyvä tarve. Tällaisen teknologian avulla gluteenittomiin leipiin voitaisiin mahdollisesti sisällyttää myös täysjyvärukiin ravitsemuksellisesti edullisia komponentteja: ravintokuitua, kivennäis- ja hivenaineita, vitamiineja ja muita bioaktiivisia yhdisteitä.

Tämän maisterintutkielman kokeellisen osan tavoitteena oli selvittää voidaanko happamis-olosuhteissa inkuboitujen maltojen jäännöspolamiini eliminoida AN-PEP-entsyymivalmisteella. DSM Food Specialties (Delft, Alankomaat) tarjosi kehittämäänsä AN-PEP-valmistetta kokeiltavaksi ensimmäistä kertaa elintarviketeknologisessa prosessissa elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksen viljaryhmässä. Gluteeniton mallashydrolysaatti voisi tulevaisuudessa tuoda esimerkiksi rukiin ominaisuuksia keliakiaruokavalioon soveltuviin tuotteisiin.

## 2 KIRJALLISUUSKATSAUS

### 2.1 Prolamiinit keliakiassa

Keliakiayhteydessä gluteenilla tarkoitetaan vehnän, rukiin, ohran ja niistä risteytettyjen viljalajien jyvien päävarastoproteiineja, prolamiineja. Näiden viljojen prolamiinit käsittävät 50–80 % jyvän kokonaisproteiinista. Geneettisesti alttiille henkilöille prolamiinien tietyt aminohapposekvenssit ovat erittäin haitallisia, sillä ne aiheuttavat ohutsuolen limakalvolla T-soluvälitteisen immuunireaktion (Green ja Jabri 2003). Gluteenialtistus ilmenee tulehduksellisena suolistosairautena, keliakiana. Jyvän proteiinit vaikuttavat kuitenkin viljamateriaalin toiminnallisiin ominaisuuksiin elintarvikeprosesseissa. Varsinkin vehnän proteiineilla on erityisasema; vehnää prosessoidaan ravinnoksi sen ainutlaatuisten gluteeniproteiinien muodostaman sitkon vuoksi. Ominaisuudesta on hyötyä erityisesti leipomotuotteissa, mutta vehnä jauhoa ja gluteenia käytetään yleisesti monenlaisissa jalostetuissa elintarvikkeissa.

#### 2.1.1 Triticeae-viljojen prolamiinit

Vehnä (*Triticum aestivum*), ruis (*Secale cereale*) ja ohra (*Hordeum vulgare*) kuuluvat heinäkasvien Triticeae-sukuryhmään. Vehnässä, ohrassa ja rukiissa pääasiallinen varastoproteiinifraktio ovat prolamiinit, jotka sisältävät yli puolet koko jyvän typestä. Triticeae-prolamiinien monomeerien molekyyli­massat ovat noin 30–90 kDa (Shewry ja Tatham 1999). Prolamiinit sisältävät toistuvia proliini- ja glutamiinipitoisia aminohapposekvenssejä, joiden järjestys vaikuttaa koko proteiinin liukoisuusominaisuuksiin. Prolamiinien aminohapoista glutamiinia on jopa 35–38 % ja proliinia 12–20 %, lähteestä riippuen (taulukko 1) (Wieser ym. 1988; Shewry 1995; Stern ym. 2001). Tästä juontuu myös nimitys *prolamiini*.

Tatham ym. (1990) luokittelivat Triticeae-prolamiinit rakenteen ja koostumuksen perusteella (taulukko 2). Ensinnäkin kaikki pelkistettyinä 70-% alkoholivesiliuokseen liukenevat viljaproteiinit luokitellaan prolamiineihin. Prolamiinit voidaan luokitella edelleen aminohappo- ja cDNA-sekvenssiensä mukaan kolmeen luokkaan: rikki­pitoisiin prolamiineihin, rikittömiin prolamiineihin ja suurimolekyyli­painoisiin eli HMW (engl. high molecular weight) -prolamiineihin.

**Taulukko 1.** Triticeae-viljojen prolamiinifraktioiden aminohappokoostumus pelkistimen kanssa uutetusta kokonaisprolamiinista ja prolamiinikomponenttien aminohappokoostumus (mukaillen: Shewry ja Miflin 1985; Shewry ja Tatham 1999).

Amino- happo <sup>(1)</sup>	Viljalaji (prolamiinifraktio) (mol-%)			Prolamiinikomponentti (aminohappojen lkm / proteiini)		
	Vehnä (gliadiini ja glute- niini)	Ohra (hordeiini)	Ruis (sekaliini)	HMW <sup>(2)</sup> -alayksikkö 1Dx5	Rikki- pitoinen γ-tyypin gliadiini	Rikitön ω-sekaliini
Asp	3,0	1,9	2,1	4	2	0
Asn				0	4	1
Thr	2,7	2,5	2,5	24	7	3
Ser	5,4	4,9	5,8	47	17	15
<b>Glu</b>	<b>32,6</b> <sup>(3)</sup>	<b>31,8</b> <sup>(3)</sup>	<b>35,8</b> <sup>(3)</sup>	<b>15</b>	<b>3</b>	<b>7</b>
<b>Gln</b>				<b>299</b>	<b>93</b>	<b>133</b>
<b>Pro</b>	<b>17,3</b>	<b>20,1</b>	<b>20,2</b>	<b>109</b>	<b>45</b>	<b>102</b>
<b>Gly</b>	5,6	3,2	4,2	<b>166</b>	8	3
Ala	3,7	3,0	2,7	25	7	1
Cys	1,9	2,9	2,5	5	8	0
Val	3,8	5,1	4,4	14	15	6
Met	1,2	0,6	1,1	2	6	0
Ile	3,7	4,1	3,0	4	14	16
Leu	7,1	7,4	5,7	36	17	12
Tyr	2,6	2,6	1,7	46	3	4
Phe	4,5	5,2	4,6	2	14	25
His	1,7	1,2	1,3	4	5	2
Lys	0,9	1,0	0,9	6	3	1
Arg	2,1	2,6	1,5	10	2	7
Trp				9	3	0

<sup>1)</sup> Aminohappojen lyhenteet on koottu liitteeseen 1.

<sup>2)</sup> HMW = suurimolekyylipainoinen (engl. high molecular weight)

<sup>3)</sup> sis. glutamiinin ja glutamiinihapon (Gln)

**Taulukko 2.** Vehnän, rukiin ja ohran prolamiinien luokittelu (mukaillen: Shewry ym. 1986; Tatham ym. 1990).

Prolamiini	Vehnä	Ruis	Ohra
Rikkiä sisältävä			
Monomeerinen	γ-gliadiini β-gliadiini α-gliadiini	γ-sekaliini	γ-hordeiini
Polymeerinen	LMW-gluteniinialayksikkö		B-hordeiini
Rikittömät	ω-gliadiini	ω-sekaliini	C-hordeiini
HMW	HMW-gluteniinialayksikkö	HMW-sekaliini	D-hordeiini

Rikkipitoisia prolamiineja on määrällisesti eniten, noin 70–80 % (Shewry ym. 1983). Niiden molekyyli­massat ovat noin 30–50 kDa, ja ne sisältävät kysteiiniä (noin 2–3 mol-%) ja metioniinia (noin 1 mol-%) sekä runsaasti glutamiinia ja proliinia. Kysteiiniaminohappojen välille voi syntyä proteiinin sisäisiä tai niiden välisiä disulfididisidoksia, joista jälkimmäisiä sisältävät prolamiinit muodostavat suuria polymeerejä. Näitä ovat vehnällä LMW- (engl. low molecular weight) ja HMW-alayksiköistä koostuvat gluteniinit, ohralla B- ja D-hordeiinit ja rukiilla HMW-sekaliinit.

Rikittömät prolamiinit ovat monomeereja, joiden molekyyli­massat ovat noin 30–80 kDa (Shewry ym. 1983). Niihin kuuluvat vehnän ω-gliadiinit, rukiin ω-sekaliinit ja ohran C-hordeiinit. Ohran prolamiineista 10–20 % (Kirkman ym. 1982) sekä noin 10 % rukiin ja vehnän prolamiineista kuuluu tähän ryhmään (Shewry ym. 1983). Shewryn ym. mukaan rikittömät prolamiinit sisältävät vain vähän tai eivät ollenkaan kysteiiniä ja metioniinia, ja voivat siksi muodostaa vain molekyyli­sisäisiä disulfididisidoksia. Rikittömät prolamiinit sisältävät runsaasti glutamiinia, proliinia (yhteensä n. 70 mol-%) ja fenyylialaniinia (7–9 %).

Vehnän gliadiitit ja gluteniinit. Vehnä sisältää 10–14 % proteiinia (Shewry ym. 1986). Vehnän pääasialliset varastoproteiinit ovat gliadiini ja gluteniini, jotka käsittävät 40–50 % ja 30–40 % vehnän kokonaisproteiinista. Gluteniinit ovat polymeerisiä molekyy­lejä, jotka koostuvat HMW- ja LMW-gluteniineista (taulukko 2). LMW-gluteniinialayksiköt muistuttavat aminohappokoostumukseltaan, molekyylikooltaan ja liukoisuudeltaan gliadiineja, mutta ne luokitellaan gluteniineiksi polymeroitumisensa vuoksi. Niillä on ilmeisen läheinen kehityshistoria, johon viittaavat lähekkäiset geenipaikat vehnän perimässä.

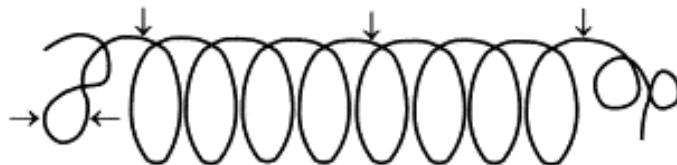
Gliadiinit ovat monomeerisia prolamiineja; ne sisältävät ainoastaan molekyyllinsisäisiä disulfididisidoksia. Gliadiinit koostuvat n. 250–300 aminohaposta ja niiden molekyyli­massat ovat 30–40 kDa (Wieser ym. 1994; Shewry ja Tatham 1997). Ne jaetaan aminohappokoostumuksensa perusteella kysteiniä sisältäviin  $\alpha$ -,  $\beta$ - (yhdessä 60 % gliadiineista) ja  $\gamma$ -gliadiineihin (30 %) sekä  $\omega$ -gliadiineihin (10 %), jotka eivät sisällä kysteiniä. Alfa-,  $\beta$ - ja  $\gamma$ -gliadiineilla on keskenään samantyyppinen primaarirakenne (Shewry ym. 1983).

Kun vehnäjauhosta pestään vedellä pois tärkkelys, jää jäljelle gluteeni. Leivonnassa gluteenilla tarkoitetaan vehnän erillisten, mutta toisiinsa liittyneiden prolamiinien (taulukko 2), eli gliadiinien ja gluteniinien, muodostamaa viskoelastista proteiiniverkostoa, sitkoa, johon vehnätaikinan ominaisuudet pääasiassa perustuvat. Vehnätaikinan reologia ja valmiin leivän tilavuus riippuvat siis pääasiassa sitkosta. Gluteniinialayksiköt muodostavat gluteniini­makropolymeerin (GMP), jonka molekyyli­massa voi olla jopa useita miljoonia (Skerritt 1999). Proteiinin aggregoituminen johtuu pääasiassa gluteniinialayksiköiden välisistä disulfididisidoksista. GMP ei liukene kokonaan mietoihin happoliuoksiin tai natrium­lauryylisulfaattiliuokseen (SDS), vaan vaatii liuetakseen disulfididisidosten purkamista pelkistävien yhdisteiden avulla. Vehnän gluteniineja voidaan pitää prolamiineina, jotka eivät kuitenkaan ole alkoholiliukoisia, koska ne esiintyvät molekyylinvälisten disulfididisidosten stabiloimina HMW-polymeereinä (Shewry ja Tatham 1999). Kun disulfididisidokset pelkistetään, myös gluteniinialayksiköt liukenevat alkoholin vesiliuoksiin.

Ohran hordeiinit. Ohran­jyvissä on proteiineja 8–13 % lajikkeesta riippuen (Pomeranz ja Shands 1974). Ohran pääasiallinen prolamiinifraktio on hordeiinit, joita on 35–55 % koko ohran­jyvän proteiinista (Shewry 1993). Korkean glutamiinipitoisuutensa lisäksi hordeiinit sisältävät runsaasti proliinia ja hydrofobisia aminohappoja, kuten leusiinia ja valiinia (Wang ym. 2010).

Hordeiinit jaetaan edelleen neljään luokkaan elektroforeettiseen liikkuvuuteen ja aminohappokoostumukseensa perustuen (taulukko 2). Näistä B-hordeiinella on amino (N)-terminaalissaan toistuvia proliini- ja glutamiinipitoisia alueita. Runsaasti rikkiä sisältävät B-hordeiinit ( $M_m = 30\text{--}50$  kDa) ja rikittömät C-hordeiinit ( $M_m = 55\text{--}80$  kDa) käsittävät 70–80 % ja 10–20 % ohran prolamiineista. D-hordeiinit ( $M_m = 80\text{--}90$  kDa) kattavat kokonaisprolamiinista alle 5 %. C-hordeiinit ja osa B-hordeiineista eivät sisällä rikkipitoista kysteiniä ja ovat siksi monomeerisia (Simpson 2001). Sen sijaan suurin osa B-hordeiineista sekä D-hordeiinit sisältävät molekyylien välisiä disulfididisidoksia ja ovat siten polymeroituneita (Celus ym. 2006). C-hordeiinin toistuvat proliinipitoiset oktameerit

(PQQPFPQQ) muodostavat ns.  $\beta$ -käännösheliksien, jota reunustavat, ja mahdollisesti myös stabiloivat, globulaariset alueet amino- ja karboksyyli-terminaaleissa (kuva 1). Korkeasta proliinipitoisuudesta ja kompaktista rakenteestaan johtuen C-hordeiini on hankala substraatti entsyymeille (Simpson 2001).



**Kuva 1.** C-hordeiinin mahdollinen sekundaarirakenne. Keskellä prolamiini- ja glutamiinipitoisten toistuvien oktameerien muodostamat  $\beta$ -käänteislaskoheliksit globulaaristen alueiden reunustamina. Nuolet osoittavat kysteiniendopeptidaasi EP-B:n (engl. barley endopeptidase) ensisijaisia pilkkomiskohtia. Pilkkoutuminen sallii heliksien avautua ja paljastaa sekundaarisia pilkkomiskohtia, joihin endopeptidaasit voivat pureutua (Simpson 2001).

Rukiin sekaliinit. Rukiin varastoproteiinit ovat pääasiassa alkoholiliukoisia prolamiineja, joita kutsutaan sekaliineiksi. Sekaliinit eivät muodosta sitkonkaltaista koheesia rakennetta. Elektroforeettiseen liikkuvuuteen ja rikkipitoisuuteen perustuen sekaliinit jaetaan runsaasti rikkiä sisältäviin  $\gamma$ -sekaliineihin ( $M_m = 40$  ja  $75$  kDa), rikittömiin  $\omega$ -sekaliineihin ( $M_m = 52$  kDa) ja HMW-sekaliineihin ( $M_m > 100$  kDa). Shewryn ja Bechtelin (2001) mukaan sekaliinit kattavat 24–40 % koko rukiinjyvän typpipitoisuudesta ja Gellrichin ym. (2003) mukaan 70–80 % jyvän kokonaisproteiinista, uutto-olosuhteista riippuen.

Gammasekaliinit muistuttavat aminohappokoostumukseltaan vehnän  $\gamma$ -gliadiineja. Molekyyli­massaltaan 40 kDa:n  $\gamma$ -sekaliineissa on vastaavia sekvenssejä kuin monomeerisilla vehnän  $\gamma$ -gliadiineilla. 75 kDa:n  $\gamma$ -sekaliineilla on aminohappoketjussaan pidempiä toistuvia alueita. Ne sisältävät myös yhden tai useamman kysteiniin, joka stabiloi proteiinin molekyyli­sisäisillä disulfididisidoksilla (Shewry ja Bechtel 2001).

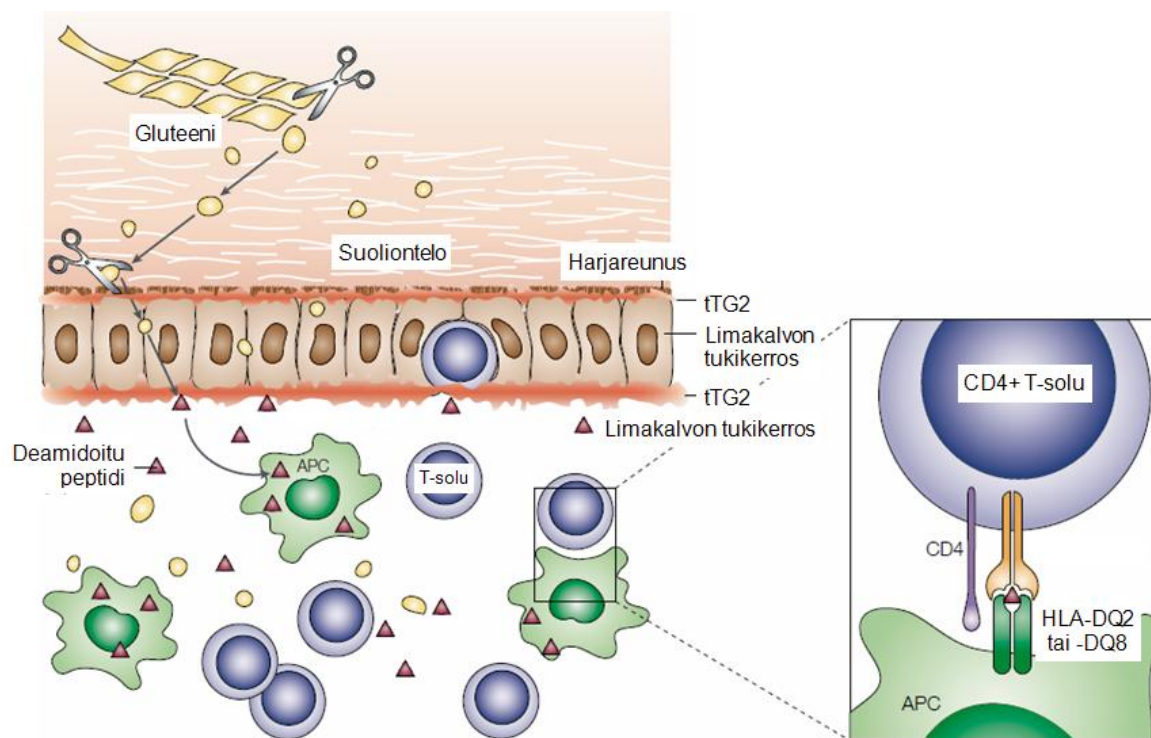
Monomeeristen  $\omega$ -sekaliinien aminohappokoostumus vastaa vehnän  $\omega$ -gliadiineja ja ohran C-hordeiineja. Ne sisältävät runsaasti glutamiinia, proliinia ja fenyylialaniinia, mutta eivät lainkaan rikkipitoista kysteiniä tai metioniinia (taulukko 1) (Kasarda ym. 1983). Elektroforeesi ja aminohapposekvensointi ovat osoittaneet, että HMW-sekaliinien ja vehnän HMW-gluteniinien molekyyli­massat ja aminohappokoostumukset vastaavat toisiaan ja molemmat sisältävät runsaasti glysiiniä (Shewry ja Bechtel 2001).

## 2.1.2 Keliakia ja gluteenipeptidit

Tällä hetkellä keliakian ainoa hoito on elinikäinen ns. keliakiaruokavalio, josta gluteeni on poistettu täysin. Keliakialiiton asiantuntijaneuvosto suosittelee gluteenittoman ruokavaliohoidon nimeksi keliakiaruokavaliota (Keliakialiitto ry 2009). Enää ei voida puhua pelkästään gluteenittomasta ruokavaliosta, sillä vuonna 2009 voimaan astuneen EU-lainsäädännön mukaan keliakikot voivat käyttää gluteenittomien tuotteiden rinnalla myös ns. erittäin vähägluteenisia elintarvikkeita (EC 2009).

Gluteenittomiin erityisruokavalioelintarvikkeisiin sovelletaan 1.1.2012 alkaen Codex Alimentarius -standardia ”elintarvikkeille, jotka on tarkoitettu erityisruokavaliokäyttöön henkilöille, jotka eivät siedä gluteenia” (engl. Codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten). Standardin uudistettu versio hyväksyttiin Codex Alimentarius -komission kokouksessa vuonna 2008 ja julkaistiin Codexin standardikokoelmassa. Standardin mukaan gluteeniton elintarvike saa sisältää enintään 20 mg gluteenia / kg tuotetta. Standardissa määritellään myös erittäin vähägluteeninen tuote, jolla tarkoitetaan prosessoituja elintarvikkeita, joiden gluteenipitoisuus on 20–100 mg/kg (CAC 2008).

Keliakian patogeneesi. Keliakian esiintyvyys kasvaa; suomalaisesta aikuisväestöstä keliakikkoja on jo 2 % (Lohi ym. 2007). Keliakian syntymekanismia ei täysin tunneta, mutta alttius sille on perinnöllistä (Wolters ja Wijmenga 2008), minkä lisäksi taudin puhkeamiseen vaikuttavat ympäristötekijät. Toistaiseksi tunnetaan varmasti vasta yksi keliakialle altistava geeni; länsimaissa kudostyyppi HLA-DQ2 löytyy 90–95 %:lta keliakikoista, ja lähes kaikilla loppuilla keliakikoilla on kudostyyppi HLA-DQ8 (Fasano 2005). HLA (engl. human leucocyte antigen) -molekyylit pystyvät sitoutumaan spesifisti ruoansulatuksessa gluteenista vapautuneisiin peptideihin ja esittelemään ne edelleen gluteenispesifeille CD4+-T-soluille ohutsuolen limakalvolla (kuva 2). T-solvasteen seurauksena erittyy tulehdusta edistäviä sytokiineja, jotka ovat solujen välisen viestinnän välittäjäaineita. Nykykäsityksen mukaan tiettyjen gluteenipeptidien glutamiinin on kuitenkin muunnuttava deamidaatiolla negatiivisesti varautuneeksi glutamiinihapoksi, ennen kuin ne voivat sitoutua HLA-DQ2/8-molekyyliin (Van De Wal ym. 1998). Deamidaation saa aikaan ohutsuolen kudostransglutaminaasientsyymi tTG2 (engl. tissue transglutaminase 2). tTG2 deamidoi mieluiten glutamiineja sekvenssissä Gln–X–Pro, joita on gluteenimolekyyleissä runsaasti.



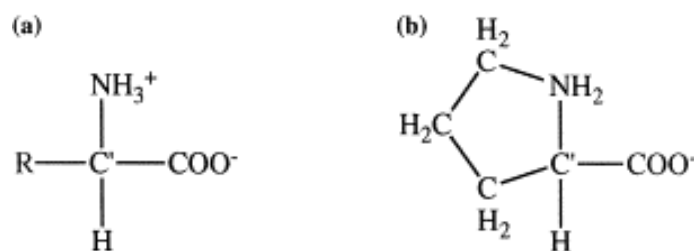
**Kuva 2.** Kaaviokuva ohutsuolen limakalvosta, jossa korostettuna keliakian kehittymiseen liittyvät tekijät. Ohutsuolen ja suolen harjareunuksen entsyymeille resistentit gluteenipolypeptidit säilyvät ruoansulatuksessa kokonaisina ja ne kuljetetaan suolen limakalvon pintakerroksen läpi. Kudostransglutaminaasi tTG2 deamidoi peptidit. Deamidaatio tapahtuu pääasiassa pintakerroksen alla mutta myös harjareunuksessa. Limakalvon tukikerroksen CD4+-T-solut tunnistavat deamidoituneet gluteenipeptidit pääasiassa HLA-DQ2/8-molekyylin esittelemänä antigeeneinä esittelevien solujen (engl. antigen presenting cell, APC) pinnalla (mukaillen: Sollid 2002).

Epitootit ovat proteiineissa esiintyviä alueita, jotka vasta-aine tunnistaa. Lähes kaikkien keliakikkojen T-solut tunnistavat  $\alpha$ -gliadiinin epitootit, kun taas  $\gamma$ -gliadiini- ja gluteniiniepitoopeja tunnistetaan harvemmin (Sjöström ym. 1998; Arentz-Hansen ym. 2000, 2002; Shan ym. 2002). Tästä syystä  $\alpha$ -gliadiinia pidetään keliakikoille kaikkein haitallisimpana prolamiinifraktiona. T-soluepitootit ovat jakautuneet epätasaisesti gliadiiniproteiinien sekvensseissä. Ne ovat kerääntyneet alueille, joissa on runsaasti proliini- ja glutamiiniaminohappoja (Arentz-Hansen ym. 2000). Lisäksi Lammers ym. (2008) havaitsivat, että gliadiini sitoutuu ohutsuolen epiteelisolujen ns. kemokiinireseptoreihin. Reseptorit tunnistavat peptidit ja saavat aikaan zonuliinientsyymien vapautumisen, mikä lisää suolen pintakerroksen läpäisevyyttä. Gliadiinipeptidien täydellinen pilkkominen ennen niiden sitoutumista ohutsuolen epiteelisoluihin todennäköisesti estäisi haitallisten immunologisten reaktioiden sarjan ohutsuolen limakalvolla.



Vehnän, ohran ja rukiin prolamiineja sisältävät tuotteet keliakikon ruokavaliassa aiheuttavat gluteenialtistuksen jatkumisen, joka johtaa ohutsuolen tulehdustilaan. Tulehduksen laajuus voi vaihdella epiteelinsisäisestä imusolujen runsaudesta keliakian klassiseen ilmenemiseen, eli vakaviin häiriöihin ohutsuolen limakalvon tukikerroksen läpäisevyydessä: pintanukan eli villuksen surkastumiseen (Marsh 1992) ja kuopakkeiden liikakasvuun, ns. kryptahyperplasiaan (Rubin ym. 1960). Tästä johtuen keliakian kliiniset oireet ja laboratoriolöydökset ovat moninaisia oireettomuudesta ravintoaineiden täydelliseen imeytymättömyyteen (Shan ym. 2002). Imeytymishäiriöt voivat johtaa erilaisiin sekundaarioireisiin ja mahdollisesti vakaviin liitännäissairauksiin. Keliakian moni-ilmeisiä sekundaarioireita voivat olla mm. ripuli, kasvuhäiriöt, väsymys, osteoporoosi, neurologiset häiriöt ja suoliston pahanlaatuiset kasvaimet. Lisäksi 10 %:lla keliakikoista keliakia ilmenee iho-oireina (dermatisis herpetiformis). Oireeton tai hoitamaton keliakia altistaa liitännäissairauksille (Robins ja Howdle 2004). Gluteeni voi aiheuttaa yliherkkysoireita myös ilman keliakialle tyypillistä ohutsuolivauriota, sillä oireiden on havaittu poistuvan gluteenittomalla ruokavaliolla (Kurppa 2010; Newnham 2011).

Haitalliset peptidit. Keliakiassa haitalliset peptidit sisältävät siis runsaasti proliinia. Proliini on rakenteeltaan ainutlaatuinen verrattuna muihin aminohappoihin. Se on ns. iminohappo, jolla on rakenteessaan aminoryhmän sijaan iminoryhmä. Iminoryhmässä typpi atomi on osa rengasmaista molekyyli-rakennetta; proliinissa sivuketju on sitoutunut sekä aminoryhmään, että  $\alpha$ -hiileen (kuva 3). Syklisyys rajoittaa proliinia sisältävien polypeptidien rakennetta, sillä  $\alpha$ -hiilen ja typen välinen sidos ei pääse kiertymään täysin vapaasti. Rakenteensa vuoksi proliinilla ei ole funktionaalisia ryhmiä eikä se voi osallistua vetysidoksiin. Syklisellä proliinilla onkin peptidiketjussa tärkeä bioaktiivinen tehtävä – se suojaa peptidejä proteolyttiseltä pilkkoutumiselta (Mentlein 1988). Proliini heikentää proteiinin pilkkoutuvuutta erityisesti, jos aminohappoketjun N-terminaalissa on X-Pro-peptidisidos tai C-terminaalissa Pro-X-sidos (Simpson 2001). Proliinin muodostamia peptidisidoksia on huomattavan hankala pilkkoa muilla kuin proliinispesifeillä entsyymeillä (Cunningham 1997; Shan ym. 2002).



**Kuva 3.** Aminohappojen ja proliinin rakenne. a) Yleinen aminohapon rakenne: karboksyyli-, amino- ja jokin kolmas (R-) ryhmä kiinnittyneenä kiraaliseen  $\alpha$ -hiileen (C $\alpha$ ). b) Proliini, jossa amino- ja  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ -ryhmä muodostavat syklisen rakenteen (Cunningham 1997).

Ruoansulatuksessa proteiinit pilkkoutuvat ensin mahalaukun pepsiniin ja sitten ohutsuolessa haiman peptidaasien, eli trypsiinin ja kymotrypsiinin, vaikutuksesta. Peptidiketjut pilkkoutuvat edelleen suolen pinnan harjareunuksen (engl. brush border membrane) eksopeptidaasien ansiosta aminohapoiksi sekä di- ja tripeptideiksi, jotka kuljetetaan suolen epiteelikerroksen läpi. Mm. Hauschin ym. (2002), Shanin ym. (2002) ja Piperin ym. (2004) mukaan vehnän, ohran ja rukiin prolamiinien korkea glutamiini- ja proliinipitoisuus vaikuttaa siten, että kyseiset proteiinit eivät pilkkoudu ihmisen ruoansulatusentsyymeillä täydellisesti. Ruoansulatuksen aikana vapautuu siis runsaasti keliakikoille haitallisia proliinia ja glutamiinia sisältäviä prolamiinilähtöisiä polypeptidejä (taulukko 3), jotka aiheuttavat T-soluvälitteisen immuunivasteen.

**Taulukko 3.** Tyypilliset keliakiassa immunogeeniset peptidit sisältävät runsaasti proliinia (P) ja glutamiinia (Q). Kyseisiä peptidejä esiintyy erityisesti prolamiinirakenteissa (mukaillen: Lopenen 2006; Gänzle ym. 2008). Aminohappojen lyhenteet on koottu liitteeseen 1.

Aminohapposekvenssi (pituus)	Alkuperä	Sijainti sekvenssissä
LQLQPFPPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (33-meeri)	$\alpha$ -2-gliadiini	56–88
FLQPQQPFPPQQPQQPYPQQPQQPFPPQ (26)	$\gamma$ -5-gliadiini	26–51
LQPQQPFPPQQPQQPYPQQPQ (20)	$\gamma$ -5-gliadiini	60–79
LGQQQPFPPQQPYPQPQPF (19)	$\alpha$ -gliadiini	31–49
QLQPFPPQLPYPQPQS (17)	$\alpha$ -gliadiini	57–73
PQPQLPYPQPQLPY (14)	$\alpha$ -2-gliadiini	62–75
LGQQQPFPPQQPY (13)	$\alpha$ -gliadiini	31–43
FSQPQQQFPQPQ (12)	$\gamma$ -5-gliadiini	102–113

Fysiologisissa olosuhteissa on osoitettu, että pepsiinillä ja haiman entsyymeillä hydrolysoitu gluteeni pilkkoutui tuhansiksi erikokoisiksi haitallisia sekvenssejä sisältäviksi peptideiksi seuraavasti: 40 % 11–20 aminohapon, 46 % 21–30 ja 15 % yli 30 aminohapon ketjuksi (Marti ym. 2004). T-solut tunnistavat useita erilaisia ja erikokoisia prolamiinipeptidejä. Pienin T-soluvasteen aikaansaava peptidi on kymmenestä aminohaposta koostuva ns. 10-meeri, jonka molekyyli massa on 1,2 kDa (Sjöström ym. 1998).

Erityisesti deamidoituna voimakkaan immunologisen vasteen aikaansaava prolamiinipeptidi ns. 33-meeri LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQLP (M<sub>m</sub> = 3 903 kDa) on huomattavan resistentti ihmisen ruoansulatuspeptidaaseille (Shan ym. 2002). Samalla se on erinomainen substraatti kudostransglutaminaasientsyymi tTG:lle. tTG deamidoi HLA-molekyyleihin sitoutuvat peptidit ja saavat aikaan T-solureaktion aiheuttaen siten keliakiain etenemisen (kuva 2) (Arentz-Hansen ym. 2000; Sollid 2002). Erityisesti 33-meeriä pidetään ns. superantigeenina, jota käytetään usein mallipeptidinä erilaisissa hydrolyysisovelluksissa, kun tavoitteena on pilkkoa keliakiassa haitalliset epitoopit. Se vapautuu ruoansulatuksessa  $\alpha$ -gliadiinista vatsalaukun ja haiman entsyymien vaikutuksesta, mutta ohutsuolen harjareunuksen entsyymit eivät pysty pilkkomaan sitä edelleen (Shan ym. 2002). 33-meerin kaltaiset peptidit ovat erittäin todennäköisesti keliakikkojen T-solujen tunnistamia tulehdusta aiheuttavia sekvenssejä, jotka sisältävät useita osittain päällekkäisiä peptidejä, ns. T-soluepitooppeja: PFPQPQLPY, PQPQLPYPQ (kolme kopiota) ja PYPQPQLPY (kaksi kopiota). Sen kanssa homologisia peptidejä on kaikissa keliakikoille haitallisissa viljoissa, mutta niitä ei esiinny ei-toksisissa, ns. luontaisesti gluteenittomissa viljoissa. 33-meerin lisäksi  $\alpha$ -gliadiinissa esiintyy esimerkiksi immunogeeninen sekvenssi, ns. 13-meeri PQPQLPYPQPQLP (Arentz-Hansen ym. 2000, 2002; Shan ym. 2002), joka on myös erittäin resistentti useimmille suolen harjareunuksen peptidaaseille. Ainoastaan harjareunuksen dipeptidyylikarboksipeptidaasi DCP 1 pystyy pilkkomaan kyseistä peptidiä (Hausch ym. 2002).

Nykykäsityksen mukaan prolamiinien sisältämät 33-meerin kaltaiset peptidit ovat siis haitallisia keliakikoille ja ne voivat sisältää useita tunnettuja T-soluepitooppeja. Vehnä gliadiinipeptidien on osoitettu olevan toksisia keliakikoille *in vivo* (Sturgess ym. 1994; Maiuri ym. 2003; Stenman ym. 2008). Vaikka rukiin sekaliinien ja ohran hordeiinien on havaittu sisältävän useita mahdollisesti haitallisen immuunivasteen aktivoivia peptidejä (Wieser 1995; Vader 2003; Bracken ym. 2006; Kilmartin ym. 2006), ovat ruis ja ohra olleet poissuljettuja gluteenittomasta ruokavaliosta käytännössä siksi, että niiden prolamiit

ovat aminohapporakenteeltaan samankaltaisia vehnän kanssa. Stenman ym. (2010) osoittivat, että ruoansulatusentsyymeillä käsitelty rukiin sekaliini aiheutti ns. caco-2-epiteelisolumallissa samanlaiset haitalliset reaktiot kuin vastaava vehnägliadiini. Tämä havainto tukee edelleen rukiin poissulkemista keliakiaruokavaliosta.

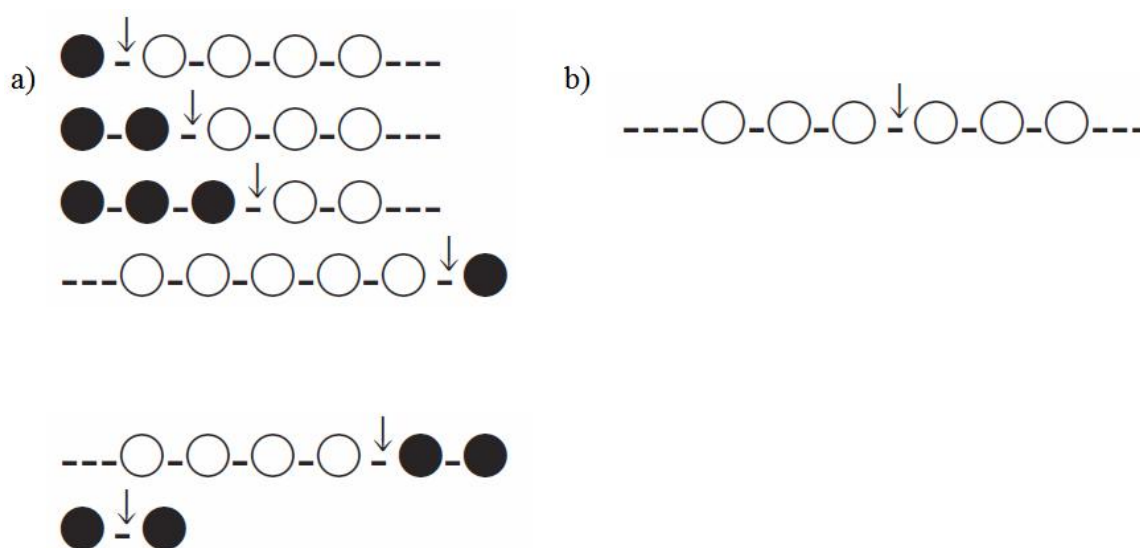
## **2.2 Prolamiinien entsyymaattinen hydrolyysi**

Entsyymit ovat proteiineja, jotka toimivat biokatalyytteinä. Katalyytti ei itse kulu reaktiossa, vaan ainoastaan nopeuttaa reaktiota. Entsyymejä on läsnä kaikkialla elollisessa luonnossa. Niitä voidaan eristää luontaisista lähteistä, kuten kasveista, eläimistä ja mikro-organismeista, tai tuottaa geeniteknologian avulla. Tällaisten ns. rekombinanttientsyymien etuna on massatuotanto ja siten entsyymien helppo saatavuus ja eristäminen. Vaikka entsyymiproteiinit koostuvat useista sadoista aminohapoista, vain muutama aminohappo sitoo substraattia tai katalysoi reaktiota. Spesifisyydet johtuvat entsyymien monimutkaisesta molekyyli-rakenteesta (Bone ym. 1989). Substraattispesifi entsyymi vaikuttaa vain tiettyntyyppisiin molekyyliin. Myös muut entsyymien ominaisuudet ovat uniikkeja. Ne ovat aktiivisia vain tietyllä lämpötila- ja pH-alueella, tietyssä substraattipitoisuudessa. Entsyymaattisessa reaktiossa tapahtuu kaksi samanaikaista tapahtumaa; substraatin pitoisuus laskee tuotteen pitoisuuden kasvaessa. Entsyymikatalysoidun reaktion nopeutta voidaan siis seurata mittaamalla joko substraatin häviämistä tai tuotteen muodostumista (Kilara ja Desai 2001).

### **2.2.1 Peptidaasit ja niiden vaikutus hydrolysaatin ominaisuuksiin**

Proteiinien pilkkominen entsyymaattisesti on hellävaraisempi menetelmä kuin happo- tai emäshydrolyysi, sillä entsyymaattinen hydrolyysi ei tuhoa aminohappoja. Entsyymien spesifisyyden ansiosta voidaan parhaimmillaan valita tietty entsyymi pilkkomaan tietty peptidisidos. Proteiinien entsyymaattiseen pilkkoutumiseen vaikuttavat entsyymien spesifisyyden lisäksi proteiinin denaturaatioaste ja liukoisuus, proteiinin ja entsyymien pitoisuudet, pH, ionivahvuus, lämpötila ja mahdollisten entsyymi-inhibiittoreiden läsnäolo. Natiivit proteiinit eivät yleensä pilkkoudu helposti entsyymaattisesti, koska hydrolyysille alttiit sidokset ovat usein entsyymien ulottumattomissa proteiinin kompaktin konformaation vuoksi (Kunst 2003). Proteiinin denaturaatio avaa aminohappoketjun monimutkaisen rakenteen, paljastaa peptidisidoksia ja mahdollistaa siten tehokkaan proteolyysin.

Viime vuosina kaikkiin proteolyyttisiin entsyymeihin viittaavat termit proteaasi ja proteinaasi ovat korvautuneet yleisillä *peptidaasi*. Peptidaasit jaetaan toimintatapansa mukaan *eksopeptidaaseihin*, jotka hydrolysoivat peptidisidoksia läheltä peptidiketjun terminaalipäätä, ja *endopeptidaaseihin*, jotka hydrolysoivat peptidisidoksia peptidiketjun keskeltä (kuva 4) (Kunst 2003; Tuukkanen ym. 2005). Endopeptidaasit katalysoivat siis proteiinin pilkkoutumista pienemmiksi peptideiksi ja eksopeptidaasit hydrolysoivat spesifisti peptidisidoksia tai pilkkovat peptidit aminohapoiksi. Eksopeptidaasit jaetaan edelleen ryhmiin spesifisyytensä suhteen, kuten amino-, karboksi-, dipeptidaasit, jne. Endopeptidaaseja ovat seriini-, kysteini-, aspartyyli- ja metallopeptidaasit, jotka eroavat toisistaan entsyymien aktiivisen keskuksen suhteen.



**Kuva 4.** Ekso- ja endopeptidaasien toimintatapa (mustat pallot kuvaavat aminohappoja peptidiketjun terminaalipäässä): a) Eksopeptidaasit katkaisevat peptidisidoksia, jotka sijaitsevat peptidiketjun terminaalipäässä tai ne hajottavat vain tietyn kokoisia peptidejä. b) Endopeptidaasit katkaisevat peptidisidoksia keskeltä peptidiketjua (mukaillen: Rao ym. 1998).

Proteolyysiä voidaan käyttää proteiinien funktionaalisten ominaisuuksien muokkaamiseen (Kunst 2003). Hydrolyysi voi esimerkiksi parantaa proteiinien emulgaattori- ja vaahtoutuvuusominaisuuksia jopa kymmenkertaisesti. Proteolyyttisiä entsyymejä voidaan käyttää myös laskemaan proteiiniliuosten viskositeettia ja siten helpottamaan niiden käsiteltävyyttä. Proteiinihydrolysaatteja käytetään mm. erityisruokavaliovalmisteissa, urheiluravinteissa ja äidinmaidonkorvikkeissa, sillä proteiinien hydrolyysi parantaa niiden imeytymistä ruoansulatuksessa.

Proteiinien hydrolyysissä muodostuu tietyille elintarvikkeille, kuten hapanleivälle tyypillisiä flavoriyhdisteiden esiasteita (Thiele ym. 2002; Hansen ja Schieberle 2005). Maun

happamuus on suhteessa pienten peptidien ja vapaiden aminohappojen määrään tuotteessa (Kunst 2003). Toisaalta proteolyysi voi tuottaa myös karvaanmakuisia peptidejä. Karvaus liittyy peptidien kokoon ja keskimääräiseen hydrofobisuuteen. Proteiineilla, jotka koostuvat hydrofobisia sivuketjuja sisältävistä aminohapoista, on suurempi taipumus tuottaa karvaita hydrolysaatteja kuin muilla proteiineilla (Ney 1971). Peptidit, joilla on hydrofobinen aminohappo joko N- tai C-terminaalissaan, ovat vähemmän karvaita kuin jos hydrofobinen aminohappo sijaitsisi peptidiketjun molemmissa päissä (Matoba ja Hata 1972). Lopputuotteen karvautta voidaan jossain määrin arvioida etukäteen kullekin aminohapolle kirjallisuudessa raportoitujen hydrofobisuusarvojen perusteella.

### **2.2.2 Prolamiinien keliakiatoksisuuden eliminointi entsyymien avulla**

Elintarviketeknologinen lähtökohta on, että elintarvikkeiden tulee olla maukkaita ja kuluttajille turvallisia. Turvallisuuskäsitteitä korostuu etenkin gluteenittomien erityisruokavalioituotteiden kohdalla. Keliakiaruokavalioon tarkoitettujen elintarvikkeiden kohdalla turvallisuus tarkoittaa sitä, että gluteenipitoisuudelle asetetut raja-arvot eivät ylitä. Gluteenittomia tuotteita on perinteisesti valmistettu ns. luontaisesti gluteenittomista viljoista, puhtaasta vehnätärkkelyksestä ja puhtaasta kaurasta. Viimeaikaiset tutkimukset osoittavat, että keliakikoille haitalliset epitoopit voidaan eliminoida myös gluteenia sisältävästä viljamateriaalista, ainakin osittain, hyödyntämällä entsyymaattista proteolyysiä elintarvikeprosesseissa (Gänzle ym. 2008; Lopenen ym. 2009) tai farmakologisesti ns. peptidaasipillerinä (Gass ja Khosla 2007; Stenman ym. 2010; Tye-Din ym. 2010).

Mallastus. Viljanjyvän itäminen saa aikaan jyvän endogeenisen eli sisäsyntyisen entsyymi-varannon tuotannon (Mikola 1983; Mikola 1986; Dunaevsky ym. 1989). Osa entsyymeistä on lepäävässä jyvässä valmiina, mutta valtaosa muodostuu itämisvaiheessa. Entsyymisynteesin ja entsyymien aktivoitumisen käynnistää kasveissa esiintyvä gibberelliini-hormoni. Itävään jyvään muodostuu runsaasti hydrolaaseja, kuten mm. tärkkelystä hajottava  $\alpha$ -amylaasia. Jyvässä muodostuu kuitenkin pääasiassa proteolyyttisiä entsyymejä, eli peptidaaseja, joiden luontainen tehtävä on hajottaa jyvän endospermin varastoproteiinit uuden kasvin rakennusaineiksi. Itävän jyvän proteolyttinen aktiivisuus on tehokkaimmillaan happamissa olosuhteissa. Itämisessä aleuronin erittämät orgaaniset hapot happamoittavat endospermin pH 5:een ja pilkkoutuminen lähtee käyntiin kysteiniinidopeptidaasin katalysoimana (Simpson 2001). Syntyneiden peptidien proteolyysiä jatkavat seriini-karboksipeptidaasit, joista suurin osa syntetisoidaan itämisen aikana alkioikilvessä ja aleuronissa.

Proliinin sijainti peptidiketjun ensimmäisenä tai viimeisenä aminohappona suojaa peptidiä tavanomaisten eksopeptidaasien vaikutukselta. Itämisessä prolamiinit ovat kuitenkin alttiita proteolyyttiselle pilkkoutumiselle, sillä proliinin muodostamia peptidisidoksia pilkkovat siihen erikoistuneet jyvän endogeeniset peptidaasit (Simpson 2001). Vapautuneet aminohapot käytetään uuden kasvin kasvuun, kuten idun ja alkeisjuuren muodostumiseen, ennen kuin kasvi on valmis ottamaan ravinteita ympäristöstään. Jyvän endogeeniset peptidaasit mahdollistavat gluteeniproteiinien ja keliakikoille haitallisten peptidien eliminaation itämisen yhteydessä. Yhdistämällä mallastus hapantaikinafermentaatioon on parhaimmillaan onnistuttu hydrolysoimaan jopa 95 % vehnän prolamiineista (Loponen ym. 2007) ja 99,5 % rukiin sekaliineista (Loponen ym. 2009). Myös Hartmann ym. (2006) osoittivat idätettyjen viljanjyvien peptidaasien pilkkovan gliadiinipeptidejä tehokkaasti.

Viljan endogeenisilla peptidaaseilla on useita etuja home- tai bakteerilähtöisiin peptidaaseihin verrattuna. Ne ovat tehokkaita ja spesifejä hydrolysoimaan nimenomaan proliini- ja glutamiinipitoisia varastoproteiineja. Niitä voidaan eristää luontaisesta elintarvikemateriaalista ja uutto on yksinkertaista. Viljan idättäminen on tuttu osa vakiintuneita elintarvikeprosesseja, kuten mallastus oluen ja väkevien alkoholijuomien valmistuksessa. Rekombinanttien entsyymien käyttö voi olla hankalammin markkinoitavissa kuluttajille ja niiden tuotantokustannukset voivat olla korkeita. Toisaalta kaupallisia proliiniendopeptidaaseja on jo elintarvikekäytössä mm. panimoteollisuudessa, kuten Brewers Clarex (DSM Food Specialties 2011). Panimoprosesseissa gluteenipitoisista ainesosista, eli ohramaltaasta, voidaan valmistaa gluteenitonta olutta. Markkinoilla onkin jo useita keliakikoille soveltuvia oluita. Maltaan proteolyttinen aktiivisuus pilkkoo keliakikoille haitallisia peptidejä mäsäyksen aikana, minkä jälkeen pilkkoutumistuotteet saostetaan ja suodatetaan pois. Ohran prolamiinit eivät ole liukoisia oluenvalmistuksessa, joten sen nestefaasi, eli vierre, on käytännössä gluteeniton. Endogeenisten entsyymien lisäksi mahdolliset lisätyt entsyymivalmisteet tehostavat osaltaan prolamiinien pilkkoutumista panimoprosesseissa.

Hapantaikinafermentaatio. Viljaprolamiinin haitallisuus keliakikoille voidaan, ainakin osittain, poistaa tehostamalla niiden hydrolyysiä hapantaikinafermentaatioissa eli raskituk- sessa (Cagno ym. 2002; De Angelis ym. 2006b; Stepniak ym. 2006; Loponen ym. 2007, 2009). Hapantaikinan mikrobifloora koostuu maitohappobakteereista ja hiivoista. Maitohappobakteerit tuottavat fermentoinnin aikana maito- ja etikkahappoa, minkä seurauksena hapantaikinan pH laskee. Happamat olosuhteet mahdollistavat viljan luontaisen entsyymiaktiivisuuden. Hapantaikinassa proteolyysin saavat aikaan pääasiassa viljan endogeeniset

entsyymit (Bleukx ym. 1998; Thiele ym. 2002; Loponen ym. 2004; Tuukkanen ym. 2005; Wieser ym. 2008). Biologisen hapantaikinan ja kemiallisesti hapattetun taikinan vertailu on osoittanut, että myös kemiallinen hapattaminen siirtää pH-arvoa kohti jyvän endogeenisten entsyymien optimialuetta. Biologinen fermentaatio, eli raskitus maitohappobakteereilla, ei siis näytä olevan välttämätöntä prolamiinien pilkkomiseksi, vaan pH voidaan laskea alasyhtä hyvin kemiallisesti. Maitohappobakteerit voivat kuitenkin edistää proteolyysiä ylläpitämällä pelkistäviä olosuhteita, jolloin gluteenipolymeerien disulfididisidokset purkautuvat ja gluteenin liukoisuus lisääntyy (Thiele ym. 2002; Gänzle ym. 2008).

Hapantaikinaa käytetään Suomessa etenkin perinteisen happaman ruisleivän valmistuksessa. Hapantaikinafermentaation aikaansaama proteolyysi parantaa tietyissä rajoissa leivän aistinvaraisia ja ravitsemuksellisia ominaisuuksia heikentämättä kuitenkaan leivän rakennetta tai tilavuutta (Thiele ym. 2002). Pienet peptidit ja vapaat aminohapot ovat myös flavorin esiasteita, jotka edelleen fermentaation ja paiston aikana muuntuvat aromiyhdisteiksi (Hansen ja Schieberle 2005). Matalan pH:n etuja on myös hapanleivän pitkä säilyvyys.

Vehnähapanleivonnassa laskevan pH:n aikaansaama gluteeniinien liukoisuuden lisääntyminen ja niiden osittainen hydrolyysi saavat aikaan gluteeniinimakropolymeerin (GMP) depolymerisoinnin (Thiele ym. 2004). Alayksiköiden pilkkoutumisen lisäksi GMP:n eheyteen vaikuttaa stabiloivien disulfididisidosten pelkistyminen. Molekyylinsisäisten ja -välisten disulfididisidosten katkeaminen lisää edelleen gluteenin liukoisuutta, jolloin se on alttiimpi proteolyyttisten entsyymien toiminnalle (Thiele ym. 2002). Täydellinen gluteenin hydrolyysi vehnähapantaikinassa vaatii siis proteolyyttisen aktiivisuuden lisäksi disulfididisidosten pelkistymisen ja gluteeniproteiinien liukoisuuden lisääntymisen. Viljaraaka-aineessa on endogeenista pelkistyspotentiaalia (Suske ym. 1979), joten ulkopuolisen pelkistimen lisääminen ei ole tarpeellista. Vehnän kysteiinipeptidaasien aikaansaama prolamiinien hydrolyysi on aktiivisinta pH:ssa 3,5–5,5 (Bottari ym. 1996; Capocchi ym. 2000), joten hapantaikinafermentaatio tai kemiallinen hapattaminen tarjoaa ihanteelliset olosuhteet kysteiinipeptidaasien toiminnalle. Loponen ym. (2004) ja Thiele ym. (2004) havaitsivat, että hapantaikinafermentaatioissa LMW-gluteeniinit hydrolysoituvat osittain ja HMW-gluteeniineista pilkkoutui suurin osa.

Suoraleivonnassa vehnätaikinan HMW-gluteeniini- ja GMP-pitoisuudet korreloivat leivän tilavuuden suhteen (Weegels ym. 1996). Polymeeriset HMW-gluteeniinit vaikuttavat taikinan vahvuuteen ja elastisuuteen, kun taas gliadiinit ja LMW-gluteeniinit saavat aikaan



viskoosit ominaisuudet. Yhdessä ne muodostavat vehnätaikinan sitkon, joka on vehnäleivonnan olennainen laatutekijä. Gluteenirakenteen pilkkoutuminen hapantaikinafermentaatioissa vaikuttaa taikinan viskoelastisiin ominaisuuksiin ja voi heikentää leivän rakennetta. Liiallinen gluteeniproteiinien pilkkoutuminen tuhoaa sitkon. Käytännössä sitkoton leivonta vastaa teknologisilta haasteiltaan gluteenitonta leivontaa. Taikinan ja valmiin leivän ominaisuudet riippuvat kuitenkin hapantaikinan osuudesta reseptissä ja siitä, miten mittavaa proteiinien pilkkoutuminen on.

Proteiinien huomattava entsyymattainen pilkkoutuminen on osoitettu myös ruishapantaikinasysteemeissä, jolloin erityisesti alkoholiliukoiset sekaliinit hydrolysoituivat. Proteolyttisen pilkkoutumisen saivat aikaan rukiin endogeeniset aspartyylipeptidaasit (Tuukkanen ym. 2005; De Angelis ym. 2006a). Tuukkanen ym. (2005) havaitsivat, että maitohappobakteerien tuottamien maito- ja etikkahapon aikaansaamat hapantaikinan miedon happamat olosuhteet (pH 3,5–4) lisäsivät rukiin sekaliinien liukoisuutta ja siten niiden proteolyttistä pilkkoutuvuutta. Perinteisessä ruisleivonnassa ei ole prolamiinien pilkkoutumisesta johtuvia vastaavia laatuongelmia kuin vehnäleivonnassa, sillä ruistaikinan vedensidonta- ja kaasunpidätyskyky riippuvat pääosin pentosaaneista (Gänzle ym. 2008). Voimakas entsyymiaktiivisuus ja hydrolyysi voivat kuitenkin vaikuttaa myös pentosaanien teknologisiin ominaisuuksiin.

Keliakian peptidaasilääkehoito. Keliakian uudeksi hoitomuodoksi ruokavaliohoidon rinnalle ehdotettu suun kautta annosteltavaa entsyymilisää (Shan ym. 2002, 2004; Gass ym. 2005; Sollid ja Khosla 2005; Siegel ym. 2006; Stepniak ym. 2006; Mitea ym. 2008a). Lääkehoito mahdollistaisi keliakikoille gluteenipitoisten elintarvikkeiden nauttimisen silloin tällöin, tai ainakin sillä voitaisiin vähentää gluteenittomien, mutta mahdollisesti kontaminoituneiden elintarvikkeiden aiheuttamia haittoja.

Gluteenin proteolyttistä eliminaatiota on tutkittu korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC), massaspektrometrillä, T-solu- ja antigluteenianalyysin sekä kliinisellä gluteenialtistuksella (Hausch ym. 2002; Marti ym. 2004; Shan ym. 2004, 2005; Piper ym. 2004; Gass ym. 2005; Pyle ym. 2005). Proliinispesifit endopeptidaasit (PEP) nopeuttavat gluteenin pilkkoutumista ruoansulatuskanavassa ja ne voisivat mahdollisesti tulevaisuudessa toimia osana keliakian hoitoa. Peptidaasilääkehoidon periaatteena on haitallisten gluteeniepitooppien täydellinen pilkkominen proliinispesifeillä entsyymellä jo vatsalaukussa, ennen niiden imeytymistä ohutsuolessa. Ateriaa ennen tai sen yhteydessä otetulla entsyymilisällä voitaisiin välttää haitallisten peptidien pääsy

ohutsuoleen asti silloin, kun aterian gluteenittomuudesta ei voida muuten täysin varmistua tai gluteenia sisältävää ruokaa on syöty vahingossa.

Osa bakteeriperäisistä PEP:eista on aktiivisia neutraalissa pH:ssa. Tästä johtuen ne voivat eliminoida gluteenipeptidejä ohutsuolen alkuosassa, jossa ravinnon proteiinien hydrolyysi ja imeytyminen suurimmaksi osaksi tapahtuu. Monet entsyymit on kuitenkin suojattava vatsalaukun voimakkaan happamilta olosuhteilta esimerkiksi kapseloimalla, jotta ne aktivoituvat vasta ruokasulan vapautuessa pohjukkaissuoleen (Gass ym. 2005). Lupaava hoitomalli on kahden entsyymin yhdistelmä, jossa rekombinantti glutamiinispesifi EP-B2 (engl. barley endopeptidase 2) hydrolysoisi gluteenia ensin vatsalaukussa, jonka jälkeen toinen PEP aktivoituisi pohjukkaissuolessa (Siegel ym. 2006; Tye-Din ym. 2010). Yhdistelmähoito voisi mahdollisesti poistaa gluteenin haitallisuuden olosuhteissa, joissa yksi entsyymi ei riitä täydelliseen gluteenin eliminaatioon. Entsyymiyhdistelmiä on testattu kliinisissä kokeissa, mutta tuloksia ei ole toistaiseksi julkaistu (Alvine Pharmaceuticals 2010).

Mitea ym. (2008a) tutkivat gluteenin pilkkoutumista ns. TIM-systeemissä *Aspergillus niger* -homeesta eristetyn proliiniendopeptidaasivalmisteen (AN-PEP) avulla. TIM (engl. TNO Gastrointestinal Model) on *in vitro* -systeemi, joka on kehitetty entsyymien ja lääkkeiden toiminnan kuvaamiseksi ihmisen ruoansulatuksessa (Minekus ym. 1995). Validointitutkimukset osoittavat, että TIM-malli jäljittelee tarkasti ihmisen vatsaontelossa ja ohutsuolessa tapahtuvia dynaamisia fysiologisia prosesseja ja ennustaa luotettavasti *in vivo* -dataa (Verwei ym. 2003; Blanquet ym. 2004; Souliman ym. 2006). Systeemi on täysin tietokoneistettu ja perustuu terveiden vapaaehtoisten aineistosta saatuihin parametreihin, kuten pH, ruumiinlämpö, sylki-, maha-, sappi- ja haimaeritys, sekä pienten molekyylien ja veden imeytyminen. Vaalean leivän ja hampurilaisaterian gluteenin pilkkoutuminen TIM-systeemin vatsalaukkua jäljittelevässä osassa nopeutui huomattavasti AN-PEP-pillerin avulla. AN-PEP pilkkoi T-solureaktion aikaansaavat epitoopit alle gluteenin toteamisrajan (Mitea ym. 2008a).

Lääkehoito parantaisi keliakikkojen elämänlaatua, mutta vehnägliadiinin monimutkainen molekyyli rakenne tekee PEP-pillerin käytännön sovelluksista haastavaa (Shan ym. 2004; Matysiak-Budnik ym. 2005). Gluteenipeptidien täydellinen pilkkoutuminen vaatinee useamman eri entsyymin yhdistelmän yhden spesifin peptidaasin sijaan (Siegel ym. 2006; Gass ym. 2007; Ehren ym. 2009). Käytännön sovellusten esteenä ovat toistaiseksi olleet myös peptidiketjujen hidas pilkkoutuminen, korkean entsyymipitoisuuden tarve ja siten

hoidon kalliit kustannukset (Sollid ja Khosla 2005; Matysiak-Budnik ym. 2005; Bethune ym. 2006; Siegel ym. 2006). Lisäksi useimmat lääketutkimukset on toteutettu gluteeni-peptideillä, rekombinanteilla gluteenimolekyyleillä tai natiivilla gluteenilla. Ravinnon gluteeni esiintyy elintarvikkeissa, joissa gluteeni on kuumakäsitelty ja se on sekoittuneena muihin, mitä erilaisimpiin, elintarvikkeen ainesosiin. Gluteeniverkosto, erityisesti sen disulfididisidokset ja gluteenin alttius proteolyysille, muuttuu leivontaprosessin aikana (Pasini ym. 2001). Prosessoiduissa elintarvikkeissa gluteeni voi olla hankalammin entsyymien saavutettavissa ja pilkkoutuu siksi heikommin. Lisäksi suurin osa proliinispesifien peptidaasien kinetikkaa käsittelevistä tutkimuksista on tehty varsin pienillä synteettisillä substraateilla, vaikka useimmat keliakiassa immunogeeniset gluteeni-peptidit ovat yli kymmenen aminohapon ketjuja.

### 2.2.3 AN-PEP ja muita proliinispesifejä entsyymejä

Aminohappo proliini vaikuttaa merkittävästi polypeptidiketjun rakenteeseen ja siten proliinia sisältävien biomolekyylien ominaisuuksiin (ks. *Haitalliset peptidit*). Proliinia sisältävän peptidiketjun rakenne rajoittaa ratkaisevasti peptididisidosten proteolyyttistä pilkkoutuvuutta (Cunningham 1997). Evoluution myötä on kuitenkin kehittynyt proliinispesifisejä entsyymejä, jotka tunnistavat proliinin ja saavat aikaan peptidiketjun hydrolyysin. Tällaisilla entsyymeillä on tärkeä biologinen rooli. Niiden toiminta voi inaktivoida tai muokata peptidejä ja proteiineja, mikä puolestaan voi vaikuttaa elintärkeisiin fysiologisiin prosesseihin, esimerkiksi aineenvaihduntareittien toimintaan. Vaikka proliiniendopeptidaaseja ekspressoituu mikro-organismien ja kasvien (myös viljanjyvien) lisäksi useissa nisäkkäiden kudoksissa, niitä ei kuitenkaan erityy vatsalaukusta, haimasta tai ohutsuolen harjareunuksen kudoksesta, eivätkä ne siten liity ravinnon proteiinien pilkkoutumiseen.

Vaikka useimmat seriiniendopeptidaasit (EC 3.4.21) eivät pysty pilkkomaan proliinin muodostamia peptididisidoksia, voidaan seriiniendopeptidaaseihin kuuluvilla proliinispesifeillä entsyymeillä (EC 3.4.21.26) pilkkoa esimerkiksi proliinipitoisia gluteeni-peptidejä. Tällaisia entsyymejä ovat proliiniendopeptidaasit (PEP) ja niihin kuuluvat proliinioligo-peptidaasit (POP), joilla voidaan hydrolysoida peptididisidoksia proliinin karboksyylipuolelta. Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että bakteeriperäiset PEPit pilkkovat proliinipitoisia gliadiini-peptidejä tehokkaasti, erityisesti yhdessä ohutsuolen harjareunuksen entsyymien kanssa (Hausch ym. 2002; Shan ym. 2002; Piper ym. 2004). Yksi tehokkaimmista

PEP:eista on *Aspergillus niger* -homeesta eristetty AN-PEP (Edens ym. 2005; Lopez ja Edens 2005; Stepniak ym. 2006; Sebela ym. 2009).

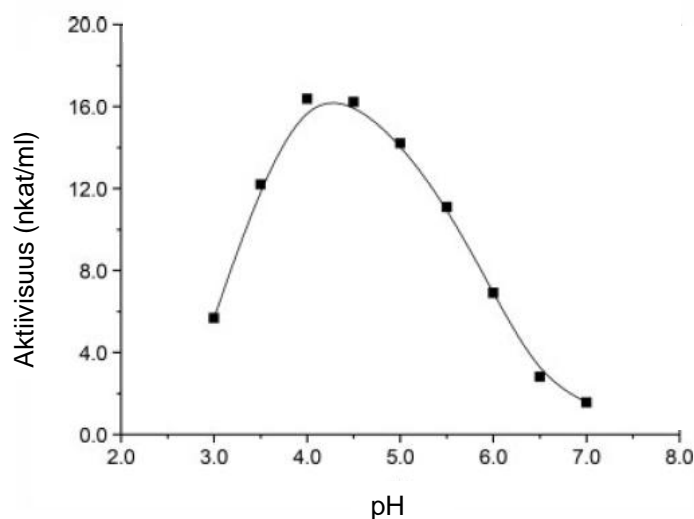
Proliiniligopeptidaasit (POP) eivät pilko proteiineja, vaan suhteellisen pieniä peptidejä, maksimissaan 30 aminohapon ketjuja (Polgár 2002). POP:it ovat rakentuneet siten, että niiden propellimainen sekundaarirakenne estää pitkien peptidiketjujen pääsyn entsyymin aktiiviseen keskukseen, mikä luonnossa suojaa mm. soluliman proteiineja pilkkoutumiselta. Vaikka POP:eja on eristetty monenlaisista eri lähteistä, on epätodennäköistä, että ne olisivat käyttökelpoisia gluteenin eliminointiin elintarvikesovelluksissa. Neutraali pH-optimi (Venäläinen ym. 2004) ja suhteellisen alhainen optimilämpötila eivät salli elintarvikesovellusten tavallisia inkubaatio-olosuhteita. Koska POP:it ovat soluliman entsyymejä, ne eivät erity elatusaineeseen, jolloin entsyymin eristäminen on työlästä ja kallista (Edens ym. 2005).

*Aspergillus niger* -proliiniendopeptidaasi. *Aspergillus niger* on homesieni, jota käytetään entsyymituotantoon. *A. niger* -kannat erittävät runsaasti entsyymejä, jotka vapauttavat biopolymeereistä peptidejä ja aminohappoja, ja tätä ominaisuutta hyödynnetään mm. elintarviketeollisuudessa. Kasvipatogeenisuudestaan huolimatta *A. niger* -homeesta tuotettuja entsyymejä pidetään yleisesti turvallisina käyttää (Schuster ym. 2002). *A. niger* -peptidaaseille on myönnetty Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto FDA:n (2002) GRAS-status (engl. generally recognized as safe), eli entsyymin on todettu turvalliseksi ja hyväksytty elintarvikesovelluksiin.

AN-PEP:ia tuotetaan käyttämällä *A. niger* -kanta CBS 513.88. Entsyymi erittyy elatusaineeseensa, joten puhtaan entsyymin tuotanto on yksinkertaista. Sekvenssien vertailun perusteella AN-PEP kuuluu seriinipeptidaasien SC-suvun heimoon S28, eikä prolyylioligopeptidaasien heimoon S9, kuten proliinispesifit endopeptidaasit yleensä (Edens ym. 2005). Sekvenssit ovat samantyyppisiä ennemminkin soluja hajottavien Pro-X-karboksipeptidaasien ja dipeptidyylipeptidaasi II:n kuin POP:ien kanssa. Lisäksi POP:it hydrolysoivat maksimissaan 27- tai 30-meeriä ja Edensin ym. (2005) toteuttamat hydrolyysit osoittivat AN-PEP:in pilkkovan molekyyli­massaltaan suurempiakin substraatteja, jopa kokonaisia proteiineja. Johtopäätöksensä *A. niger* -entsyymin todella on proliinispesifi endopeptidaasi (PEP), eikä prolyylioligopeptidaasi.

Elintarvikelaatuisen AN-PEP:in pH-optimi on 4,0–5,0 (kuva 5) (Edens ym. 2005; Sebela ym. 2009). Edensin ym. (2005) mukaan tarkka pH-optimi on 4,2 ja optimilämpötila kyseisessä pH:ssa 50 °C. AN-PEP:in molekyyli­massa on noin 66 kDa ja isoelektrinen piste

pH 4,2:ssa. AN-PEP on erittäin lämpöstabili; McIlvainen pH-puskuriin liuotettuna inkubointi 65 °C:ssa 30 min ajan ei heikentänyt aktiivisuutta lainkaan (Sebela ym. 2009). Inhibiittoritesteissä ainoastaan 0,4 mM *p*-nitrofenyyli-*p*'-guanidinobentsoaatti vähensi AN-PEP:in aktiivisuutta (Edens ym. 2005). AN-PEP:in suhteellisen korkeasta molekyyli-massasta ja huomattavasta glykosylaatiosta johtuen entsyymi soveltuu ainoastaan liuossovelluksiin (Sebela ym. 2009).



**Kuva 5.** *Aspergillus niger* -homeen tuottaman proliinispesifin endopeptidaasin (AN-PEP) aktiivisuus eri pH-olosuhteissa. Spektrofotometrisessä aktiivisuusmäärityksessä käytettiin Z-Gly-Pro-pNA-substraattia ja aktiivisuus mitattiin nkat-yksikkönä. Nkat määritellään entsyymin määräksi, jolla reaktionopeus nousi kyseisissä analyysiolosuhteissa 1 nmol/s (Sebela ym. 2009).

Puhdasta AN-PEP:ia voidaan tuottaa suuria määriä suhteellisen edullisesti. Entsyymien pääasialliset teolliset sovellukset ovat tällä hetkellä proteiinihydrolysaattien karvauuden poistaminen vähentämällä hydrofobisten peptidien määrää (Edens ym. 2005) ja oluen sameuden estäminen pilkkomalla proliinipitoisia proteiineja (Lopez ja Edens 2005). Oluenvalmistuksessa ohramaltaista uuttuu vaikealiukoisia hordeineja ja polyfenoleja, joiden vuorovaikutus voi jäädytettäessä aiheuttaa kolloidisen saostuman (engl. chill-haze) (Asano ym. 1982; Siebert ym. 1996). Oluen kirkastamiseksi on olemassa useita menetelmiä, mutta ne kaikki eivät ole riittävän tehokkaita tai ne samalla estävät oluessa toivottua vaahdonmuodostusta. Proteolyttisillä entsyymeillä voidaan pienentää sameutta aiheuttavien proteiinien kokoa, jolloin muodostuvat proteiini-polyfenoli-aggregaatit ovat pienempiä ja liukoisempia veteen (Posada ym. 1971). Proteiinien taipumus aiheuttaa sameutta on suoraan suhteessa niiden proliinipitoisuuteen (Asano ym. 1982; Siebert 1999) ja proliinien väliset peptidisidokset ovat tunnetusti hankalia pilkkoa. Lopez ja Edens (2005) osoittivat, että *A. niger* -entsyymi on spesifi pilkkomaan nimenomaan

proliinipitoisia, sameutta aiheuttavia proteiineja vaikuttamatta kuitenkaan merkittävästi vaahdonmuodostukseen. Näihin tutkimuksiin perustuen DSM Food Specialties (Delft, Alankomaat) on tuonut markkinoille Brewers Clarex -entsyymivalmisteeseen, joka on laajalti käytössä panimoteollisuudessa. Tämän tutkielman kokeellisessa osassa käytetty AN-PEP-entsyymivalmiste on todennäköisesti vastaavanlainen entsyymi.

AN-PEP on osoittautunut erittäin tehokkaaksi pilkkomaan myös T-soluja aktivoivia gluteenipeptidejä happamissa, vatsalaukkua jäljittelevissä olosuhteissa, sillä sen pH-optimi on hapan ja se on resistentti pepsiinille (Stepniak ym. 2006). AN-PEP pilkkoi gluteenin pepsiini-trypsiini-digestiä sekä kokonaisia gliadiini- ja gluteniinimolekyylejä, jotka eivät enää pilkkoutuneina sitoutuneet keliakikoiden HLA-DQ2/8-molekyyleihin. Stepniak ym. havaitsivat AN-PEP:in hydrolysoivan ns. 19-meeriä (Glia p31–49), jonka tiedetään saavan keliakikoilla aikaan tulehdusvasteen. Lisäksi AN-PEP pilkkoi tehokkaasti  $\alpha$ - ja  $\gamma$ -gliadiineja. Myös Rizzello ym. (2007) ja Mitea (2008a) käyttivät *A. niger* -peptidaasia onnistuneesti haitallisten gluteenisekvenssien eliminointiin *in vitro*. AN-PEP pystyy siis eliminoimaan suurimman osan gluteenin toksisista sekvensseistä, jopa yksinään, niin elintarvike- kuin lääkesovelluksissakin.

*Flavobacterium meningosepticum* -proliiniendopeptidaasi. *F. meningosepticum* -bakteerista peräisin olevan proliiniendopeptidaasin (FM-PEP) on osoitettu pilkkovan keliakikoille haitallisia gluteenilähtöisiä peptidejä *in vitro* (Shan ym. 2002). FM-PEP on spesifi immunogeenisiä  $\alpha$ - ja  $\gamma$ -gliadiineja sekä gluteniinia kohtaan (Gass ym. 2005). Marti ym. (2005) ja Pyle ym. (2005) ovat osoittaneet, että FM-PEP vähensi huomattavasti pepsiinillä ja haiman peptidaaseilla esikäsitellyn gluteenin immunoreaktiivisuutta. FM-PEP inaktivoituu, ainakin osittain, vatsalaukun matalan pH:n ja pepsiinin vaikutuksesta. Ruoansulatuksessa erittyvää määrää vastaava määrä haiman entsyymejä ei kuitenkaan inaktivoitunut FM-PEP:ia. Inkubaatio happamissa olosuhteissa säilytti 50–70 % entsyymien alkuperäisestä aktiivisuudesta (Shan ym. 2004). Entsyymien molekyylimassa on 79 kDa (Yoshimoto ym. 1991) ja pH-optimi 7.

Polgárin (1994) mukaan FM-PEP:in rakenne estää suurten molekyylien pääsyn entsyymien aktiiviseen keskukseen, joten sen ensisijaisia substraatteja olisivat pienet peptidit. Shan ym. (2004) kuitenkin osoittivat, että FM-PEP hydrolysoi yhtä tehokkaasti 33-meeriä ja 13-meeristä gluteenipeptidiä PQQQLPYPQQQLP. FM-PEP hydrolysoi mieluiten Pro-Gln-sidosta. 13-meeri pilkkoutui ensisijaisesti nuolen osoittamasta kohdasta: PQQQLPYP↓QQQLP. Vertailtaessa FM-PEP:ia muihin bakteeriperäisiin PEP:eihin

havaittiin, että FM-PEP hydrolysoi 33-meeriä *Myxococcus xanthus* -peptidaasiin verrattuna viisinkertaisella nopeudella ja 20 kertaa nopeammin kuin *Sphingomonas capsulata* -peptidaasi. FM-PEP-hydrolyysissä syntyi välituotteina pitkiä peptidiketjuja.

Gluteenin eliminaatiota FM-PEP:illa ovat tutkineet myös Piper ym. (2004) ja Matysiak-Budnik ym. (2005). Tutkimuksissa havaittiin, että FM-PEP vaati suuren entsyymipitoisuuden ja pitkän inkubaatioajan. FM-PEP ei siksi voisi toimia keliakian entsyymaattisena lääkahoitona tai poistaa gluteenin haitallisuutta täysin, ainakaan yksinään. Myös entsyymien heikko saanto ja siitä aiheutuvat korkeat tuotantokustannukset hankaloittavat kaupallisesti kannattavien sovellukset kehittämistä.

*Sphingomonas capsulata* -proliiniendopeptidaasi. Shan ym. (2004) havaitsivat, että *S. capsulata* -bakteerista peräisin olevan proliiniendopeptidaasi (SC-PEP) pilkkoi ensisijaisesti Pro-Gln- ja Pro-Tyr-sidoksia. SC-PEP ei hydrolysoi tehokkaasti pitkiä peptidiketjuja, kuten 33-meeriä, vaan mieluummin esimerkiksi 13-meerin peptidisidoksia. SC-PEP:in pH-optimi on 7 ja inkubaatio pH:ssa 1,6–3,9 säilytti 30–80 % entsyymien alkuperäisestä aktiivisuudesta.

*Myxococcus xanthus* -proliiniendopeptidaasi. Edelleen Shanin ym. (2004) tutkimuksissa havaittiin, että *M. xanthus* -bakteerin solulimaan erittyvä proliiniendopeptidaasin (MX-PEP) todettiin pilkkovan mieluummin Pro-Tyr/Phe-sidoksia kuin Pro-Gln-sidosta ja 33-meerin hydrolyysituotteet olivat pääasiassa pieniä peptidejä. MX-PEP hydrolysoi kuitenkin mieluummin 13-meeriä kuin 33-meeriä. MX-PEP:in pH-optimi on 7. Inkubaatio happamissa olosuhteissa säilytti jopa 70–90 % entsyymien alkuperäisestä aktiivisuudesta eikä ruoansulatuksessa erittyvää määrää vastaava määrä haiman entsyymejä inaktivoi MX-PEP:ia. Shanin ym. (2004) tutkimuksiin perustuen Gass ym. (2005) yksinkertaistivat MX-PEP:in tuotantoprosessia. Saanto parani ja kustannukset olivat alhaisemmat, minkä lisäksi Gass ym. osoittivat MX-PEP:in spesifisyyden immunogeenistä  $\alpha$ - ja  $\gamma$ -gliadiinia sekä gluteniinia kohtaan.

Aspergillopepsiini. Ehren ym. (2009) tutkivat gluteenin eliminaatiota *Aspergillus niger* -homeen tuottamalla aspergillopepsiinillä (ASP). ASP:ia käytetään laajalti elintarvike-, lisäraavinne- ja rehutuoannossa. Se hydrolysoi gluteenia lyhyemmiksi peptideiksi, toisin kuin nisäkkäiden ruoansulatuspepsiini. ASP ei kuitenkaan yksinään pystynyt poistamaan gluteenin haitallisuutta, mutta yhdistettynä ohran glutamiinispesifiin EP-B2-entsyymiin se pystyi eliminoimaan huomattavia gluteenimääriä fysiologisissa vatsalaukun olosuhteissa. Vaikka ASP ei ole suoraan spesifi immunotoksisia gluteeniepitooppeja kohtaan, se voi

edistää gluteenin eliminaatiota pilkkomalla proteiineja lyhyemmiksi peptideksi spesifimpien endo- ja eksopeptidaasien saataville (Hausch ym. 2002; Shan ym. 2004).

Dipeptidyylipeptidaasi IV. Ehren ym. (2009) selvittivät gluteenin haitallisuuden poistamista myös *Aspergillus oryzae* -homeen tuottamalla seriinipeptidaaseihin kuuluvalla dipeptidyylipeptidaasi IV:llä (DPPIV, EC 4.4.14.5). DPPIV nopeutti lyhyiden peptidien eliminaatiota ja yhdessä proteiineja lyhyemmiksi fragmenteiksi pilkkovan ASP:in kanssa pienet gluteenimäärät saatiin eliminoitua *in vitro*. Molemmat entsyymit ovat turvallisia elintarvikkeikäytössä. DPPIV irrottaa dipeptidejä vähintään kolmesta aminohaposta muodostuvista substraateista. DPPIV pilkkoo ensisijaisesti sidoksia, joissa proliini on sijainnissa P<sub>1</sub>, mutta ei kuitenkaan kahden proliinin välisiä sidoksia.

### 2.3 Prolamiinien immunologiset määrittämenetelmät

Keliakiaruokavalioon tarkoitettut elintarvikkeet valmistetaan ns. luontaisesti gluteenittomista raaka-aineista tai ainesosista, joista gluteeni on poistettu. Valmistajan on huolehdittava, etteivät gluteenittomiksi merkityt ainesosat tai elintarvikkeet kontaminoidu gluteenilla. Vehnä on elintarvikkeetjussa erittäin yleinen, joten myös reseptikaltaan gluteenittomat tai gluteenittomiksi prosessoidut tuotteet voivat sisältää gluteenia sellaisen määrän, joka riittää aiheuttamaan oireita keliakikoille. Kontaminaatoriski on olemassa esimerkiksi tuotantolinjoilla ja laitteissa, joilla on aiemmin käsitelty gluteenipitoisia tuotteita tai raaka-aineita. Gluteenittomuuden varmistamiseksi tarvitaan siis luotettavia analyysimenetelmiä.

Viljakemiassa gluteeni on määritetty perinteisesti fysikaalisesti, ei kemiallisesti. Kostean sitkon määrittämisessä taikinapallosta pestään pois tärkkelys vedellä joko käsin tai sitkonpesulaitteella, jolloin jäljelle jää gluteeni. Keliakikoille haitallisen gluteenin määrittämiseen tarkoitetuista analyysimenetelmistä suurin osa perustuu vastaainetekniikkaan (engl. antibody). Muita ei-immunologisiin reaktioihin perustuvia analyysimenetelmiä ovat esimerkiksi polymeerasiketjureaktio (engl. polymerase chain reaction, PCR), joka tunnistaa proteiinin sijaan DNA:n, sekä adenosinitrifosfaatti (ATP) -tikkutesti lähinnä prosessipintojen puhtauden tarkistamiseen (Mermelstein 2011). Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (engl. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) on kuitenkin muita menetelmiä huomattavasti tarkempi.



### 2.3.1 Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys, ELISA

ELISA on biokemiallinen vasta-ainetekniikkaan perustuva menetelmä, jota käytetään yleisesti immunologisten yhdisteiden määrittämisessä. ELISA-testillä voidaan havaita biologisesta näytteestä antigeeni, eli vasta-aineen muodostaja, tai vaihtoehtoisesti itse vasta-aine. Spesifit vasta-aineet sitoutuvat tutkittavaan proteiiniin, eli antigeeniin. Muodostuneeseen vasta-aineen ja antigeenin kompleksiin liitetään ns. entsyymikonjugoitu vasta-aine, jonka avulla mitattavissa oleva yhdiste muodostuu. Muodostuneen yhdisteen pitoisuus vastaa antigeenin pitoisuutta alkuperäisessä näytteessä.

Gluteenittomia erityisruokavalioelintarvikkeita koskevan Codex Alimentarius -standardin (CAC 2008) mukaan gluteenipitoisuuden määrittämiseksi viljamateriaalin prolamiinit uutetaan alkoholin 40–70-% vesiliuokseen ja prolamiinipitoisuus analysoidaan immunokemiallisella menetelmällä. Menetelmän vasta-aineen on tunnistettava keliakiassa haitalliset peptidit, mutta samalla sen ei pidä reagoida muiden elintarvikeproteiinien kanssa. Tunnistusrajan on oltava vähintään 10 mg gluteenia / kg elintarviketta. Prolamiinien monimuotoisuus tekee prolamiinipitoisuuden tarkasta määrittämisestä kuitenkin haastavaa. Menetelmällä pitäisi voida määrittää haitalliset proteiinit ja peptidit huolimatta elintarvikkeen tyypistä tai sen valmistusprosessista.

Prolamiinispesifiset vasta-aineet. Prolamiinien tunnistamiseen on kehitetty useita erilaisia poly- ja monomeerisia vasta-aineita, jotka lähes kaikki on kehitetty gliadiinia tai sen alayksiköitä vastaan. Suurin osa kaupallisista immunologisista gluteenimääritysmenetelmistä perustuu  $\omega$ -gliadiini- tai R5-vasta-aineeseen. Muita käytettyjä vasta-aineita ovat mm. PN3-vasta-aine  $\alpha$ -gliadiinin 19-meeriä vastaan (Ellis ym. 1998), 33-meeriä tunnistava G12 (Morón ym. 2008) ja  $\alpha$ 20-gliadiinia tunnistava vasta-aine (Mitea ym. 2008b). Skerrittin ja Hillin (1990) kehittämä monoklonaalinen  $\omega$ -gliadiinivasta-aine tunnistaa pääasiassa  $\omega$ -tyyppisiä prolamiineja ja gluteniinin HMW-alayksiköitä. Tämä ns. Skerritt-menetelmä oli AOAC:n (engl. Association of Analytical Communities) hyväksymä virallinen menetelmä (Official Method 991.19) gluteenin määrittämiseksi elintarvikkeista ja käytössä useita vuosia.

Codex Alimentarius -komissio hyväksyi vuonna 2006 Valdesin ym. (2003) kehittämän R5-vasta-aineeseen perustuvan ELISA-menetelmän ns. I-tyypin menetelmäksi (CAC 2006). R5-ELISA on siis ainoa virallinen menetelmä gluteenipitoisuuden määrittämiseen ja käytännössä korvannut aiemmin suositellun  $\omega$ -gliadiinivasta-aineen. Monoklonaalinen

R5-vasta-aine kehitettiin alun perin rukiin sekaliiniuutetta vastaan (Sorell ym. 1998) tunnistamaan keliakikoille todennäköisesti haitallinen QPFP-sekvenssi (Osman ym. 2001; Valdes ym. 2003). Kyseinen sekvenssi esiintyy toistuvasti prolamiineissa ja erityisesti niiden  $\omega$ -tyyppisissä fraktioissa (Kahlenberg ym. 2005). R5 tunnistaa pääasiassa  $\alpha$ - ja  $\gamma$ -gliadiineja, mutta heikosti myös  $\omega$ -gliadiineja ja yli 75 kDa:n kokoisia proteiineja (Van Eckert ym. 2009). Prolamiinialayksiköillä on kullakin ominainen sitoutumisherkkyytensä eri prolamiinispesifejä vasta-aineita kohtaan (Kanerva ym. 2009). R5:n on esimerkiksi todettu sitoutuvan gliadiineihin voimakkaammin kuin gluteeniinisiin (Valdes ym. 2003; Kahlenberg ym. 2006). R5-menetelmän toistettavuutta testattiin mm. R-Biopharmin analyysikitillä, jolloin toistettavuus oli 30 % (Mendéz ym. 2005). Immunologisten analyysien toistettavuus on tyypillisesti vastaavaa suuruusluokkaa.

Kuten muillakin vasta-aineilla, myös R5:lla on omat heikkoutensa. Valmistajan mukaan menetelmä ei reagoi luontaisesti gluteenittomiin viljoihin, kuten kauraan, maissiin, riisiin, hirssiin, tattariin, quinoaan tai amaranttiin (R-Biopharm AG 2007). Sen on kuitenkin havaittu tunnistavan ei-haitallisia soijan ja lupiinin proteiineja sekä reagoivan erittäin voimakkaasti ohran hordeiniinisiin (Kanerva ym. 2006; Kanerva ja Sontag-Strohm 2007). Muista vasta-aineiden tuottamista vääristä positiivisista tuloksista ei ole toistaiseksi raportoitu.

Standardit. Kvantitatiivisissa määrittelyissä standardien, eli vertailunäytteiden, on oltava mahdollisimman samankaltaisia tutkittavan näytteen kanssa. Vehnäprolamiinit ja niiden rooli keliakiassa tunnetaan hyvin, kun taas ohran ja rukiin prolamiinit ovat jääneet vähemmälle huomiolle. Nykyiset gluteenistandardit perustuvat siksi vehnäprolamiineihin, eivätkä siis suoraan kvantitoidu gluteenipitoisuutta ohraa tai ruista sisältävistä näytteistä. Gluteenille ei ole olemassa kansainvälistä vertailustandardia. Kaikille Triticeae-viljojen prolamiineille soveltuvan yhdenmukaisen standardin puuttuessa gluteenianalytiikassa käytetään monenlaisia erilaisia standardeja ja ne saattavat aiheuttaa eroja eri menetelmillä saatuihin tuloksiin (Kanerva ym. 2010b).

Käytetyimpiä gliadiinistandardeja ovat mm. australialaisesta vehnälaajike Timgalenista eristetty gliadiini, sekä useampien lajikkeiden seoksista valmistetut Sigma-gliadiini, RM8418 ja PWG-gliadiini (Kanerva 2011). Suositeltavin standardi olisi yleisimmistä eurooppalaisista vehnälaajikkeista eristetty Prolamin Working Groupin kehittämä PWG-gliadiini. R-Biopharmin (Darmstadt, Saksa) kaupallisessa R5-ELISA:ssa käytetään standardina Timgalen-gliadiinia, joka on kuitenkin kalibroitu PWG-gliadiinilla. ELISA-

näyte, eli prolamiiniuute, on aina sekoitus erilaisia prolamiineja, aivan kuten standardit ovat sekoitus erilaisia vehnägliadiineja. Kanervan mukaan vasta-aineen sitoutuminen näytteen prolamiineihin on yksilöllistä prolamiinien tyypistä riippuen. Mikäli näytteen prolamiinikoostumus selvästi eroaa standardista, voi analyysituloksella olla virheellinen.

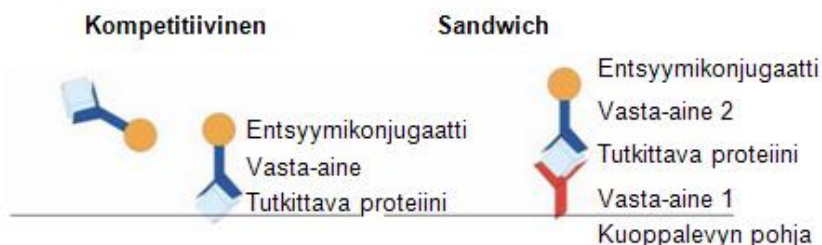
Koska puhtaan gliadiinin eristäminen viljamateriaalista on mahdotonta, on standardiongelmia yritetty ratkaista valmistamalla synteettisiä peptidejä (Kanerva 2011). Niiden koostumus on aina sama ja ne tunnetaan yksityiskohtaisesti, toisin kuin luonnossa esiintyvät prolamiinifraktiot. Monimuotoisten prolamiinirakenteiden jäljittely ei kuitenkaan ole yksinkertaista ja peptidistandardeja käyttämällä saadaan kokonaisgluteenipitoisuuden sijaan tulokseksi peptidipitoisuus. Gluteenitestikiteillä saadaan siis tulokseksi ainoastaan sen gluteenifraktion tai -fraktioiden pitoisuus, joita kyseinen vasta-aine tunnistaa. Peptidistandardeilla saadut tulokset voivat olla hankalasti tulkittavia ja hankalia soveltaa, sillä gluteenittomien tuotteiden raja-arvot perustuvat kuitenkin tuotteen kokonaisgluteenipitoisuuteen.

Kompetitiivinen ja sandwich-ELISA. ELISA-määritysmenetelmiä on kaupallisesti saatavilla kahtena eri versiona. Ns. sandwich-ELISA:lla määritetään proteiineja ja polypeptidejä, joissa on ainakin kaksi vasta-aineen sitoutumiskohtaa. Kompetitiivisessä ELISA:ssa tunnistukseen riittää vain yksi sitoutumiskohta, joten menetelmällä voidaan tunnistaa gluteenilähtöisiä peptidejä, kuten esimerkiksi hydrolyysituotteita. Sandwich-menetelmä on ollut aiemmin yleisempi, mutta spesifisempien vasta-aineiden kehittämisen myötä kompetitiivisestä menetelmästä on tullut suosittu (Kanerva 2011).

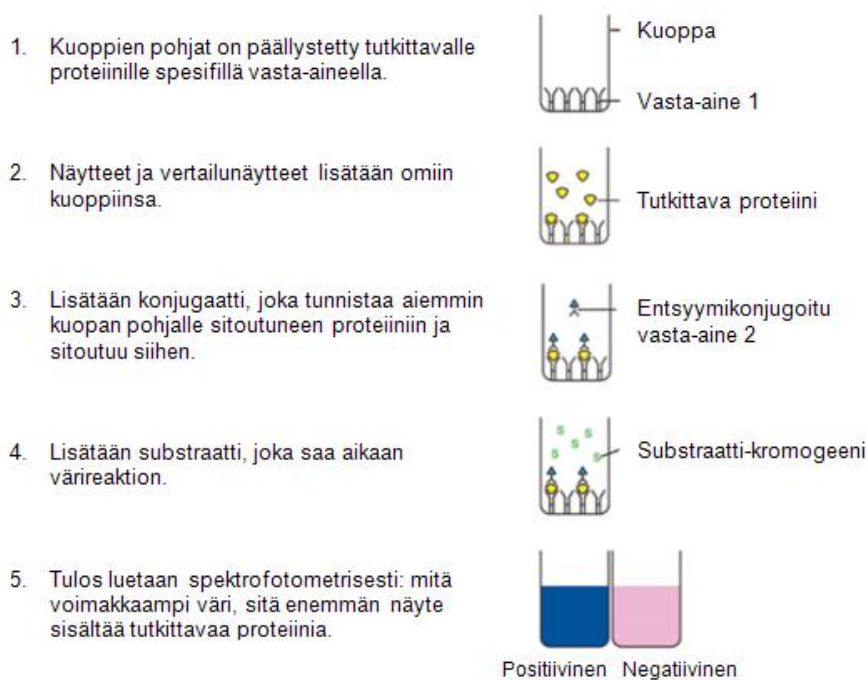
Sandwich-ELISA-menetelmässä kuoppalevyn kuoppien pohjat on päällystetty tutkittavaa proteiinia kohtaan spesifillä vasta-aineella. Lisättäessä standardia tai näyteliuosta kuoppiin, tutkittava proteiini (engl. antigen) sitoutuu vasta-aineeseensa ja tuottaa siis vasta-aineen ja antigeenin yhteenliittymän. Vasta-aineisiin sitoutumattomat yhdisteet huuhdotaan pois ja kuoppiin lisätään tutkittavaa proteiinia tunnistava leimattu eli ns. entsyymikonjugaatu vasta-aine, joka sitoutuu aiempaan vasta-aineen ja antigeenin yhteenliittymään. Tavallisimmin käytettyjä entsyymejä ovat peroksidaasi ja alkaalinen fosfataasi. Muodostuneen ns. antibody-antigen-antibody -kompleksin vuoksi menetelmää kutsutaan sandwich-ELISA:ksi (kuva 6). Sitoutumaton entsyymikonjugaatti huuhdellaan pois ja kuoppiin lisätään sekä entsyymisubstraatti että substraatti-kromogeeni, eli värireagenssi. Inkuboinnin aikana entsyymikonjugaatti muuttaa värireagenssin siniseksi reaktiotuotteeksi ja ns. pysäytysliuoksen lisääminen muuttaa värin edelleen keltaiseksi (kuva 7). Liuoksen

absorbanssi mitataan spektrofotometrisesti ja sandwich-menetelmässä se on suoraan verrannollinen näytteen proteiinipitoisuuteen. Jotta proteiiniin voi sitoutua kaksi vasta-ainetta, on proteiinin oltava riittävän suuri. Siksi sandwich-menetelmä ei sovellu kovin hyvin esimerkiksi proteiinihydrolysaattien tunnistamiseen.

Kompetitiivisessa ELISA-menetelmässä käytetään vain yhtä vasta-ainetta, joten menetelmä soveltuu siis pienille, hydrolysoituneille proteiineille ja peptideille, jotka kuitenkin saattavat olla edelleen haitallisia keliakiaakikoille (Wieser ym. 2007). Kompetitiivinen menetelmä on herkempi, mutta ei yhtä spesifi kuin sandwich. Kompetitiivisessa ELISA:ssa vasta-aine voi sitoutua myös epäspesifisti, sillä tunnistamiseen tarvitaan vain yksi epitooppi.



**Kuva 6.** Kompetitiivisen ja sandwich-ELISA-menetelmän vasta-ainesitoutumisen periaate (mukaillen: Kanerva 2008).



**Kuva 7.** Sandwich-ELISA -määrittelyn periaate (mukaillen: Mermelstein 2011).

Kompetitiivisessa gluteenimäärityksessä käytettävän kuoppalevyn kuopat on tavallisesti päällystetty (esimerkiksi gliadiini-) antigeenilla. Kuoppiin lisätään näyteliuos tai tutkittavalle peptidille kalibroitu standardi yhtä aikaa vasta-aineen kanssa. Entsyymikonjugaatit sitoutuvat kuoppalevyyn sidottuun gliadiiniin tai näyteliuoksen prolamiinipeptideihin. Kompetitiivinen määrittäminen perustuu siis alustalle sidottujen ja näytteen proteiinien väliseen kilpailuun vasta-aineesta, jolloin muodostuu antigeenin ja vasta-aineen komplekseja (kuva 6). Kompetitiivinen menetelmä voidaan rakentaa myös sitomalla vasta-aine kuopan pohjaan. Silloin kilpailu tapahtuu näytteen sisältämän prolamiinin ja entsyymileimattujen peptidien välillä. Menetelmissä voi olla käytössä myös useampia vasta-aineita. Liuoksessa sitoutuneet entsyymikonjugaatit pestään pois ja jäljelle jäävät kuoppalevyyn sitoutuneet konjugaatit. Lopuksi kuoppiin lisätään värireagenssi ja pysäytysliuos, kuten sandwichissäkin. Kompetitiivisessa menetelmässä mitattu absorbanssi on kääntäen verrannollinen näytteen peptidipitoisuuteen.

Kompetitiivisen ja sandwich-menetelmän näytteenvalmistukset eroavat toisistaan. R-Biopharmin sandwich-ELISA-menetelmän näytteenvalmistuksessa suositellaan käytettäväksi ns. cocktail-uuttoa. Menettelyssä prolamiinit pelkistetään ennen uuttoa 2-merkaptetanolilla ja uuttoa tehostetaan guanidiinihydrokloridilla, joka estää pelkistyneitä gluteenialayksiköitä ryhmittymästä uudelleen. Uuttomenetelmien vertailu on osoittanut, että cocktail-uutossa saannot olivat 70–98 %, kun 60-% etanolilla uutettaessa gluteenisaanto oli vain noin 30–50 % (García ym. 2003). Heikompi uuttoaanto johtui todennäköisesti siitä, että prosessoitujen elintarvikkeiden lämpökäsitellyt prolamiinit eivät uutu pelkistämättöminä.

Kehittämistarpeita. Elintarvikkeiden gluteenipitoisuuden immunologisen määrittämisen haasteita ovat prolamiinien monimutkaisuus, eri uutto- ja testimenetelmien antamien tulosten vaihtelu, prosessoitujen elintarvikkeiden monimuotoisuus ja menetelmien validointiin tarvittavien vertailumateriaalien puute (Allred 2010). Suurimpana haasteena pidetään jo olemassa olevien menetelmien validointia; eri testimenetelmät eivät aina anna samanlaisia tuloksia samoista näytteistä johtuen todennäköisesti eroista vasta-aineissa. Testimenetelmiä myyvät yritykset myös arvioivat menetelmiensä pätevyyttä eri perustein.

Uudistetun Codex-standardin mukaan prolamiinipitoisuuden oletetaan olevan 50 % gluteenipitoisuudesta, jolloin tuotteen gluteenipitoisuus saadaan kertomalla sen prolamiinipitoisuus kahdella. Wieserin ja Köhlerin (2009) mukaan kerroin ei kuitenkaan ole validi, vaan viljamateriaalissa prolamiineja on yleensä enemmän kuin gluteliineja, ja

suhde vaihtelee huomattavasti viljalajista ja -lajikkeesta riippuen. Analysoitaessa gluteenittomien tuotteiden vehnä-, ohra-, tai ruiskontaminaatiota saadaan Codex-standardin kerrointa käyttämällä tulokseksi liian korkea gluteenipitoisuus.

Gluteenin muuntuminen elintarvikeprosesseissa vaikuttaa prolamiinispesifien vasta-aineiden kykyyn tunnistaa prolamiineja immunologisesti (Kanerva ym. 2010a). Tiedetyt prosessit saattavat aiheuttaa esimerkiksi gliadiinin glutamiiniaminohappojen deamidaatiota glutamiinihapoksi, jolloin R5 tunnistaa ne heikommin (Kanerva ym. 2011). Deamidaatio voi olla myös toivottua; sitä käytetään esimerkiksi parantamaan proteiinien liukoisuusominaisuuksia. Tällaista ns. liukoista gluteenia on jo markkinoilla elintarviketeollisuuden tarpeisiin, kuten esimerkiksi tuotemerkki Meripro (Tereos Syral 2011). On kuitenkin havaittu, että deamidoituneet gluteenipeptidit voivat olla keliakikoille jopa haitallisempia kuin natiivit peptidit (Molberg 1998). Epäjohdonmukaisuudet gluteenin tunnistamisessa ja pitoisuuksien määrittämisessä kaupallisilla testikiteillä osoittavat tarpeen tarkoituksenmukaisten gluteenistandardien kehittämiseksi ja vasta-ainesitoutumiseen vaikuttavien tekijöiden syvälliselle tarkastelulle. Jotta analytiikka pysyisi gluteenittomille tuotteille asetettujen kiristyvien raja-arvojen perässä, tarvitaan standardeja, jotka soveltuvat tunnistamaan myös muunneltuja prolamiiniproteiineja.

Gluteenianalytiikassa on siis runsaasti kehitettävää. Ennen kuin keliakian kliininen biokemia ymmärretään täysin, perustuu analyysimenetelmien käyttö ja kehitystyö likiarvoihin ja oletuksiin, joita pyritään jatkuvasti parantamaan vastaamaan paremmin gluteeniyliherkkien etua. Koska keliakian ainoa hoito on gluteeniton ruokavalio, on tuoteturvallisuus ja siten analytiikan kehittäminen keskeinen tutkimuskohde.

### **2.3.2 Muita immunologisia menetelmiä**

Immunoblottaus. Immunoblottausta käytetään proteiinien tunnistamiseen spesifin vasta-aineen avulla (Scheibe ja Westermeier 2009). Menetelmässä proteiinit siirretään elektroforeesigeeliltä proteiineja sitovalle polyvinylideenifluoridikalvolle (PVDF) sähkövirran avulla. Siirtoa kutsutaan blottaukseksi. Siirron jälkeen kalvolla olevat proteiinit käsitellään tutkitulle proteiinille spesifillä vasta-aineella. Mikäli vasta-aine tunnistaa proteiinin, eli anti-geenin, kiinnittyy vasta-aine sen pintaan. Kiinnittynyt vasta-aine värjätään toisella vasta-aineella, johon on liitetty värireaktion aikaansaava yhdiste. Kalvolle värjäytyvät vain ne proteiinit, joihin ensimmäinen, ns. primaarivasta-aine, kiinnittyi.

Prolamiinien tunnistamiseen voidaan käyttää esimerkiksi polyklonaalista primaarivasta-ainetta, joka tunnistaa kaikkien viljojen varastoproteiinit. Toinen, eli sekundaarivasta-aine, voi olla esimerkiksi kanin proteiineja vastaan kehitetty vuohen seerumiin erittyvä vasta-aine. Ns. blokkauksessa täytetään kalvon kaikki tyhjät osat proteiinilla, jota vasta-aine ei tunnista. Koska myös vasta-aineet ovat proteiineja, ilman blokkausta kalvon pinta sitoisi vasta-aineet itseensä ja kaikkiin kalvon tyhjiin kohtiin syntyisi voimakas värireaktio. Värjäyksen jälkeen kalvoille värjäytyneitä vyöhykkeitä tarkastellaan molekyylimassamarkkerin suhteen. Immunoblottaus on ensisijaisesti kvalitatiivinen menetelmä, jonka perusteella voidaan tutkia sisälsikö näyte tiettyä proteiinia vai ei.

Immunopresipitaatio. Proteiinin tutkiminen edellyttää usein sen puhdistamista erilleen näytteen muista proteiineista. Immunopresipitaatio (IP) on menetelmä proteiinin antigeenin saostamiseksi liuoksesta käyttämällä vasta-ainetta, joka sitoutuu spesifisti haluttuun proteiiniin – kuten ELISA-menetelmässä (Bendickson ja Nilsen-Hamilton 2007). Immunopresipitaatiota käytetään proteiinin eristämiseen näytteestä, joka voi sisältää jopa tuhansia erilaisia proteiineja. IP-menetelmässä vasta-aine sitoutuu kiinteään, ns. immobilisoituun substraattiin. Proteiinien kiinnittämiseen voidaan käyttää joko suoraa tai epäsuoraa sitoutumista.

Suorassa IP:ssa halutulle proteiinille tai proteiiniryhmälle spesifit vasta-aineet on immobilisoitu kiinteään substraattiin, kuten ns. superparamagneettisiin helmiin tai mikrokooppisiin ei-magneettisiin agarosihelmiin. Helmet lisätään proteiiniseokseen, ja kohdeproteiinit sitoutuvat helmiin vasta-aineensa välityksellä, eli immunosaostuvat. Epäsuorassa menetelmässä vasta-aine lisätään suoraan proteiiniseokseen, jolloin vasta-aineet eivät ole vielä kiinnittyneenä kiinteään ns. avustavaan faasiin, vaan ne leijuvat proteiiniseoksessa vapaina sitoutumaan kohdeproteiineihinsa. Seokseen lisätään myöhemmin ns. A- tai G-proteiinilla päällystetyt helmet, joihin ensin kohdeproteiineihinsa sitoutuneet vasta-aineet kiinnittyvät. Epäsuoraa menetelmää käytetään jos kohdeproteiinin pitoisuus on pieni, sen affiniteetti vasta-aineeseensa heikko tai sitoutumisen kinetiikka hidasta. Yleensä suora menetelmä on ensisijainen.

Helmet ja vasta-aineen välityksellä niihin sitoutuneet proteiinit erotetaan sitoutumattomista proteiineista ja näytteen muista komponenteista sentrifugoimalla tai magneetilla. Pesujen jälkeen helmiin liittyneet proteiinit voidaan denaturoida kuumentamalla SDS-puskurissa ja tunnistaa elektroforeesilla molekyylimassojen perusteella.

### 3 KOKEELLINEN TUTKIMUS

#### 3.1 Koeasetelma ja tavoite

Kokeellisen tutkimuksen tavoitteena oli hydrolysoida happamissa olosuhteissa inkuboidun mallasraaka-aineen jäännösprolamiinia *Aspergillus niger* -homeesta eristetyllä proliinispesifillä endopeptidaasivalmisteella (AN-PEP) siten, että hydrolysaatin prolamiinipitoisuus olisi enintään 100 mg/kg. Tällaista tuotetta voitaisiin mahdollisesti käyttää esimerkiksi osana gluteenitonta leivontaa parantamaan gluteenittoman leivän aromia. Lisäksi tutkittiin miten hydrolyysiaika ja endopeptidaasin pitoisuus vaikuttivat prolamiinien pilkkoutumiseen.

Tämän tutkimuksen ensisijainen tavoite oli tutkia AN-PEP-käsittelyn toimivuutta; eliminoida mallasautolysaatien jäännösprolamiini ja tuottaa gluteeniton tai erittäin vähän gluteenia sisältävä hydrolysaatti. Mikäli proliiniendopeptidaasin pitoisuus tai inkubaatioolosuhteet olisi haluttu optimoida, olisi käytetty tilastollista koesuunnitelmaa.

#### 3.2 Materiaalit ja menetelmät

Tutkimuksessa käytettiin raaka-aineena EYT-laitoksessa valmistettuja vehnä-, ohra- ja ruismallasautolysaatteja. Autolysaatit valmistettiin hapattamalla mallasraaka-ainetta kemiallisesti (pH 4, 40 °C, 24 h), mikä mahdollisti prolamiinien hajoamisen viljamateriaalien entsyymien vaikutuksesta. Viljan luontaista entsyymiaktiivisuutta täydennettiin hydrolysoimalla mallasautolysaattia edelleen proliinispesifillä *A. niger*-endopeptidaasilla (DSM Food Specialties, Delft, Alankomaat). Hydrolyysin etenemistä seurattiin tarkkailemalla prolamiinien pilkkoutumista kokoeksklusiokromatografialla, vapaan aminotyypen muodostumisena ja SDS-PAGE:lla. Määritysten avulla saatiin tietoa hydrolysaatin aminoryhmien määrästä sekä proteiinifraktioiden koosta ja molekyyliainemassasta. Prolamiinien hajoamista hydrolyysin edetessä seurattiin immunologisten menetelmien avulla. Tutkimuksessa käytetyt reagenssit, laitteet ja tarvikkeet on luetteloitu liitteessä 2. Vertailunäytteinä käytettiin 0 h hydrolysoituja mallasautolysaatteja. Vapaan aminotyypen ja prolamiinipitoisuuden määrittämisessä saatuja tuloksia voitiin verrata myös mallasautolysaateista aiemmin määritettyihin tuloksiin.



### 3.2.1 Mallasautolysaatit ja AN-PEP-aktiivisuuden säilyminen

Mallasautolysaattien valmistus ja ominaisuudet. Idätetyt viljaraaka-aineet oli mallastettu teollisesti Laihian Mallas Oy:ssä (Laihia) ja kuivattu hellävaraisesti, mikä takasi raaka-aineiden korkean entsyymiaktiivisuuden. Mallastetut jyvät jauhettiin Retsch-myllyllä (0,5 mm:n seula) ja saatua jauho käytettiin kemialliseen inkubaatioon. Inkubaatiota varten 50 ml:n kierrekorkilla suljettaviin koeputkiin sekoitettiin 5,0 g jauhoa ja 7,5 ml Milli-Q-vettä, joka sisälsi 200 µl happoliuosta (100-% etikkahappoa ja 85-% maitohappoa suhteessa 1:5). Mallasuspensioita inkuboitiin 40 °C:ssa 24 h. Inkuboinnin aikana maltaan endogeeniset proteolyttiset entsyymit hydrolysoivat lähtömateriaalin prolamiineja. Saatu mallasautolysaatti pakkaskuivattiin ja varastoitettiin 5 °C:ssa, ja tätä autolysaattia käytettiin tutkimuksen lähtömateriaalina. Maltaista ja mallasautolysaateista oli määritetty vapaan aminotyypin pitoisuus ninhydriinimenetelmällä (ASBC 1992) ja prolamiinipitoisuudet kompetitiivisella R5-ELISA:lla (taulukko 4).

**Taulukko 4.** Mallasraaka-aineen ja mallasautolysaattien vapaan aminotyypin pitoisuus ja prolamiinipitoisuus. Prolamiinipitoisuus oli määritetty kompetitiivisella R5-ELISA-menetelmällä.

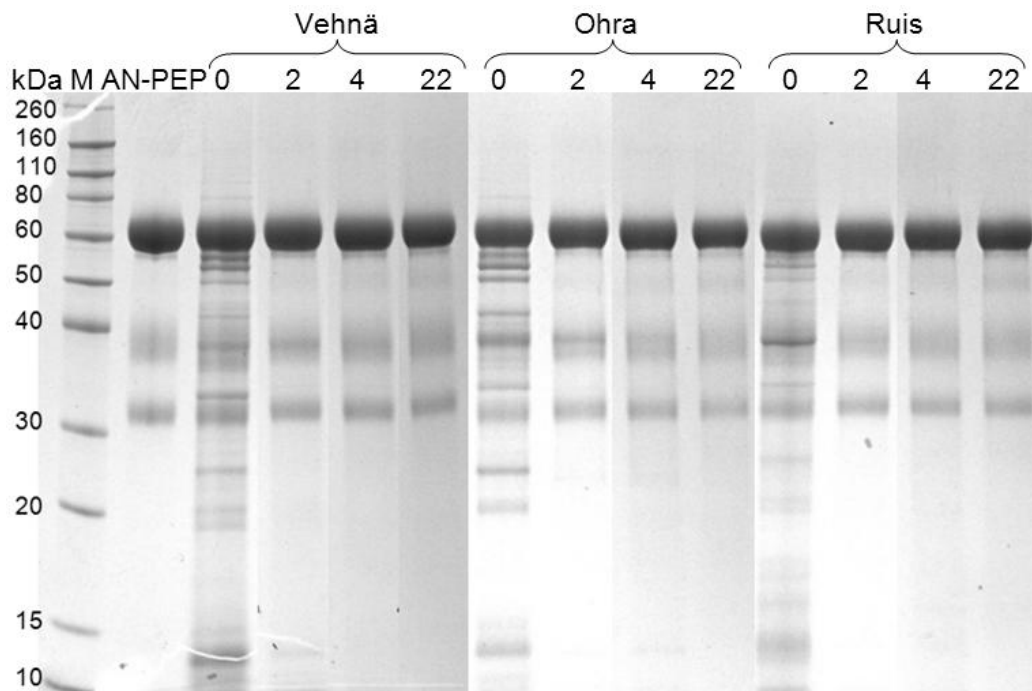
	Vapaan aminotyypin pitoisuus (g/kg)		Prolamiinipitoisuus (mg/kg)	
	Mallas	Autolysaatti	Mallas	Autolysaatti
Vehnä	0,5 ± 0,1	1,8 ± 0,3	40 000 ± 10 000	10 800 ± 2 250
Ohra	1,1 ± 0,1	2,4 ± 0,4	41 000 ± 9 500	21 000 ± 4 900
Ruis	0,7 ± 0,1	2,3 ± 0,1	35 000 ± 11 000	400 ± 200

Esikokeet ja niiden tulokset. Esikokeissa todettiin AN-PEP:in resistenssi viljamaltaiden entsyymeille. Vehnä-, ohra- ja ruismaltaiden endogeeniset entsyymit uutettiin mukailien Jonesin ym. (2000) käyttämää menetelmää. Uuttoa varten valmistettiin 100 mM natriumasettaattipuskuri sekoittamalla 8,2 g Na-asettaattia ja Milli-Q-vettä, säätämällä pH 4,5:een ja täyttämällä 1 l:n mittapullo merkkiin vedellä. Kutakin kuivattua mallasta punnittiin 3,0 g ja suspensoitiin Na-asettaattipuskuriin suhteessa 1:5. Uutto suoritettiin Roto-Shake Genie -ravistelijassa, 5 °C:ssa, 45 min. Uuton jälkeen kiintoaines erotettiin sentrifugoimalla 5 °C:ssa, 10 000 × g, 20 min. Sakan päällä oleva nestefaasi sisälsi mallasentsyymit. Kukin uutto suoritettiin kahtena rinnakkaisena.

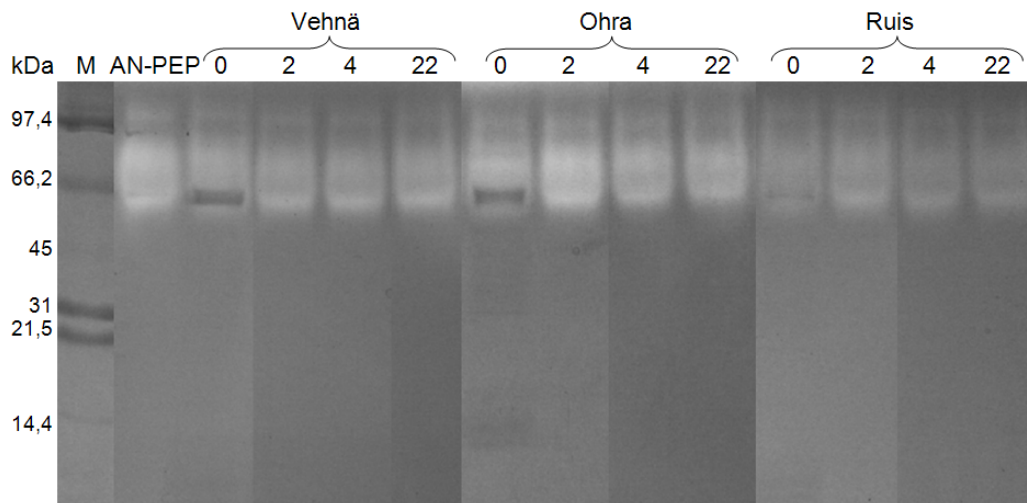
AN-PEP:in stabiilisuuden tutkimiseksi kuhunkin entsyymiutteeeseen 5 µl sekoitettiin AN-PEP:ia suhteessa 1:200. Seosta inkuboitiin jatkuvassa sekoituksessa AN-PEP:in optimiolosuhteissa pH 4:ssä 50 °C:ssa (Edens ym. 2005). Reaktio pysäytettiin 0, 2, 6 ja 22 h kuluttua valmistamalla liuoksesta elektroforeesinäyte valmistajan ohjeen mukaan. Näytteistä suoritettiin:

- 1) elektroforeesiajo (SDS-PAGE) NuPAGE Novex® Bis-Tris 12 % -geelillä työohjeen (Sontag-Strohm 2010) ja valmistajan (Invitrogen, CA, USA) ohjeen mukaan. Natiivi AN-PEP, jonka molekyylimassa on 66 kDa (Edens ym. 2005), näkyi geelillä omana vyöhykkeenään (kuva 8). AN-PEP:in molekyylimassa ei laskenut inkuboitessa mallasentsyymien kanssa. AN-PEP ei siis hydrolysoitunut, vaan sen aktiivisuus oli todennäköisesti säilynyt. Sen sijaan 0 h -näytteessä havaittiin vielä mallasentsyymiutteen sisältämiä peptidiketjuja, jotka AN-PEP hydrolysoi kokonaan 22 h inkubointiajan edetessä.
- 2) aktiivisuusmäärittäminen zymografisesti. Aktiivisuuden säilyminen mallasentsyymi-inkubaation jälkeen osoitettiin myös Novex® Zymogram gelatiini- ja kaseinigeelillä valmistajan (Invitrogen, CA, USA) ohjeen mukaan. AN-PEP ajettiin geeliin elektroforeesilla (SDS-PAGE), jonka jälkeen renaturaatiopuskuri aktivoi AN-PEP:in uudelleen. AN-PEP:in optimiolosuhteista poiketen entsyymille annettiin toimia 40 °C:ssa, sillä kaseiini olisi saostunut korkeammassa lämpötilassa. Havaittiin, että AN-PEP:in entsyymiaktiivisuus oli säilynyt, sillä valmiiksi geeliin valettu substraatti pilkkoutui ja näkyi geelillä kirkkaana kohtana. Tulos oli selkeämmin luettavissa gelatiini- (kuva 9) kuin kaseinigeelillä.

Kukin inkubaatio ja SDS-PAGE-ajo suoritettiin kahdesti kummallakin rinnakkaisena valmistetulla entsyymiutteeella. Koska AN-PEP säilytti aktiivisuutensa, ei maltaiden entsyymiaktiivisuutta ollut tarpeen inaktivoida ennen AN-PEP-hydrolyysiä.

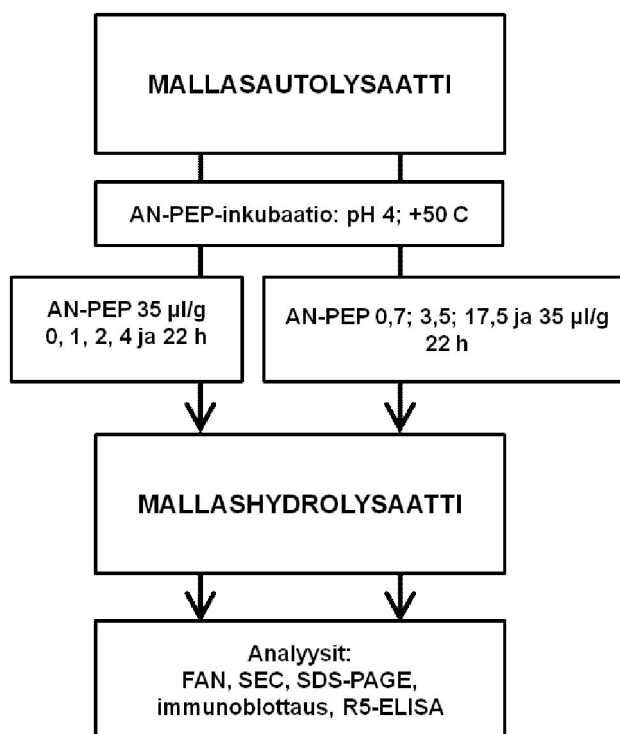


**Kuva 8.** AN-PEP ja AN-PEP:in kanssa inkuboidut vehnä-, ohra- ja ruismallasentsyymit SDS-PAGE-geelillä. Inkubaatioaika 0–22 h on merkitty geelin yläreunaan ja molekyylimassat geelin vasempaan reunaan.



**Kuva 9.** AN-PEP ja AN-PEP:in kanssa inkuboidut vehnä-, ohra- ja ruismallasentsyymit Novex® Zymogram -gelatiinigeelillä. Inkubaatioaika 0–22 h on merkitty geelin yläreunaan ja molekyylimassat geelin vasempaan reunaan.

### 3.2.2 Mallasautolysaattien jatkohydrolyysi AN-PEP-entsyymillä



**Kuva 10.** Prosessikaavio mallasautolysaattien hydrolyysistä AN-PEP-entsyymivalmistella mallashydrolysaateiksi ja hydrolysaateille suoritettua analyysit.

Kemiallisella inkubaatiolla valmistetun mallasautolysaatin jäännösprolamiinia hydrolysoitiin edelleen AN-PEP-entsyymivalmistella (kuva 10). Kierrekorkilla suljettaviin 20 ml:n viaalipulloihin punnittiin 0,4 g mallasautolysaattia, joka suspensoitiin 100 mM natriumasetaatipuskuriin (pH 4,0) suhteessa 1:10 (w/v). Suspensioon lisättiin 35 µl AN-PEP-valmistetta / 1,0 g autolysaattia. Seoksia inkuboitettiin pH 4:ssä, 50 °C:ssa jatkuvassa sekoituksessa 0, 1, 2, 4 ja 22 h.

Ruismallashydrolysaatteja valmistettiin myös eri AN-PEP-määrillä, jotta voitiin tehdä havaintoja AN-PEP-tason vaikutuksesta prolamiinien proteolyttiseen pilkkoutumiseen. Hydrolysaatit valmistettiin kuten edellä, mutta tässä kokeessa AN-PEP:ia lisättiin 35; 17,5; 3,5 ja 0,7 µl / 1,0 g autolysaattia. Natriumasetaatipuskurin määrää säädettiin siten, että mallasautolysaatin ja nesteosan suhde säilyi samana kuin edellä. Seoksia inkuboitettiin 2 ja 22 h.

Hydrolyysi pysäytettiin neutraloimalla suspensiot 4 N natriumhydroksidilla ja pakastamalla näytteet välittömästi. Näytteet, joiden inkubaatioaika oli 0 h, valmistettiin pipetoimalla AN-PEP:ia mallasuspensioon, mutta pysäyttämällä hydrolyysi heti entsyymien lisäämisen jälkeen. Kahtena rinnakkaisena valmistetut mallashydrolysaatit pakkaskuivattiin viaali-

pulloissaan. Kuivaamisen jälkeen näytteet jauhettiin lasisauvalla ja varastoitettiin eksikkatorissa 5 °C:ssa.

### 3.2.3 Hydrolysaatin ominaisuuksien määrittäminen

Proteiinifraktioiden koon määrittäminen kokoekskluusiokromatografialla. Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (engl. high performance liquid chromatography HPLC) on menetelmä, jota käytetään yhdisteiden erottamiseen, tunnistamiseen ja pitoisuuksien määrittämiseen. Liikkuvaan faasiin eli ajoliuokseen liuotettu näyte ajetaan kolonnin läpi, joka on pakattu tiiviisti ns. stationaarifaasilla. Yhdisteiden erottuminen kolonnissa perustuu yhdisteiden vuorovaikutukseen kiinteän stationaarifaasin ja liikkuvan faasin välillä. Kokoekskluusiokromatografiassa (engl. size-exclusion chromatography, SEC) molekyylit erottuvat toisistaan kokonsa perusteella. Pienemmät molekyylit tunkeutuvat huokoiseen väliaineeseen ja eluoituvat hitaasti. Suuret molekyylit eivät mahdu huokosiin, vaan kulkeutuvat ajoliuoksen mukana detektorille ensimmäisenä. Molekyylin koko siis vaikuttaa sen retentioaikaan. Erottuneet yhdisteet havaitaan detektorilla, jonka avulla yhdisteitä voidaan tunnistaa ja määrittää niiden pitoisuuksia näytteessä. Mitä voimakkaampi signaali, sitä enemmän näyte sisältää kyseistä proteiinia tai peptidiä. Tässä työssä SEC-menetelmää käytettiin selvittämään mallashydrolysaattien sisältämien proteiinien ja peptidien koon jakaumaa. Määrittäminen tehtiin näytteistä, joita oli hydrolysoitu 0, 2 ja 22 h.

SEC-näytteen valmistamiseksi kutakin pakkaskuivattua mallashydrolysaattia punnittiin 40 mg 0,5 ml:n eppendorffputkiin. SDS-liukoiset proteiinifraktiot uutettiin 50 mM natriumfosfaatilla (pH 6,9), joka sisälsi 1,5 % natriumlauryylisulfaattia (SDS), suhteessa 1:10 (w/v). Uutto suoritettiin huoneenlämmössä jatkuvassa sekoituksessa ravistelijassa 1 h ajan. Uuttopuskuri valmistettiin sekoittamalla 15,0 g SDS:a, 25 ml 1 M dinatriumvetyfosfaattia ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ja 25 ml 1 M natriumdivetyfosfaattia ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), johon lisättiin Milli-Q-puhdistettua vettä. Liuoksen pH säädettiin 6,9:ään 2 M kloorivetyhapolla ja liuos siirrettiin 1 l:n mittapulloon, joka täytettiin merkkiin vedellä. Sentrifugoinnin (21 °C,  $10\,000 \times g$ , 10 min) jälkeen kutakin supernatanttia otettiin 250  $\mu\text{l}$  ja laimennettiin ajoliuokseen suhteessa 1:1 (v/v). Ajoliuos oli vastaava kuin uuttoliuos sillä erotuksella, että se sisälsi vain 0,1 % SDS:a ja 20 % asetonitriiliä, ja sitä valmistettiin 2 l. Ajoliuoksen pH säädettiin 6,9:ään kuten edellä. Laimennoksen jälkeen näytteet sentrifugoitiin vielä kertaalleen kaiken mahdollisen jäljellä olevan kiintoaineksen poistamiseksi. Kierrekorkilla

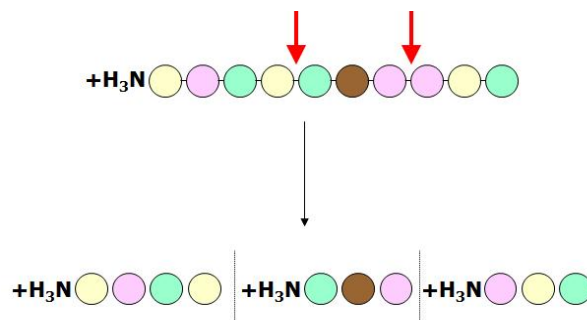
suljettaviin 2 ml:n viaalipulloihin laitettiin adapterit, joihin pipetoitiin 300 µl kutakin supernatanttia, ja molekyylikoon jakauma analysoitiin kokoelektroniokromatografilla.

SEC-kolonnit Superdex Peptide 10/300 GL ja Superdex 200 10/300 GL kytkettiin sarjaan 1200 HPLC-laitteiston kanssa proteiinien ja peptidien erottamiseksi laajalla molekyylikokoalueella. Laitteiston kanssa käytettiin useille eri aallonpituuksille soveltuvaa Multiple Wavelength -detektoria. Superdex Tandem -kolonni oli kalibroitu jo aiemmin EYT-laitoksen viljaryhmässä SEC-eluutiosta kerätyillä fraktioilla, joiden molekyyli­massat oli määritetty SDS-PAGE:lla. Tuloksia tulkittaessa hyödynnettiin näitä molekyyli­painostandardeja.

Kutakin mallashydrolysaattinäytettä injektioitiin 100 µl, virtausnopeudeksi säädettiin 0,5 ml/min ja ajo pysäytettiin automaattisesti 120 min kuluttua. Määrittäminen suoritettiin huoneenlämpötilassa ja proteiinit detektoitiin aallonpituuksilla 210 ja 280 nm. Ajamalla ensimmäinen näyte uudelleen viimeisenä ja vertaamalla kromatogrammeja varmistuttiin siitä, ettei näytteissä tapahtunut muutoksia.

Kromatogrammeja tarkasteltiin Agilent ChemStation for LC -ohjelmalla. Tulosten tulkin­nan helpottamiseksi näytteiden absorbanssikäyrät skaalattiin alkamaan tasolta 0 mAU. Kromatogrammin piikkien pinta-ala-alueet valittiin systeemin kalibroinnissa käytettyjen prolamiinipeptidien perusteella. Pinta-alatarkastelussa keskityttiin 33-meeriä ( $M_m = 3,9$  kDa) suurempiin polypeptideihin ja 9-meeriä ( $M_m = 1,1$  kDa) pienempiin pepti­deihin. Pinta-alat integrointiin em. tietokoneohjelman avulla.

Vapaan aminotyypin pitoisuuden määrittäminen. Proteiinien hydrolyysissä muodostuu vapaita aminopäitä (kuva 11). Hydrolysaatin aminotyyppiryhmien määrä on yksi keskeisimpiä proteiinien hydrolyysin parametreja. Vapaan aminotyypin muodostumisen seuranta käytetään yleisesti panimoteollisuudessa mittaamaan mäsäyksen aikana kasvavaa peptidien ja vapaiden aminohappojen pitoisuutta, sillä muodostuneet yhdisteet ovat tärkeitä hiivan kasvulle. Vapaan aminotyypin (engl. free amino nitrogen, FAN) pitoisuus voidaan mitata esimerkiksi ninhydriinimenetelmällä. Menetelmä mittaa peptideissa ja proteiineissa olevia aminohappoja, ammoniakkia sekä myös jossain määrin  $\alpha$ -aminotyyppiä. Primaariset aminoryhmät reagoivat ninhydriinin kanssa muodostaen Ruhemann-purppuran, jonka absorbanssi mitataan spektrofotometrisesti aallonpituudella 570 nm. Menetelmällä ei kuitenkaan voida mitata vapaita proliiniaminohappoja, sillä syklisen rakenteensa vuoksi proliinissa ei ole vapaita aminopäitä (ASBC 1992).



**Kuva 11.** Proteiinien hydrolyysissä muodostuu vapaita aminopäitä (+H<sub>3</sub>N) (Loponen 2008).

Pakkaskuivatun mallashydrolysaatin FAN-pitoisuuden määrittämiseksi pienet peptidit ja vapaat aminohapot uutettiin erilleen hydrolysaatin kiintoaineksesta. Kutakin hydrolysaattia punnittiin 40 mg 0,5 ml:n eppendorffputkeen. Hydrolysaatti suspensoitiin 100 mM natriumfosfaattipuskuriin (pH 8,0) suhteessa 1:10 (w/v) ja uutettiin huoneenlämmössä ravistelijassa jatkuvassa sekoituksessa 1 h ajan. Uuttopuskuri valmistettiin sekoittamalla 18,64 ml 1 M dinatriumvetyfosfaattia (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ja 1,38 ml 1 M natriumdivetyfosfaattia (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 200 ml:n mittapullossa ja täyttämällä pullo Milli-Q-puhdistetulla vedellä. Sentrifugoinnin (21 °C, 10 000 × g, 10 min) jälkeen kutakin vesiliukoisen fraktion sisältävää supernatanttia otettiin 20 µl ja laimennettiin edellä valmistettuun Na-fosfaattipuskuriin suhteessa 1:100 (v/v). Vapaan aminotypen pitoisuus uutteenä määritettiin ninhydiinimenetelmällä (ASBC 1992). Ninhydiiniliuos sisälsi 10,0 g kidevedellistä dinatriumvetyfosfaattia (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O), 6,0 g kaliumdivetyfosfaattia, 0,5 g ninhydiiniä ja 0,3 g fruktoosia 100 ml:ssa vettä. Kutakin laimennettua näytettä otettiin 200 µl ja kuumennettiin ninhydiini-väriagenssin (100 µl) kanssa 16 min lämpöblokkissa 100 °C:ssa. Kuumennuksen jälkeen näytteiden annettiin jäähtyä 20 min huoneenlämpöön, minkä jälkeen näyteliuokseen lisättiin 500 µl kaliumjodaatti-etanoliliuosta [0,2 % KIO<sub>3</sub>, 40 % (v/v) etanolissa] ja mitattiin absorbanssi spektrofotometrisesti aallonpituudella 570 nm vertailunäytettä vastaan. Standardina käytettiin glysiiniliuosta (2 mg FAN/l) ja vertailunäytteen valmistukseen vettä. Näytteet valmistettiin kummastakin rinnakkaisesta hydrolysaatista kolmena rinnakkaisena laimennoksena, joiden mittaustuloksista laskettiin keskiarvo. Vapaan aminotypen pitoisuus näytteessä laskettiin kaavalla 1, jossa A = absorbanssi:

$$FAN (g/kg) = \left( \frac{A_{570nm}näyte}{A_{570nm}standardi} \right) \cdot 2 \cdot laimennos \cdot 1000 \quad (1)$$

Proteiinien elektroforeettinen erottaminen. Pakkaskuivatuista mallashydrolysaateista uutettiin liukoiset albumiinit ja jäännöksestä SDS-liukoiset proteiinit Eremin ym. (2010) käytämällä menetelmällä. Kummankin fraktion sisältämät proteiinit eroteltiin molekyylimassan mukaan natriumlauryylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesilla (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), jonka tavoitteena oli antaa tietoa hydrolysaattien proteiinikoostumuksesta. Elektroforeesi on biokemiassa käytetty tekniikka, jossa proteiinit etenevät polyakryyliamidigeelissä sähkökentän vaikutuksesta siten, että pienemmät proteiinit liikkuvat geelissä nopeammin kuin suuret. Liikkuvuuteen vaikuttavat mm. polypeptidin pituus ja molekyylimassa sekä proteiinin laskostuminen.

*Ensimmäiseen uuttoon* punnittiin 20 mg mallashydrolysaattia, joka suspensoitiin 100 mM Na-fosfaattiin (pH 8,0) suhteessa 1:10 (w/v). Uuttopuskuri valmistettiin kuten edellä (ks. Vapaan aminotyypen pitoisuuden määrittäminen). Uutto suoritettiin huoneenlämmössä ravistelijassa 1 h ajan. Sentrifugoinnin (21 °C, 10 000 × g, 10 min) jälkeen valmistettiin näytteet sekoittamalla 50 µl liukoiset proteiinit sisältävää supernatanttia konsentroituu (2 ×) Tris-Glycine SDS-näytepuskuriin suhteessa 1:1 (v/v). Näytepuskuri valmistettiin sekoittamalla 760 mg tris(hydroksimetyyli)aminometaania, 12,5 ml glyserolia, 20 ml 10-% SDS:a, 17,5 ml milli-Q-puhdistettua vettä ja 0,05 % bromifenolisinistä, minkä jälkeen liuoksen pH säädettiin 8,5:een väkevällä kloorivetyhapolla. Lopuksi näytepuskuriin lisättiin merkaptoetanolita siten, että saatiin 10-% (v/v) liuos, joka laimeni näytteenvalmistuksessa 5 %:iin. Disulfididosten pelkistämiseksi näytettä keitettiin 2 min ajan ja analysoitiin NuPAGE Novex® Bis-Tris 12 % -geelillä valmistajan ohjeen mukaan. Ajoliuoksena käytettiin NuPAGE MOPS SDS-puskuria, johon lisättiin 500 µl NuPAGE-antioksidanttia. Ajo suoritettiin 200 V:n jännitteellä 50 min ajan ja molekyylimarkkerina käytettiin Novex Sharp Pre-Stained Protein -standardia.

*Toisessa uutossa* sakka pestiin ensin vedellä, minkä jälkeen sakan päälle lisättiin 100 µl vettä ja 110 µl Tris-Glycine SDS-näytepuskuria, joka sisälsi 10 % merkaptoetanolita. Valmiissa näytteessä merkaptoetanolipitoisuus laimeni jälleen 5 %:iin. Suspensiota inkuboitiin 30 min jatkuvassa sekoituksessa 55 °C:ssa ja sentrifugoitiin (21 °C, 10 000 × g, 10 min). Saatu nestefaasi sisälsi loput SDS-liukoiset proteiinit ja se analysoitiin kuten edellä.

Proteiinien erotuttua geelin annettiin värjäytyä huoneenlämmössä yön yli rauhallisesti sekoittaen väriliuoksessa, joka sisälsi 10 ml 0,5-% Coomassie Brilliant Blue R-250 väriainetta, 30 ml 12-% trikloorietikkahappoa ja 30 ml vettä. Värireagenssissa oli 0,5 % Serva



Blue R -väriainetta etanoliin laimennettuna. Värjäyksen jälkeen geeliä huuhdeltiin vedellä kunnes geelin tausta oli kirkas ja geelit valokuvattiin.

### 3.2.4 Hydrolysaatin prolamiinien määrittäminen

Prolamiinien tunnistaminen immunoblottausmenetelmällä. Proteiinit analysoitiin Western blot -menetelmällä käyttäen prolamiinispesifiä R5-vasta-ainetta (Osman ym. 2001). Immunoblottaus, TBST (engl. tris-buffered saline and tween) -puskurin valmistaminen ja kalvon värjäys suoritettiin työohjeen (Sontag-Strohm 2010) mukaan.

SDS-PAGE-elektroforeesin jälkeen proteiinit siirrettiin polyvinylideenifluoridikalvolle puskuriliuoksessa, joka sisälsi 5 % (v/v) konsentroitua (20 ×) Transfer Buffer -liuosta, 10 % (v/v) metanolia ja 85 % (v/v) Milli-Q-vettä. Ajoliuokseen lisättiin 40 µl NuPAGE-antioksidanttia ja ajo suoritettiin valmistajan (Invitrogen, CA, USA) ohjeen mukaan (30 V, 60 min). Kalvo blokattiin naudan seerumin albumiinilla ja inkuboitiin liuoksessa, joka sisälsi polyklonaalista Anti-Gliadin (Wheat) G-9144 -vasta-ainetta TBST-puskurissa. Inkuboinnin jälkeen kalvot pestiin ja värjättiin alkaalisilla fosfataasikonjugaateilla. Värjäyksen jälkeen kalvojen annettiin kuivua ja ne skannattiin digitaalisiksi kuviksi.

Prolamiinipitoisuuden määrittäminen R5-ELISA-menetelmällä. Mallashydrolysaattien jäännösprolamiinipitoisuutta, ja samalla siis hydrolyysin etenemistä, seurattiin kaupallisella Ridascreen® Gliadin competitive -kitillä valmistajan käyttöohjeen mukaan. ELISA-menetelmässä käytettiin R5-vasta-ainetta, joka on peroksidaasileimattu monoklonaalinen antigliadiini. Kompetitiivinen menetelmä on kehitetty proteiinihydrolysaattien ja peptidien määrittämiseen olut-, tärkkelys- ja tärkkelyssiirappinäytteistä.

Määrittystä varten mallashydrolysaateista valmistettiin erillinen etanoliuute. Mallashydrolysaattia punnittiin 125 mg ja uutettiin 60-% etanolilla (v/v), joka sisälsi 10 % kalagelatiinia, suhteessa 1:10 (w/v) 10 min ajan huoneenlämmössä ravistelijassa ylösalaisin sekoittaen. Uuton jälkeen kiintoaineseuranta sentrifugoitiin erilleen (21 °C, 10 000 × g, 10 min) ja otettiin talteen nesteosa, joka sisälsi alkoholiliukoiset prolamiinit. Määrittäminen suoritettiin valmistajan ohjeen mukaan. Liuoksen absorbanssi mitattiin spektrofotometrisesti aallonpituudella 450 nm, ja kompetitiivisessä menetelmässä absorbanssi oli käänteisesti verrannollinen näytteen prolamiinipeptidipitoisuuteen. Saadut peptidipitoisuudet jaettiin 250:llä valmistajan ohjeen mukaan, jolloin tulos saatiin muunnettua prolamiinipitoisuudeksi.

Yön yli (22 h) inkuboitujen mallashydrolysaattien prolamiinipitoisuus määritettiin myös kaupallisella Ridascreen® Gliadin -testillä eli ns. sandwich-ELISA:lla. Menetelmä on tarkoitettu vehnä-, ruis- ja/tai ohraprolamiinipitoisuuden määrittämiseen gluteenittomista tuotteista. Näytteenvalmistuksessa inkubointi pelkistävässä ns. cocktail-liuoksessa lisää uuttuvuutta, jolloin määrittämiseen saadaan mukaan myös natiiveina ei-liukoiset prolamiinit.

Kutakin pakkaskuivattua hydrolysaattia punnittiin 0,125 g 15 ml:n falcon-putkeen, johon lisättiin 1,25 ml Ridascreen Gliadin cocktail -liuosta. Saatua suspensiota inkuboitiin 50 °C:ssa 40 min. Prolamiinien uuttamiseksi kuhunkin suspensioon lisättiin 3,75 ml 80-% etanolia (v/v), minkä jälkeen hydrolysaatteja uutettiin ja sentrifugoitiin kuten edellä kompetitiivisessa määrittämisessä. Nesteosa sisälsi kaikki näytteen prolamiinit ja prolamiinipitoisuus määritettiin valmistajan ohjeen mukaan. Muodostuneen yhdisteen absorbanssi mitattiin aallonpituudella 450 nm, mutta päinvastoin kuin kompetitiivisessä määrittämisessä, saatu absorbanssi oli suoraan verrannollinen näytteen gliadiinipitoisuuteen.

Valmistajan ohjeista poiketen kummassakaan menetelmässä analyysituloksia ei kerrottu kahdella, sillä suurin osa hydrolysaattien prolamiineista oli uutto-olosuhteissa liukoisena. Sekä kompetitiivisessä että sandwich-määrittämisessä näytteet valmistettiin kummastakin rinnakkaisesta hydrolysaatista vähintään kahtena eri laimennoksena, joiden tuloksista laskettiin keskiarvo.

### **3.2.5 Tulosten tilastollinen analysointi**

Vapaan aminotyyppien ja prolamiinipitoisuuksien määrittämisessä tuloksille suoritettiin yksisuuntainen varianssianalyysi ja Tukeyn testi SPSS for Windows 15.0 -tilastolaskentaohjelmalla (©SPSS Inc. 1989–2002, IBM Corporation, Somers, NY, USA). Varianssianalyysillä haluttiin selvittää, oliko kyseisen sarjan näytteillä tilastollisesti merkitsevää ( $p < 0,05$ ) eroa vapaan aminotyyppien muodostumisessa tai prolamiinien hydrolyysissä. Tukeyn testillä tarkasteltiin yksittäisten näytteiden välisiä eroja, jolloin saatiin selville koesarjan sisällä toisistaan merkitsevästi eroavat näytteet. Kvalitatiivisten analyysien, eli kokoeksklusiokromatografian, SDS-PAGE-elektroforeesin ja immunoblottauksen tuloksia ei käsitelty tilastollisesti.

### 3.3 Tulokset

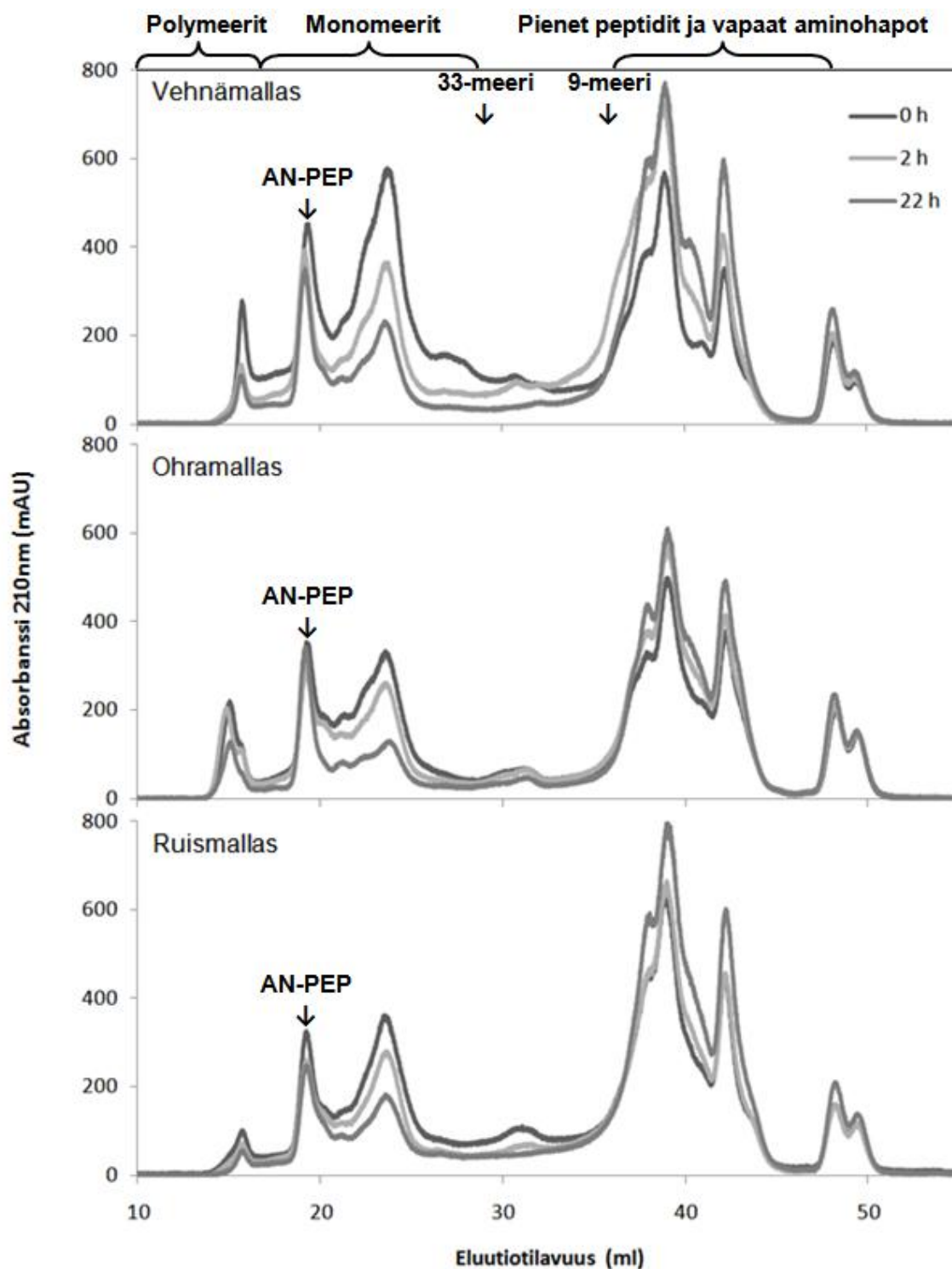
#### 3.3.1 Proteiinien pilkkoutuminen hydrolyysin aikana

Mallashydrolysaattien proteiinifraktioiden koko (SEC). Mallashydrolysaattien sisältämien proteiinien ja peptidien koon jakauman määrittämiseksi suoritettiin kokoeksklusiokromatografia 0, 2 ja 22 h inkuboitujen mallashydrolysaattien SDS-liukoista fraktioista. SEC-määrittäyksessä erikokoiset partikkelit kulkeutuivat kolonnin läpi eri nopeuksilla, jolloin ne erottuivat toisistaan molekyylikokonsa perusteella (kuva 12).

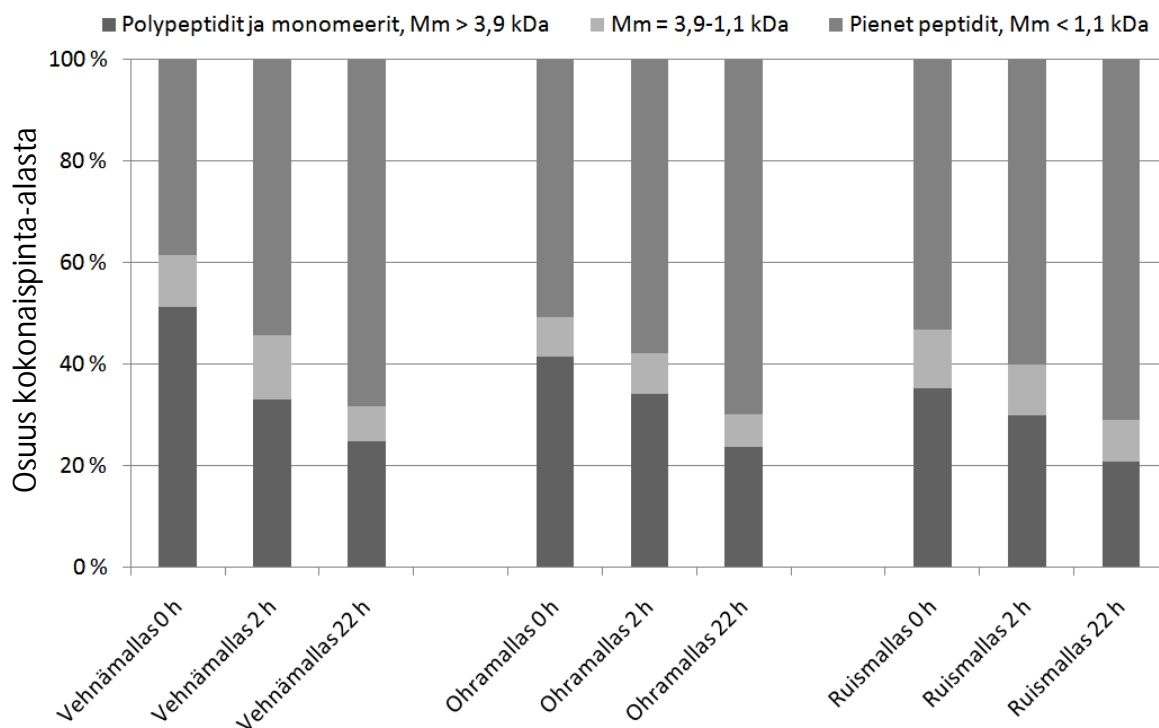
Aallonpituudella 210 nm voidaan tunnistaa ainoastaan peptidisidoksia, jolloin vapaat aminohapot tai aivan pienimmät peptidikään eivät anna signaalia. Hydrolyysin aikana tapahtunutta proteiinien ja polypeptidien pilkkoutumista ei siksi voitu havaita täysin vastaavana molekyylikooltaan pieniä yhdisteitä kuvaavien piikkien koon kasvuna. Näytteet analysoitiin myös aallonpituudella 280 nm, joka detektoi näytteen sisältämät aromaattiset aminohapot, mutta ei siis esimerkiksi hydrolyysissä mahdollisesti vapautuneita proliineja. Näitä tuloksia ei kuitenkaan esitetä tässä, sillä näytteiden väliset erot saatiin paremmin esiin 210 nm:n detektiolla.

Koska SEC-kromatogrammeissa ovat mukana kaikki näytteen proteiinit, myös viljan entsyymit ja AN-PEP, havaittiin kaikissa näytteissä AN-PEP:in (66 kDa) tuottama piikki 19 ml:n eluutiolavuuden kohdalla. Proteiini- ja peptidistandardeihin verrattuna mallashydrolysaattien eluutioprofiilit osoittivat, että inkubaatioajan edetessä 33-meeriä suurempien proteiinien ja polypeptidien määrä väheni, kun taas 9-meeriä pienempien peptidien ja aminohappojen määrä kasvoi.

Proteiinifraktioiden osuudet näytteissä saatiin laskemalla polypeptidejä ja monomeerejä sekä pieniä peptidejä vastaavien piikkien pinta-alat kustakin hydrolysaatista (kuva 13). Tarkastelu osoitti polypeptidien ja monomeerien pilkkoutumisen inkubaatioajan edetessä. Vehnämallashydrolysaateissa 33-meeriä suurempien peptidien ( $M_m > 3,9$  kDa) osuus laski pinta-alan perusteella 50 %:sta 25 %:iin. Samalla 9-meeriä pienempien peptidien ( $M_m < 1,1$  kDa) osuus kasvoi 40 %:sta 70 %:iin. Ohra- ja ruismallashydrolysaateissa suurempien peptidien osuus laski noin 40 %:sta 20 %:iin, kun taas pienten peptidien osuus kasvoi 50 %:sta 70 %:iin kokonaispinta-alasta.



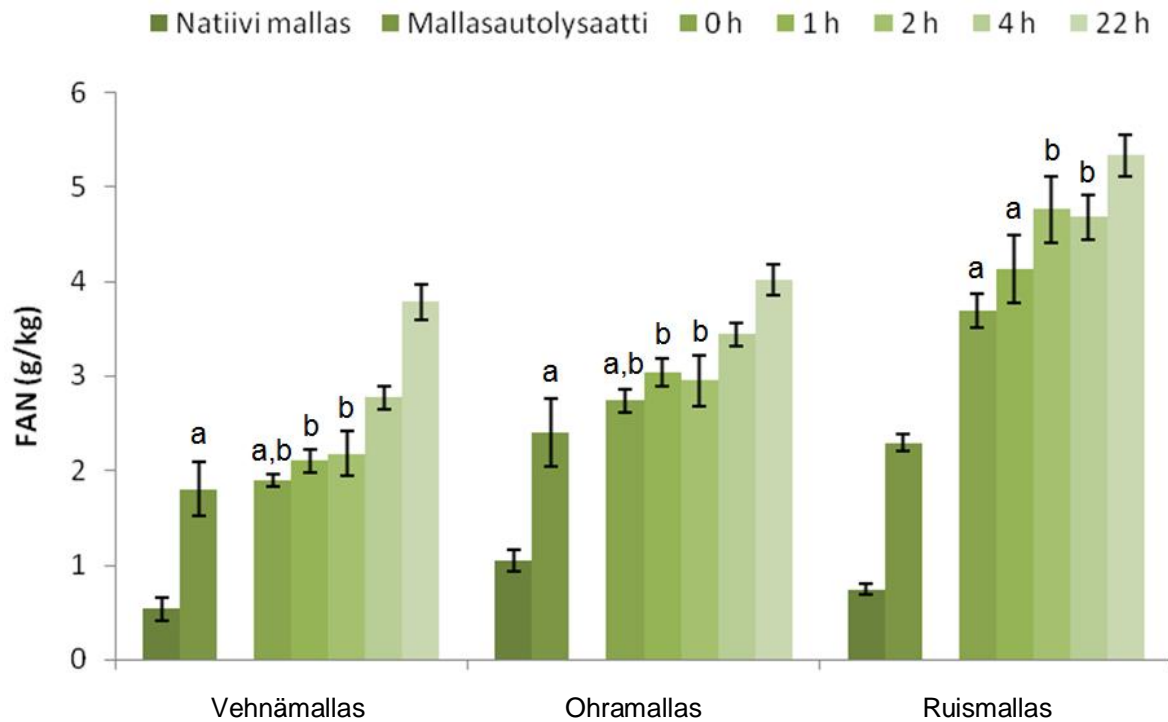
**Kuva 12.** A) Vehnä-, B) ohra- ja C) ruismallashydrolysaattien SEC-kromatogrammit. Absorbanssit detektoitiin aallonpituudella 210 nm.



**Kuva 13.** Mallashydrolysaattien liukoisten polypeptidien ja monomeerien sekä pienten peptidien koon jakauma kokoeksklusiokromatografiaan perustuen.

Vapaan aminotyypin pitoisuus (FAN). Proteiinien AN-PEP-hydrolyysin etenemistä seurattiin mittaamalla mallashydrolysaattien liukoisen fraktion vapaan aminotyypin (FAN) pitoisuutta ninhydrinimenetelmällä. FAN-pitoisuus kasvoi kaikissa hydrolysaateissa inkubointiajan edetessä. Vehnä- ja ohramallashydrolysaattien FAN-pitoisuus erosi 0 h hydrolysoiduista näytteistä merkitsevästi ( $p < 0,05$ ) jo 4 h hydrolyysin jälkeen, mutta ruismallashydrolysaateissa vasta 22 h jälkeen. FAN-pitoisuuden kasvu kuitenkin jatkui kaikissa hydrolysaateissa edelleen 4 h inkubointiajan jälkeen ( $p < 0,05$ ) (kuva 14).

FAN-pitoisuudet vaihtelivat 0 h hydrolysoiduissa näytteissä välillä 1,9–3,7 g/kg. Vehnämallashydrolysaatin FAN-pitoisuus kaksinkertaistui 22 h hydrolyysin aikana. Ohramaltaallakin se kasvoi 47 % ja ruismaltaalla 44 %. Ruismallashydrolysaattien vapaan aminotyypin pitoisuuden tasot olivat kuitenkin kauttaaltaan vehnää ja ohraa korkeammat.

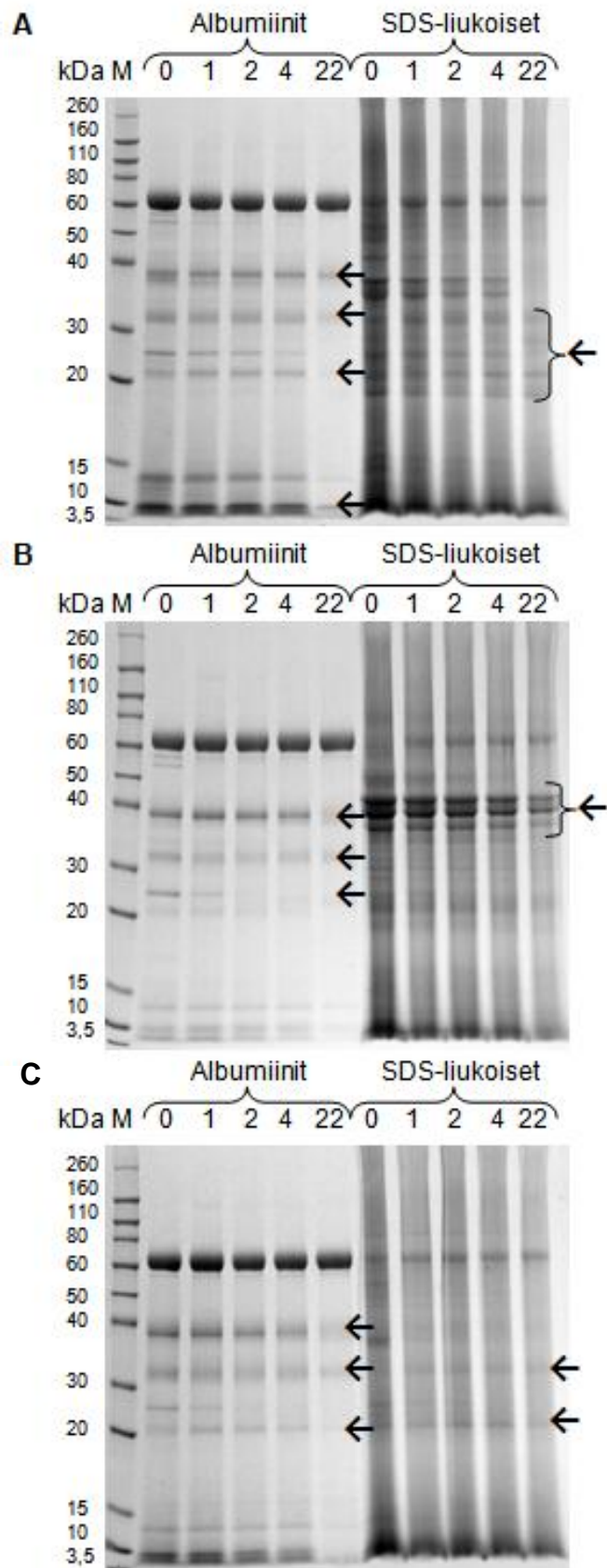


**Kuva 14.** Vapaan aminotyypen (FAN) pitoisuus natiivien maltaiden, mallasautolysaattien ja 0–22 h inkuboitujen mallashydrolysaattien liukoisessa fraktiossa ninhydriinimenetelmällä määritettynä.

<sup>a,b</sup> Näytteet, joiden perässä on sama kirjain, eivät eronneet toisistaan merkitsevästi ( $p < 0,05$ ) ko. ominaisuuden suhteen yksisuuntaisessa varianssianalyysissä, jossa rinnakkaisnäytteiden keskiarvoja verrattiin toisiinsa Tukeyn testillä.

Proteiinikoostumus (SDS-PAGE). Proteiinifraktioiden hajoamista AN-PEP-inkubaation aikana seurattiin SDS-PAGE:lla. Geelillä nähtiin kaikki näytteen proteiinit, myös mallasentsyymit ja AN-PEP (kuva 15). AN-PEP, jonka molekyylimassa on 66 kDa, näkyi kaikissa näytteissä voimakkaana, ja vyöhyke saattoi peittää alleen viljaproteiineja. Liukoinen fraktio sisälsi albumiinit ja myös muita proteiineja, kuten maltaan amylaaseja. Jäännös saattoi sisältää mm. proteiineja, jotka eivät suuren kokonsa vuoksi olleet liukoisia.

Suurin osa näytteiden proteiinivyöhykkeistä hävisi 22 h hydrolyysin aikana, mutta hydrolysaatteihin jäi myös pilkkoutumattomia proteiineja (kuva 15, nuolet). Vehnämallas-hydrolysaattien albumiinifraktioissa oli 22 h jälkeen jäljellä lähinnä n. 30–40 kDa:n ja alle 10 kDa:n kokoisia proteiineja. SDS-liukoisessa fraktiossa havaittiin hydrolyysin jälkeen 20–30 kDa:n vyöhykkeitä. Ohramallashydrolysaatin vesiliukoisista proteiineista oli hydrolyysin jälkeen jäljellä heikosti havaittavia 30–40 kDa:n proteiineja. SDS-liukoisista jäännösproteiineista voitiin edelleen 22 h jälkeen havaita molekyylikooltaan n. 40 kDa:n vyöhyke. Ruisnäytteiden vesiliukoisessa fraktiossa havaittiin heikosti 30–40 kDa:n proteiineja. SDS-liukoisista proteiineista geelillä näkyivät fraktiot kooltaan n. 20 ja 30 kDa.



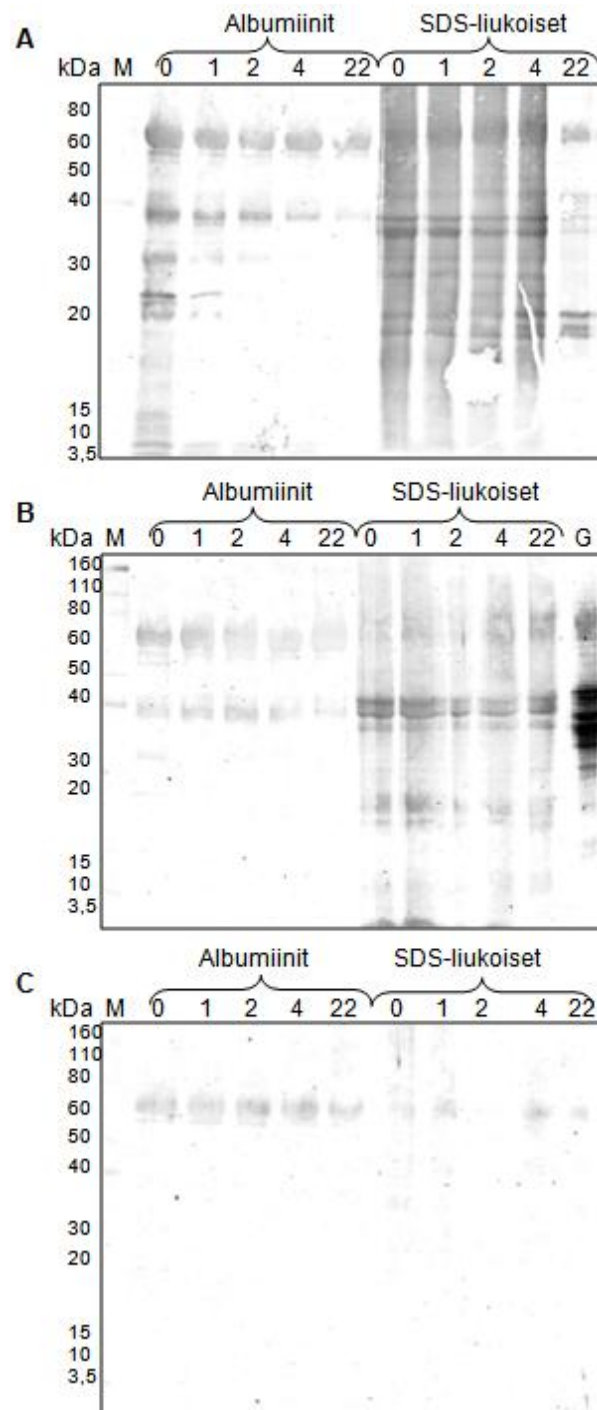
**Kuva 15.** A) Vehnä-, B) ohra- ja C) ruismallashydrolysaattien proteiinikomponentit SDS-PAGE-geelillä. Inkubaatioaika 0–22 h on merkitty geelin yläreunaan ja molekyyli-massat geelin vasempaan reunaan. Nuolet vaakatasossa osoittavat pilkkoutumattomia proteiini-fraktioita.

### 3.3.2 Prolamiinit hydrolysaatissa

Hydrolysaatin sisältämät prolamiinit (Western blot). Prolamiinien esiintymistä mallashydrolysaattien SDS-liukoissa fraktioissa tutkittiin immunoblottauksella käyttäen polyklonaalista prolamiinispesifiä vasta-ainetta. Proteiinibloteista havaittiin, että R5-vasta-aine tunnisti myös muita proteiineja kuin prolamiinit (kuva 16). AN-PEP-entsyymivalmiste toimi negatiivisena kontrollina ja AN-PEP:in värjäytyessä saattoi siis tapahtua myös muiden ei-prolamiinifraktioiden värjäytymistä. Mikäli proteiinipitoisuus näytteessä on hyvin suuri, herkkä vasta-aine voi sitoutua myös epäspesifisti. Polyklonaalinen vasta-aine voi tunnistaa prolamiinien lisäksi myös globuliineja. Blottauksia voitiin pitää vain suuntaa-antavina ja luotettavampaa tietoa näytteiden hydrolyysin jälkeen edelleen sisältämästä prolamiinista saatiin immunologisella ELISA-määrityksellä.

Prolamiinipitoisuus (R5-ELISA). Mallashydrolysaattien prolamiinipitoisuudet määritettiin prolamiinilähtöisten hydrolyysituotteiden analysointiin tarkoitetulla entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä eli kompetitiivisella R5-ELISA:lla. Prolamiinipitoisuuksien väheneminen edelleen 22 h aikapisteessä osoitti, että hydrolyysiä kannatti jatkaa 4 h hydrolyysiajan jälkeen (taulukko 5). Tarkasteltaessa mallasraaka-aineen prolamiinien suhteellista pilkkoutumista eri viljalajien välillä havaittiin, että vehnäprolamiinien hajoaminen oli suhteessa kiivainta; vehnämallasautolysaatin jäännösprolamiinista hydrolysoitui 99,7 %. Ohramallasautolysaatin jäännösprolamiinista pilkkoutui 98,1 % ja rukiilla 96,0 %. Varsinaisena prolamiinipitoisuutena pisimmälle eteni kuitenkin ruismallashydrolysaatin sekaliinien eliminaatio. Vehnämallashydrolysaatin prolamiinipitoisuus romahti jo hydrolyysin ensimmäisen tunnin aikana, kun taas ohramallashydrolysaatin sisältämien hordeiinien hydrolyysi tapahtui hitaimmin. Ohran hordeiinien pilkkoutuminen ei ollut riittävää, vaan jäljelle jäi vielä huomattava määrä R5-ELISA:lla tunnistettavia peptidejä.





**Kuva 16.** A) Vehnä-, B) ohra- ja C) ruismallashydrolysaattien immunoblottaukset liukoista ja jäännösproteiineista. Inkubaatioaika 0–22 h on merkitty geelin yläreunaan ja molekyyli-massat geelin vasempaan reunaan. G = gliadiinistandardi.

**Taulukko 5.** AN-PEP-mallashydrolysaattien prolamiinipitoisuudet kompetitiivisella R5-ELISA-menetelmällä määritettynä. \*Näytteistä, joita oli hydrolysoitu 22 h, prolamiinipitoisuus määritettiin myös sandwich-ELISA-menetelmällä.

	Prolamiinipitoisuus (mg/kg = ppm)					
	Hydrolyysiaika (h)					
	0	1	2	4	22	22*
Vehnä	14 000 ±5 000	1 000 ±200 a	800 ±300 a	Ei määr.	20 ±7	44 ±10
Ohra	16 000 ±5 000	12 000 ±3 600	7 000 ±2 000 a	5 000 ±2 000 a	340 ±92	590 ±60
Ruis	300 ±70	120 ±20 a	130 ±42 a	160 ±29	18 ±7	70 ±10

<sup>a</sup> Näytteet (1–22 h), joiden perässä on sama kirjain, eivät eronneet toisistaan (samalla rivillä olevat tulokset) merkitsevästi ( $p < 0,05$ ) ko. ominaisuuden suhteen yksisuuntaisessa varianssianalyysissä, jossa hydrolysaattien rinnakkaisnäytteiden keskiarvoja verrattiin toisiinsa Tukeyn testillä.

Koska ELISA-menetelmä on tarkoitettu gluteenittomien näytteiden analysointiin, olivat runsaasti gluteenia sisältäneiden näytteiden (natiivin maltaan, mallasautolyssaatin ja 0 h -hydrolyssaatin) tulosten hajonnat odotetusti suuret. Varianssianalyysiä voitiin siksi soveltaa vain mallashydrolysaattien väliseen prolamiinipitoisuuksien tarkasteluun ja niistäkin vain 1–22 h hydrolysoituihin näytteisiin, jotta hydrolyysiajan tilastollinen merkitsevyys saatiin näkyviin. Käsittely AN-PEP-entsyymivalmisteella laski vehnä- ja ruismallashydrolysaattien prolamiinipitoisuuksia 22 h aikana merkitsevästi ( $p < 0,05$ ) kompetitiivisella R5-ELISA:lla määritettynä. Hydrolyysillä saatiin eliminoitua lähes kaikki näytteen prolamiinit siten, että prolamiinipitoisuus laski gluteenittoman tuotteen rajalle (20 mg/kg). Ohramallashydrolysaatti sisälsi sen sijaan prolamiinia edelleen useita satoja mg/kg.

Prolamiinipitoisuus määritettiin myös sandwich-ELISA:lla 22 h hydrolysoiduista mallasautolyssaateista. Kompetitiivisen ja sandwich-menetelmän antamien tulosten eroja testattiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä ja sandwich-menetelmällä määritettiin merkitsevästi ( $p < 0,05$ ) korkeammat prolamiinipitoisuudet. Vehnä- ja ruismallashydrolysaattien prolamiinipitoisuudet jäivät kuitenkin tasolle alle 100 mg/kg tälläkin menetelmällä.

Lisäksi tutkittiin AN-PEP-pitoisuuden vaikutusta prolamiinien eliminaatioon yön yli inkuboiduissa ruismallashydrolyssaateissaen sekä kompetitiivisella että sandwich-ELISA-menetelmällä (taulukko 6). Kaikki tarkastellut AN-PEP-pitoisuudet (35–0,7 µl / g autolyssaattia) vähensivät ruismallasraaka-aineen prolamiinipitoisuutta huomattavasti ( $p < 0,05$ ) 22 h hydrolyysin aikana. Kuitenkin vain AN-PEP-pitoisuus 35 µl/g oli riittävän korkea tuottamaan ruismallashydrolyssaatin, jonka prolamiinipitoisuus oli kompetitiivisella mene-

telmällä määritettynä lähellä gluteenittoman tuotteen rajaa. Sandwich-menetelmällä mitattuna lähelle pienimmät prolamiinipitoisuudet saavutettiin AN-PEP-pitoisuuksilla 35 ja 17,5 µl/g ( $p < 0,05$ ). Kuten edellä, myös tällä kertaa sandwich-menetelmällä määritettiin suurempia prolamiinipitoisuuksia kuin kompetitiivisella menetelmällä.

**Taulukko 6.** Ruismallasautolysaatista AN-PEP-entsyymivalmisteella 22 h hydrolysoitujen näytteiden prolamiinipitoisuudet kompetitiivisella ja sandwich-R5-ELISA-menetelmällä määritettynä AN-PEP-pitoisuuksilla 35–0,7 µl / g autolysaattia.

	Prolamiinipitoisuus kuiva-ainetta kohti (mg/kg = ppm)			
	AN-PEP-valmisteen määrä (µl / g autolysaattia)			
	35	17,5	3,5	0,7
Kompetitiivinen	18 ±7	50 ±20 a	80 ±20 a	70 ±30 a
Sandwich	70 ±10 a	130 ±28 a, b	210 ±23 c	170 ±21 b, c

<sup>a-c</sup> Näytteet, joiden perässä on sama kirjain, eivät eronneet toisistaan (samalla rivillä olevat tulokset) merkitsevästi ( $p < 0,05$ ) ko. ominaisuuden suhteen yksisuuntaisessa varianssianalyysissä, jossa rinnakkaisnäytteiden keskiarvoja verrattiin toisiinsa Tukeyn testillä.

### 3.4 Pohdinta

#### 3.4.1 Prolamiinien eliminaatio mallashydrolysaateissa

Mallashydrolysaatit valmistettiin kaksivaiheisella prosessilla, jonka ensimmäisessä vaiheessa endogeeniset mallasentsyymit pilkkoivat vehnä-, ohra- ja ruismaltaan prolamiineja happamissa olosuhteissa (autolysaatti). Tämän tutkielman kokeellisessa osassa autolysaattien jäännösprolamiinien eliminaatio viimeisteltiin *Aspergillus niger*-proliiniendopeptidaasilla ja tutkimuksen tavoitteena oli tuottaa gluteenittomiin elintarvikkeisiin soveltuva mallashydrolysaatti, jonka prolamiinipitoisuus olisi enintään 100 mg/kg. Tavoite saavutettiin ja AN-PEP:in katalysoima prolamiinien eliminaatio oli erittäin tehokasta; mallasautolysaattien jäännösprolamiinista pilkkoutui yli 96 %. Pilkkoutuminen eteni pisimmälle ruismallashydrolysaatissa, jonka prolamiinipitoisuus oli kompetitiivisella R5-ELISA:lla määritettynä 18 mg/kg ja sandwich-menetelmällä 70 mg/kg. Myös vehnämallashydrolysaatin prolamiinipitoisuus laski tavoitellulle tasolle: kompetitiivisella pitoisuus oli 20 mg/kg ja sandwich-menetelmällä 44 mg/kg. AN-PEP:in optimiolosuhteissa yön yli inkuboiduilla vehnä- ja ruismallashydrolysaateilla päästiin siis ainakin alle 100 mg/kg gluteenitason, ja mahdollisesti jopa lähelle gluteenittoman tuotteen raja-arvoa. Tällaista ainesosaa voitaisiin sisällyttää keliakiaruokavalioon soveltuviin tuotteisiin, sillä gluteeniton elintarvike saa sisältää gluteenia enintään 20 mg/kg ja ns. erittäin vähägluteeninen tuote 100 mg/kg (CAC 2008).

Ohrmallashydrolysaatti sen sijaan sisälsi edelleen 22 h inkuboinnin jälkeen noin kymmenkertaisen määrän prolamiinia vehnä- ja ruismallashydrolysaatteihin verrattuna: kompetitiivisella 340 mg/kg ja sandwich-menetelmällä määritettynä 590 mg/kg. Ohran hordeiinin onkin todettu olevan hankala substraatti endopeptidaaseille sen korkeasta proliinipitoisuudesta ja erittäin kompaktista molekyyliarakenteesta johtuen (Simpson 2001). Kanervan ym. (2006) tutkimuksissa havaittiin lisäksi, että R5-vasta-aine yliarvioi prolamiinin määrän ohraa sisältävissä näytteissä. Vasta-aine sitoutuu hanakammin ohran kuin esimerkiksi vehnän prolamiineihin mahdollisesti siksi, että ohran hordeiineissa on paljon toistuvia QQPFP-sekvenssejä, joita vasta-aine tunnistaa. Jotta ohrmallashydrolysaattien jäännösprolamiinin määrästä olisi saatu todellisempi kuva, olisi sen prolamiinipitoisuus voitu määrittää hordeiinistandardia käyttäen Kanervan ym. ehdottamalla tavalla.

Hydrolyysin tehokkuus riippui AN-PEP-entsyymien annostuksesta. Sekaliinien eliminaatioon vaadittiin 35 µl entsyymiä / g autolysaattia. Laimeammilla entsyymi-

pitoisuuksilla hydrolysaatit eivät olleet gluteenittomia R5-ELISA:lla määritettynä. Suhteellisen suuren entsyymimäärän tarve saattoi selittyä entsyymaattisille reaktioille tyypillinen lopputuoteinhibitio, jossa reaktiotuotteen pitoisuuden kasvu siirtää reaktiotasapainoa ja hydrolyysi hidastuu tai lopulta pysähtyy kokonaan (Kunst 2003). Myös mm. Mitean ym. (2008a) onnistuneesti toteutetuissa farmakologisissa *in vitro*-gluteenihydrolyyseissä käytetty AN-PEP-pitoisuus oli varsin korkea, 200 mg puhdasta entsyymiä / g proteiinia. Teollisissa elintarvikeprosesseissa hydrolyysituotteiden poistaminen reaktiotasapainon kontrolloimiseksi ei yleensä onnistu, joten hydrolyysin etenemisten kannalta entsyymien riittävä määrä on tärkeä. Tässä tutkimuksessa toteutettujen mallashydrolyysien tulokset antavat viitteitä siitä, että myös AN-PEP-pillerin kliininen toimivuus voi todellakin vaatia suuria entsyymipitoisuuksia.

Korkean AN-PEP-pitoisuuden lisäksi mallashydrolysaattien prolamiinien eliminaatio vaatii suhteellisen pitkän, yli 4 h inkubaatioajan. AN-PEP:in tiedetään pilkkovan peptidi- ja proteiinisubstraatteja ensisijaisesti aminohappoketjun päistä (Edens ym. 2005; Stepniak ym. 2006; Sebela ym. 2009). Lisäksi AN-PEP pilkkoo mieluummin pitkiä substraatteja kuin esimerkiksi di- tai tripeptidejä (Edens ym. 2005). AN-PEP:in toimintatapa saattoi osaltaan selittää pitkän hydrolyysiajan välttämättömyyden prolamiinien eliminoimiseksi, sillä peptidiketjun päästä tapahtuva pilkkoutuminen on hidasta. Prolamiinien entsyymaattinen eliminaatio on jo elintarvikeprosessissakin haastavaa ja vaatii korkean entsyymipitoisuuden lisäksi pitkän hydrolyysiajan. Nämä havainnot herättävät epäilyksiä prolamiinien täydellisen eliminaation onnistumisesta PEP-pillerillä ihmisen ruoansulatuskanavan kontrolloimattomissa olosuhteissa.

Tässä tutkimuksessa prolamiinipitoisuus määritettiin kahdella eri R5-ELISA-menetelmällä. Sandwich-ELISA:lla saatiin tulokseksi korkeammat prolamiinipitoisuudet kuin kompetitiivisella menetelmällä. Kompetitiivinen menetelmä on tarkoitettu prolamiineista pilkkoutuneiden hydrolyysituotteiden määrittämiseen. Tässä tutkimuksessa voitiin olettaa jo lähtömateriaalin (autolysaatti) sisältäneen paljon pieniä, proteolyttisesti pilkkoutuneita peptidejä, joten kompetitiivista määrittystä voitiin pitää asianmukaisena valintana. Toisaalta sandwich-ELISA on virallinen menetelmä gluteenipitoisuuden määrittämiseen elintarvikkeista, eikä kompetitiivisen menetelmän etanoliuutossa uuttunut hydrolysaatin mahdollisesti edelleen sisältämiä polymeerisiä prolamiineja. Inkubointi pelkistävässä cocktail-liuoksessa irrotti prolamiinialayksiköitä toisistaan, mikä lisäsi prolamiinien uuttuvuutta. Sandwich-määrittelyyn saatiin siis mukaan myös hydrolysaatin todennäköisesti edelleen sisältämät natiiveina ei-liukoiset prolamiinit.

### 3.4.2 Hydrolyysin eteneminen

ELISA-menetelmän lisäksi mallasautolysaattien proteiinien ja peptidien hydrolyysia seurattiin vapaan aminotyypin (FAN) muodostumisena, kokoekskluusiokromatografialla (SEC) ja SDS-PAGE-elektroforeesilla. SDS-liukoisten proteiini- ja peptidifraktioiden koon määrittäminen SEC-menetelmällä perustui fraktioiden eluutioaikojen vertaamiseen molekyyli­massaltaan tunnettuihin peptidistandardeihin ja kolonnin aiempaan kalibrointiin. Aallonpituudella 210 nm voitiin tarkastella lähinnä peptidisidoksia sisältävien proteiinien ja polypeptidien määrän vähenemistä hydrolyysin edetessä. SEC-aineiston perusteella erityisesti monomeeristen fraktioiden pitoisuus väheni ja vastaavasti pienten peptidien ja aminohappojen määrä kasvoi. Vehnämallasautolysaatti sisälsi aluksi huomattavasti enemmän poly- ja monomeerisiä proteiineja kuin ohra- ja ruismallasautolysaatit. Yön yli inkuboinnin jälkeen kaikkien hydrolysaattien sisältämät polypeptidit olivat pilkkoutuneet keskenään samalle tasolle. Vehnämallasautolysaatin sisältämien proteiinien hydrolyysi oli siis suhteessa kiivainta. Myös itse AN-PEP detektoitiin hieman ennen 20 ml:n eluuti­tilavuutta. Vehnä- ja ruismallashydrolysaateissa kyseinen fraktion antama signaali heikkeni hydrolyysiajan edetessä, mutta ohramallashydrolysaateissa vastaavan signaalin voimakkuus pysyi samana. Luultavimmin kyseessä ei siis ollut entsyymien autolyysi tai hydrolyysi, vaan vehnä- ja ruismallashydrolysaatit sisälsivät todennäköisesti AN-PEP:in kanssa samankokoisia fraktioita, joiden pilkkoutuminen voitiin nähdä kromatogrammissa pienenevinä piikkeinä.

Pienten peptidien ja aminohappojen muodostumista seurattiin vapaan aminotyypin (FAN) pitoisuuden kasvuna, joka täydensi SEC-määrittelyn antamaa informaatiota. Aminotyypin määrä mittaa proteolyysin etenemistä myös esimerkiksi hapantaikinassa ja proteiinien entsyymaattisessa hydrolyysissä (Loponen ym. 2007). Biologisessa fermentaatiossa FAN-määrittelyn tulokset saattavat toisinaan olla hankalasti tulkittavissa, sillä hapantaikinassa mikro-organismit käyttävät proteiinien hydrolyysituotteita kasvuunsa, mikä luonnollisesti vaikuttaa analysoitavien hydrolyysituotteiden määrään (Tuukkanen ym. 2005). Tässä tutkimuksessa toteutetussa entsyymaattisessa AN-PEP-hydrolyysissä ei tapahtunut hydrolyysituotteiden hävikkiä, vaan FAN-määrittely osoitti proteolyysin etenemisen luotettavasti. Vapaan aminotyypin pitoisuuden kasvu ilmaisi, että pieniä hydrolyysituotteita kertyi runsaasti, mistä voitiin päätellä, että hydrolyysi oli voimakasta ja jatkui 4 h jälkeen. Pieniä peptidejä ja aminohappoja syntyi suhteessa huomattavasti enemmän ruismallasautolysaateissa kuin vehnä- tai ohramallashydrolysaateissa. Vertailtaessa mallasauto-

lysaatteja ja 0 h -näytteitä havaittiin näennäinen FAN-pitoisuuksien kasvu. Koska AN-PEP on proteiini, jo AN-PEP-valmisteen lisääminen tuotti liuokseen lisää aminopäitä, vaikka varsinaista hydrolyysiä ei olisi ehtinyt tapahtua.

Myös mallashydrolysaattien proteiiniuutteiden SDS-PAGE-määritys osoitti, että suuri osa viljaproteiineista hydrolysoitui. Molekyyli massasojensa puolesta vehnämallashydrolysaattien SDS-liukoisessa fraktiossa näkyneet vyöhykkeet saattoivat koostua prolamiineista ja olla joko LMW-gluteniineja, gliadiineja tai HMW-gluteniinien hajoamistuotteita (Wieser ym. 1994; Shewry ja Tatham 1997). Ohran jäännösfraktio sisälsi mahdollisesti B-hordeiineja, joiden molekyylimassa on 30–50 kDa (Celus ym. 2006). AN-PEP-vyöhyke osui ohran C-hordeiinien kokoalueelle 55–80 kDa, joten se saattoi peittää alleen hydrolyysissä pilkkoutumattomia hordeiineja. Rukiin tunnettuja sekaliinifraktioita, molekyylimassaltaan 40 ja 75 kDa (Shewry ja Bechtel 2001), ei hydrolyysin jälkeen havaittu, ellei AN-PEP:in vyöhyke peittänyt sekaliinijäännöstä alleen. Koska SDS-PAGE-geelillä nähdään aina kaikki näytteen proteiinit, tehtiin proteiinien tunnistamiseksi immunoblottaus. Blottauksessa ilmeni kuitenkin vasta-aineen epäspesifiä sitoutumista, joten päätelmät hydrolysaattien sisältämien prolamiinien pilkkoutumisesta tehtiin edellä käsiteltyjen R5-ELISA-tulosten perusteella.

### 3.4.3 Prosessin tarkastelua

Viljojen endogeeniset entsyymit ovat osa perinteisiä elintarvikeprosesseja, kuten mallastus ja hapantaikinaleivonta, ja olleet siten osa ihmisten ruokavaliota jo pitkään. Ne ovat siis turvallinen ja kustannuksiltaan edullinen luontainen entsyymilähde. Mallastettujen jyvien monipuolinen entsyymivarasto pilkkoo prolamiineja tehokkaammin kuin vain yksi tai kaksi spesifiä entsyymiä (Bethune ym. 2006; Siegel ym. 2006). Lisäksi tiedetään, että viljanjyvissä on endogeenista pelkistyspotentiaalia (Suske ym. 1979), joka osaltaan edesauttaa prolamiinien pilkkoutumista.

Jokainen gluteenipeptidin pilkkoutuminen tuottaa yhden uuden amino- ja karboksyyli-terminaalin. Pilkkoutuminen vähentää suoraan gluteenipeptidin immunoreaktiivisuutta, mutta sen lisäksi syntyneet peptidit voivat olla sopivia substraatteja toisille entsyymeille. Tällaista lähestymistapaa on hyödynnetty gluteenin eliminoimiseksi entsyymiyhdistelmillä farmakologisissa sovelluksissa (Siegel ym. 2006; Tye-Din ym. 2010). Tämän tutkimuksen esikokeiden perusteella kuitenkin havaittiin, että AN-PEP hydrolysoi tehokkaasti myös mallasentsyymit, joten maltaan luontaisen proteolyyttisen aktiivisuuden hyödyntämiseksi

kaksivaiheinen prosessi oli välttämätön. Mallasentsyymien annettiin siis toimia ensin keskenään (autolysaatti), minkä jälkeen ulkopuolista rekombinanttia AN-PEP:ia käytettiin ainoastaan prolamiinien eliminaation viimeistelyyn.

Prosessia voitaisiin edelleen tehostaa hydrolyysiä optimoimalla. Optimoinnissa kannattaa ensisijaisesti pyrkiä hydrolysaatin mahdollisimman alhaiseen prolamiinipitoisuuteen, sillä useat gluteenittomien tuotteiden valmistajat vaativat käytännössä jo raaka-aineiltaan gluteenittomuutta (< 20 mg/kg). Erityisesti, kun kyseessä on keliakikoille haitallisesta lähtömateriaalista prosessoitu tuote, ei tuotevalmistajien ja kuluttajien suhtautuminen mallashydrolysaatteihin ole välttämättä varauksetonta. Korkeampi entsyymipitoisuus voisi tehostaa prolamiinien pilkkoutumista, mutta se toisaalta nostaa hydrolysaatin tuotantokustannuksia. Panimoteollisuudessa on kuitenkin käytössä AN-PEP:in kanssa ilmeisesti erittäin samankaltainen Brewers Clarex -valmiste (DSM Food Specialties 2011), joten myös *A. niger* -proliiniendopeptidaasin voidaan olettaa olevan kohtuuhintainen. Toisaalta myös inkubaatioajan lyhentäminen olisi edullista sekä kustannussyistä että hydrolysaatin mikrobiologisen turvallisuuden kannalta – vaikka matalan pH:n ansiosta inkubaatio-olosuhteet eivät alkujaankaan olleet otollisia mikrobikontaminanttien kasvuun. Toistaiseksi näyttää siltä, etteivät useimpien muiden bakteeriperäisten proliiniendopeptidaasien vaatimat olosuhteet, kuten matala optimilämpötila ja neutraali pH, soveltuisi ainakaan tämän tyyppisiin elintarviketeollisiin prosesseihin. Kirjallisuuden ja nyt saatujen tulosten perusteella AN-PEP vaikuttaa erittäin tehokkaalta entsyymiltä prolamiinien eliminaatioon, ja se on myös hyväksytty käytettäväksi elintarviketeollisissa prosesseissa.

#### **3.4.4 Mallashydrolysaatin käyttökohteita**

Ruis kuuluu keliakiaruokavaliossa vältettäviin viljoihin sen sisältämien T-solureaktion aikaansaavien aminohapposekvenssien vuoksi (Stenman ym. 2010). Suomalaiset keliakikot kuitenkin kaipaavat rukiin makua erityisesti gluteenittomiin leipiin. Keliakian esiintyvyys on kasvussa (Lohi ym. 2007) ja markkinoille kaivataan uusia, laadukkaita tuotteita. Tästä näkökulmasta ruismallashydrolysaatti on tutkimuksen kiinnostavin tuote, sillä sitä voitaisiin mahdollisesti käyttää parantamaan gluteenittomien ja erittäin vähän gluteenia sisältävien tuotteiden aromia.

Gluteeni-proteiinien hydrolyysi tuhoaa sitkon, joten vehnämallashydrolysaateilla ei saada aikaan tavanomaiselle vehnätaikinalle tyypillisiä viskoelastisia ominaisuuksia. Rukiin



leivontaominaisuudet perustuvat sitkon sijaan mm. vesiliukoisiin polysakkarideihin, arabinoksyylaaneihin, jotka vastaavat ruistaikin vedensidonnasta ja kaasunpidätyskyvystä. Sekaliinien hydrolyysi ei siis sinällään häiritse perinteistä ruisleivontaa. Mallashydrolysaatin jatkokäytön suhteen on kuitenkin huomioitava, että jo lähtömateriaalina käytetty mallasraaka-aine sisälsi muutakin kuin ainoastaan proteolyttista entsyymiaktiivisuutta. Esimerkiksi hapantaikinafermentaatiossa rukiin endogeeniset entsyymit pilkkovat arabinoksyylaaneja arabinoosiksi ja ksyloosiksi (Loponen ym. 2009), mikä saattaa jonkin verran heikentää rukiin leivontaominaisuuksia. Tärkkelykseen perustuvissa gluteenittomissa leivontasovelluksissa raaka-aineiden mahdollinen amylolyttinen aktiivisuus voi olla haitallista ja siksi inaktivoitava.

Mallashydrolysaattien kohdalla mielenkiinto kohdistuu leivän rakenneominaisuuksien sijaan hydrolyysituotteisiin. Proteiinien hydrolyysissä syntyneet pienet peptidit ja etenkin vapaat aminohapot toimivat aromiyhdisteiden esiasteina hapantaikinaleivonnassa (Thiele ym. 2002; Hansen ja Schieberle 2005). Voidaan siis olettaa, että AN-PEP-hydrolyysissä syntyneet pilkkoutumistuotteet toimisivat samoin. Erittäin vähägluteenista ruismallashydrolysaattia voitaisiin mahdollisesti käyttää tuomaan rukiista aromia gluteenittomiin elintarvikkeisiin. Gluteenittoman leivonnan lisäksi sovelluskohteita voisivat olla esimerkiksi aamiaismuro- tai myslivalmisteet, joissa tällä hetkellä käytetään ohramallasuutetta vastaavassa tarkoituksessa. Kaikki valmistajat eivät kuitenkaan takaa ohramallasuutensa gluteenittomuutta, mikä on rajannut suuren osan tuotteista pois keliakiaruokavaliota noudattavien ulottuville. Elintarvikkeen muut gluteenittomat ainesosat kuitenkin laimentaisivat erittäin vähägluteenisen ruismallashydrolysaatin edelleen sisältämän jäännösprolamiinipitoisuuden (alle 100 mg/kg) sellaiselle tasolle, että lopputuote voitaisiin merkitä gluteenittomaksi. Mikäli tuotteisiin olisi mahdollista lisätä hydrolysaattia sellaisenaan, voitaisiin lisäarvoa tuoda maun lisäksi myös täysjyvärukiin terveysvaikutuksilla.

Proteiinien hydrolyysissä voi muodostua myös karvaita peptidejä, etenkin jos proteiinit koostuvat hydrofobisia sivuketjuja sisältävistä aminohapoista (Ney 1971). Karvaan maun muodostuminen on todennäköistä, mikäli hydrofobinen aminohappo sijaitsee peptidin terminaalipäässä tai erityisesti sen molemmissa päissä (Matoba ja Hata 1972). Triticeae-prolamiineissa on runsaasti glutamiinia ja proliinia (Wieser ym. 1988; Shewry 1995; Stern ym. 2001), joista proliini on melko hydrofobinen aminohappo. Lisäksi proliiniendopeptidaasit pilkkovat aminohappoketjua nimenomaan proliinin karboksyylipuolelta (Edens ym. 2005). Prolamiinit sisältävät myös erittäin hydrofobisia

aminohappoja, kuten leusiinia ja fenyylialaniinia. Miellyttävien aromiyhdisteiden esiasteina toimivien peptidien lisäksi mallashydrolysaateissa voi siis syntyä myös ei-toivottuja, karvaita yhdisteitä. Toisaalta *A. niger* -proliiniendopeptidaasi on osoittautunut tehokkaaksi nimenomaan proteiinihydrolysaattien karvauuden poistamisessa vähentämällä hydrofobisten peptidien määrää; C-terminaalissa proliini ei tuota karvasta makua (Edens ym. 2005). Kaikenkaikkiaan on siis epätodennäköistä, että hydrolysaateissa korostuisi karvas maku. Gluteenittomien mallaspohjaisten aromiuutteiden hyödyntämistä on seuraavaksi kokeiltava elintarvikesovelluksissa, jolloin saadaan käsitys niiden todellisesta potentiaalista aromia tuovana ainesosana.

### 3.4.5 Turvallisuusnäkökohtia

Tutkimus osoitti vehnän ja rukiin prolamiinien laajamittaisen hydrolyysin AN-PEP-käsittelyn aikana. R5-ELISA-määritysten perusteella mallashydrolysaatteja voidaan pitää keliakikoille turvallisena ainesosana. Gluteenittomia erityisruokavaliotuotteita koskevan asetuksen mukaan tuotteen soveltuvuus keliakiaruokavalioon osoitetaan määrittämällä prolamiinipitoisuus nimenomaan ELISA-menetelmällä (CAC 2008). ELISA:lla voidaan siis todeta prolamiinipitoisuuden olevan alle tietyn rajan, mutta menetelmä ei kuitenkaan sinänsä todista tuotteen turvallisuutta keliakiaruokavaliossa.

Koska keliakiassa haitallisia epitooppeja ei tunneta täysin, on toisaalta varmistuttava, ettei haitallisten peptidien entsyymaattisissa hydrolyysissä syntynyt uusia, mahdollisesti aiemmin tuntemattomia, haitallisia peptidejä. Ennen kaupallisia sovelluksia mallashydrolysaattien soveltuvuus gluteeniyliherkkien ruokavalioon on arvioitava ja varmistettava tarvittaessa kliinisesti varsinkin, kun kyseessä on uudenlainen teknologia. Kliinisten kokeiden korvaamiseksi, tai rinnalla, mallashydrolysaattien turvallisuutta voidaan arvioida mm. *in vitro* T-solumalleissa (Marietta 2009) tai *in vivo* -menetelmin, esimerkiksi Freitagin ym. (2009) kehittämällä hiirimallilla. Ennestään kuitenkin tiedetään, että prolamiinispesifien vasta-aineiden tunnistamat sekvenssit ovat lyhyempiä (5–6 aminohappoa) kuin pienimmät tunnetut T-soluepitoopit (vähintään 9–10 aminohappoa) (Sjöström ym. 1998), joten mittaukset ELISA-määrittelyssä käytetyillä vasta-aineilla voivat jopa yliarvioida jäljellejääneiden haitallisten sekvenssien määrän. Grecon ym. (2011) suorittama 60 päivän gluteenialtistus vehnähydrolysaateilla ei aiheuttanut oireita keliakikoille, mikä edelleen viittaa hydrolysaattien turvallisuuteen. Nämä tekijät tukevat ajatusta siitä, että mallastettu ja AN-PEP-hydrolysoitu viljaraaka-aine voisi tulevaisuudessa olla hyödynnettävissä gluteeniyliherkille tarkoitetuissa tuotteissa.

## 4 PÄATELMÄT

Tämän maisterintutkielman kokeellisen tutkimuksen tavoitteena oli eliminoida happamissa olosuhteissa inkuboitujen vehnä-, ohra- ja ruismaltaiden, eli ns. mallasautolysaattien, sisältämä jäännösprolamiini proliinispesifillä *Aspergillus niger*-endopeptidaasivalmisteella. AN-PEP:in annettiin hydrolysoida mallasautolysaatteja happamissa olosuhteissa 22 h ajan, jolloin vehnä- ja ruismallashydrolysaattien prolamiinipitoisuus laski alle 100 mg/kg tason immunologisella R5-ELISA-menetelmällä määritettynä. Hydrolysaattien prolamiinipitoisuus oli mahdollisesti jopa erittäin lähellä gluteenittoman tuotteen rajaa 20 mg/kg. Hydrolysoimalla mallasautolysaatteja edelleen AN-PEP-valmisteella voidaan siis päästä erittäin alhaisiin prolamiinipitoisuuksiin. AN-PEP hydrolysoi tehokkaasti autolysaattien sisältämiä varastoproteiinifraktioita etenkin, kun entsyymien pitoisuus oli riittävän korkea, vähintään 35 µl/g. Entsyymien määrän lisääminen olisi mahdollisesti tehostanut hydrolyysiä edelleen. Myös prosessiolosuhteita optimoimalla voitaisiin mahdollisesti vähentää tarvittavaa ulkopuolisen AN-PEP-entsyymien määrää ja/tai lyhentää hydrolyysiäikää.

Keliaakikkojen määrä kasvaa, joten myös gluteenittomien tuotteiden kysyntä kasvaa. Markkinoilla olevat tuotteet ovat tyypillisesti olleet aistinvaraisilta ominaisuuksiltaan heikkolaatuisia, ja erityisesti suomalaiset keliaakikot kaipaavat rukiin makua ja aromia. Siksi biotekniselle prosessille, jolla voitaisiin luotettavasti eliminoida nimenomaan ruisraaka-aineen prolamiinit, olisi kysyntää gluteenittomia tuotteita valmistavassa teollisuudessa. Tämän tutkimuksen perusteella jännös-gluteenin entsyymaattinen eliminaatio on mahdollista. Rukiin proteiinien hydrolyysi hapantaikinafermentaation aikana on perinteinen osa ruisleivän teknologiaa, ja prolamiinien hydrolyysituotteet voivat toimia aromiyhdisteiden esias- teina leivontasovelluksissa. Vaikka maltaan amylolyyttisestä aktiivisuudesta johtuen rukiin pentosaaneihin perustuvat leivontaominaisuudet heikkenisivätkin, voisi ruismallashydrolysaatti mahdollisesti tuoda rukiin aromia gluteenittomiin elintarvikkeisiin. Jatkossa on selvitettävä millaisia peptidejä hydrolysaatteihin jää jäljelle ja arvioitava gluteenittomien mallaspohjaisten aromiuutteiden hyödyntämistä elintarvikesovelluksissa.

## LÄHDELUETTELO

- Allred LK. 2010. Recognition of gliadin and glutenin fractions in four commercial gluten assays. *J AOAC Int* 93(1):190-6.
- Alvine Pharmaceuticals Inc. 2010. Safety and efficacy of ALV003 for the treatment of celiac disease, NCT00959114. ClinicalTrials.gov. Saatavilla: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00959114>. Tulostettu: 4.5.2011.
- Arentz-Hansen H, Körner R, Molberg Ø, Quarsten H, Vader W, Kooy YM, Lundin KE, Koning F, Roepstorff P, Sollid LM, McAdam SN. 2000. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med* 191(4):603-12.
- Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg Ø, Fleckenstein B, Lundin KE, Jørgensen TJ, Jung G, Roepstorff P, Sollid LM. 2002. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* 123(3):803-9.
- Asano K, Shinagawa K, Hashimoto N. 1982. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *J Am Soc Brew Chem* 40(4):147-54.
- [ASBC] American Society of Brewing Chemists. 1992. Wort-12, Free amino nitrogen (international method). Teoksessa: *Methods of analysis of the American Society of Brewing Chemists*. 8. p. St. Paul, MN: American Society of Brewing Chemists.
- Bendickson L, Nilsen-Hamilton M. 2007. Applications. Teoksessa: Howard GC, Kaser MR, toim. *Making and using antibodies*. New York: CRC Press. s 247-72.
- Bethune MT, Strop P, Tang YY, Sollid LM, Khosla C. 2006. Heterologous expression, purification, refolding, and structural-functional characterization of EP-B2, a self-activating barley cysteine endoprotease. *Chem Biol* 13(6):637-47.
- Blanquet S, Zejdner E, Beyssac E, Meunier JP, Denis S, Havenaar R, Alric M. 2004. A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. *Pharm Res* 21(4):585-91.
- Bleukx W, Brijs K, Torrekens S, Van Leuven F, Delcour JA. 1998. Specificity of a wheat gluten aspartic proteinase. *Biochim Biophys Acta* 1387(12):317-24.
- Bone R, Silen JL, Agard DA. 1989. Structural plasticity broadens the specificity of an engineered protease. *Nature* 339(6221):191-5.
- Bottari A, Capocchi A, Fontanini D, Galleschi L. 1996. Major proteinase hydrolysing gliadin during wheat germination. *Phytochemistry* 43(1):39-44.
- Bracken SC, Kilmartin C, Wieser H, Jackson J, Feighery C. 2006. Barley and rye prolamins induce an mRNA interferon-gamma response in coeliac mucosa. *Aliment Pharmacol Ther* 23(9):1307-14.
- Cagno R, De Angelis M, Lavermicocca P, Vincenzi M, Giovannini C, Faccia M, Gobetti M. 2002. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl Environ Microbiol* 68(2):623-33.
- Campbell MK. 1995. *Biochemistry*. 2. p. New York: Saunders College Publishing. 657 s.
- Capocchi A, Cinollo M, Galleschi L, Saviozzi F, Calucci L, Pinzino C, Zandomenighi M. 2000. Degradation of gluten by proteases from dry and germinating wheat (*Triticum durum*) seeds: an in vitro approach to storage protein mobilization. *J Agric Food Chem* 48(12):6271-9.

Celus I, Brijs K, Delcour JA. 2006. The effects of malting and mashing on barley protein extractability. *J Cereal Sci* 44(2):203-11.

[CAC] Codex Alimentarius Commission. 2006. Joint FAO/WHO Food standards programme, Report of the twenty-seventh session of the codex committee on methods of analysis and sampling. Budapest: ALINORM 06/29/23:8.

[CAC] Codex Alimentarius Commission. 2008. Draft revised Codex Standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. Rooma: ALINORM 08/31/26, (Liite III), 50-1.

Cunningham DF. 1997. Proline specific peptidases. *BBA - Protein Struct Mol Enzymol* 1343(2):160-86.

De Angelis M, Coda R, Silano M, Minervini F, Rizzello CG, Cagno R, Vicentini O, Vincenzi M, Gobbetti M. 2006a. Fermentation by selected sourdough lactic acid bacteria to decrease coeliac intolerance to rye flour. *J Cereal Sci* 43(3):301-14.

De Angelis MD, Rizzello CG, Fasano A, Clemente MG, Simone CD, Silano M, Vincenzi MD, Losito I, Gobbetti M. 2006b. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue. *BBA - Mol Basis Dis* 1762(1):80-93.

DSM Food Specialties. 2011. Brewers Clarex™ for savings that clearly matter. Saatavilla: [http://www.dsm.com/le/en\\_US/brewersclarex/html/home.htm](http://www.dsm.com/le/en_US/brewersclarex/html/home.htm). Tulostettu: 6.5.2011.

Dunaevsky YE, Sarbakanova ST, Belozersky MA. 1989. Wheat seed carboxypeptidase and joint action on gliadin of proteases from dry and germinating seeds. *J Exp Bot* 40(221):1323-9.

Edens L, Dekker P, Van Der Hoeven R, Deen F, De Roos A, Floris R. 2005. Extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates. *J Agric Food Chem* 53(20):7950-7.

Ehren J, Moron B, Martin E, Bethune MT, Gray GM, Khosla C. 2009. A food-grade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. *PLoS ONE* 4(7):1-10.

Ellis HJ, Rosen-Bronson S, O'Reilly N, Ciclitira PJ. 1998. Measurement of gluten using a monoclonal antibody to a coeliac toxic peptide of A gliadin. *Gut* 43(2):190-5.

[EC] Euroopan yhteisöjen komissio, asetus 41/2009. 2009. Komission asetus gluteenille intoleranteille henkilöille soveltuvien elintarvikkeiden koostumuksesta ja merkitsemisestä. Euroopan unionin virallinen lehti, L 16/3-5.

[FDA] U.S. Food and Drug Administration. 2002. GRAS Notice Inventory. Saatavilla: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=grasListing&id=89>. Tulostettu: 8.10.2010.

Fasano A. 2005. Clinical presentation of celiac disease in the pediatric population. *Gastroenterology* 128(4):S68.

Freitag TL, Rietdijk S, Junker Y, Popov Y, Bhan AK, Kelly CP, Terhorst C, Schuppan D. 2009. Gliadin-primed CD4+CD45RB<sup>low</sup>CD25<sup>2</sup> T cells drive gluten-dependent small intestinal damage after adoptive transfer into lymphopenic mice. *Gut* 8:1597-1605.

Gänzle MG, Loponen J, Gobbetti M. 2008. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends Food Sci Technol* 19(10):513-21.

García E, Llorente M, Hernando A, Méndez E. 2003. Cocktail solution versus aqueous ethanol for gluten extraction in food samples. Teoksessa: Stern M, toim. Proceedings of the 17th meeting of Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau, Saksa: Verlag Wissenschaftliche Scripten. s 35-43.

- Gass J, Ehren J, Strohmeier G, Isaacs I, Khosla C. 2005. Fermentation, purification, formulation, and pharmacological evaluation of a prolyl endopeptidase from *Myxococcus xanthus*: implications for celiac sprue therapy. *Biotechnol Bioeng* 92(6):674-84.
- Gass J, Bethune MT, Siegel M, Spencer A, Khosla C. 2007. Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology* 133(2):472-80.
- Gass J, Khosla C. 2007. Prolyl endopeptidases. *Cell Mol Life Sci* 64(3):345-55.
- Gellrich C, Schieberle P, Wieser H. 2003. Biochemical characterization and quantification of the storage protein (secalin) types in rye flour. *Cereal Chem* 80(1):102-9.
- Green PHR, Jabri B. 2003. Coeliac disease. *Lancet* 362(9381):383-91.
- Hansen A, Schieberle P. 2005. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends Food Sci Technol* 16(1-3):85-94.
- Hartmann G, Koehler P, Wieser H. 2006. Rapid degradation of gliadin peptides toxic for coeliac disease patients by proteases from germinating cereals. *J Cereal Sci* 44(3):368-71.
- Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, Khosla C. 2002. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol* 283(4):G996-1003.
- Jones BL, Marinac LA, Fontanini D. 2000. Quantitative study of the formation of endoproteolytic activities during malting and their stabilities to kilning. *J Agric Food Chem* 48(9):3898-905.
- Kahlenberg F, Hernando A, Méndez E, Mothes T. 2005. Acid treatment of gliadin - effects of recognition by antibodies and tissue transglutaminase. Teoksessa: Stern M, toim. Proceedings of the 19th meeting, Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Tübingen, Saksa: Verlag Wissenschaftliche Scripten. s 127-34.
- Kahlenberg F, Sanchez D, Lachmann I, Tuckova L, Tlaskalova H, Méndez E, Mothes T. 2006. Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides. *Eur Food Res Technol* 222(1):78-82.
- Kanerva PM, Sontag-Strohm TS, Ryöppy PH, Alho-Lehto P, Salovaara HO. 2006. Analysis of barley contamination in oats using R5 and  $\omega$ -gliadin antibodies. *J Cereal Sci* 44(3):347-52.
- Kanerva PM, Sontag-Strohm T. 2007. Problems in detecting barley prolamin contaminants in gluten-free foods by commercial ELISA kits. Teoksessa: Lookhart GL, Ng PKW, toim. 9th International Gluten Workshop, Gluten proteins 2006. San Fransisco, California, USA: American Association of Cereal Chemists, Inc (AACC). s 335-7.
- Kanerva P. 2008. Gluteenianalytiikka keliakian kannalta [luentomateriaali]. Helsinki: Helsingin yliopisto.
- Kanerva PM, Sontag-Strohm T, Brinck O, Salovaara HO. 2009. Effects of heating, reducing and alcohol concentration on the extractability of prolamins from barley, rye and wheat and the reactivity of prolamins with prolamin antibodies. Teoksessa: Stern M, toim. Proceedings of the 23rd meeting, Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Saksa: Verlag Wiss Scripten. s 75-81.
- Kanerva P, Sontag-Strohm T, Lojonen J, Salovaara H. 2010a. Deamidation of gluten proteins drastically influences the quantitative gluten analysis [abstrakti]. Teoksessa: Book of abstracts, 2nd Int Symp on Gluten-Free Cereal Products and Beverages. Tampere. s 39-40.
- Kanerva P, Sontag-Strohm T, Lojonen J, Salovaara H. 2010b. Improving accuracy in detecting gluten [abstrakti]. Teoksessa: Book of abstracts, 2nd Int Symp on Gluten-Free Cereal Products and Beverages. Tampere. s 15-6.
- Kanerva PM. 2011. Immunochemical analysis of prolamin proteins in gluten-free foods [henkilökohtainen tiedonanto].

- Kanerva P, Brinck O, Sontag-Strohm T, Salovaara H, Loponen J. 2011. Deamidation of gluten proteins and peptides decreases the antibody affinity in gluten analysis assays. *J Cereal Sci* doi:10.1016/j.jcs.2011.02.003. (painossa)
- Kasarda DD, Autran JC, Lew EJJ, Nimmo CC, Shewry PR. 1983. N-terminal amino acid sequences of  $\omega$ -gliadins and  $\omega$ -secalins. Implications for the evolution of prolamin genes. *BBA - Protein Struct M* 747(1-2):138-50.
- Keliakialiitto ry. 2009. Keliakiaruokavalio on hoidon uusi nimi [sähköinen julkaisu]. Asiantuntijaneuvoston suositukset 1/2009. Saatavilla: [http://www.keliakialiitto.fi/liitto/keliakia/asiantuntijaneuvoston\\_suosituksset/Tulostettu:4.5.2011](http://www.keliakialiitto.fi/liitto/keliakia/asiantuntijaneuvoston_suosituksset/Tulostettu:4.5.2011).
- Kilara A, Desai M. 2001. Enzymes. Teoksessa: Thorngate JH, Salminen S, Branen LA, Davidson MP, toim. *Food Additives*. 2. p. New York, USA: CRC Press.
- Kilmartin C, Wieser H, Abuzakouk M, Kelly J, Jackson J, Feighery C. 2006. Intestinal T cell responses to cereal proteins in celiac disease. *Dig Dis Sci* 51(1):202-9.
- Kirkman MA, Shewry PR, Mifflin BJ. 1982. The effect of nitrogen nutrition on the lysine content and protein composition of barley seeds. *J Sci Food Agric* 33(2):115-27.
- Kunst T. 2003. Protein modification to optimize functionality protein hydrolysates. Teoksessa: Whitaker JR, Voragen AGJ, Wong DWS, toim. *Handbook of food enzymology*. New York, USA: Marcel Dekker Inc.
- Kurppa K. 2010. Coeliac disease beyond villous atrophy, recent scientific results. *Scand J Gastroenterol* 4538.
- Lammers KM, Lu RL, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, Rallabhandi P, Shea-Donohue T, Tamiz A, Alkan S, Netzel-Arnett S, Antalis T, Vogel SN, Fasano A. 2008. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* 135(1):194-204.
- Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen K, Laurila K, Collin P, Rissanen H, Lohi O, Bravi E, Gasparin M, Reunanen A, Mäki M. 2007. Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther* 26(9):1217-25.
- Lopez M, Edens L. 2005. Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem* 53(20):7944-9.
- Loponen J, Mikola M, Katina K, Sontag-Strohm T, Salovaara H. 2004. Degradation of HMW glutenins during wheat sourdough fermentations. *Cereal Chem* 81(1):87-93.
- Loponen J. 2006. Prolamin degradation in sourdoughs [väitöskirja]. EKT-sarja 1372. Helsinki: University of Helsinki. 77 s. Saatavilla: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/elint/vk/loponen/prolamin.pdf>
- Loponen J, Sontag-Strohm T, Venäläinen J, Salovaara H. 2007. Prolamin hydrolysis in wheat sourdoughs with differing proteolytic activities. *J Agric Food Chem* 55(3):978-84.
- Loponen J. 2008. Jyvän proteolyttiset entsyymit ja niiden merkitys viljateknologian prosesseissa [luento-materiaali]. Helsinki: Helsingin yliopisto.
- Loponen J, Kanerva P, ChongGang Z, Sontag-Strohm T, Salovaara H, Gänzle MG. 2009. Prolamin hydrolysis and pentosan solubilization in germinated-rye sourdoughs determined by chromatographic and immunological methods. *J Agric Food Chem* 57(2):746-53.
- Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quarantino S, Londei M. 2003. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 362(9377):30-7.

- Marietta EV, Schuppan D, Murray JA. 2009. In vitro and in vivo models of celiac disease. *Expert Opin Drug Discov* 4(11):1113-1123.
- Marsh MN. 1992. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine, a molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 102(1):330-54.
- Marti T, Molberg Ø, Li Q, Gray GM, Khosla C, Sollid LM. 2004. Prolyl endopeptidase-mediated destruction of T cell epitopes in whole gluten: chemical and immunological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 312(1):19-26.
- Matoba T, Hata T. 1972. Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures. *Agr Biol Chem* 36(8):1423-31.
- Matysiak-Budnik T, Candalh C, Cellier C, Dugave C, Namane A, Vidal-Martinez T, Cerf-Bensussan N, Heyman M. 2005. Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* 129(3):786-96.
- Mendéz E, Carcía E, Ferre L. 2005. Competitive ELISA for detection of hydrolysed gluten and its applications. *ES* 2 239 545.
- Mentlein R. 1988. Proline residues in the maturation and degradation of peptide-hormones and neuropeptides. *FEBS Lett* 234(2):251-6.
- Mermelstein NH. 2011. Testing for gluten in foods. *Food Technol* 65(2):74-80.
- Mikola L. 1983. Germinating barley grains contain five acid carboxypeptidases with complementary substrate specificities. *BBA - Protein Struct M* 747(3):241-52.
- Mikola L. 1986. Acid carboxypeptidases in grains and leaves of wheat, *Triticum aestivum* L. *Plant Physiol* 81(3):823-9.
- Minekus M, Marteau P, Havenaar R, Huis in't Veld JHJ. 1995. A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and the small intestine. *Altern Lab Anim* 23(2):197-209.
- Mitea C, Havenaar R, Drijfhout JW, Edens L, Dekking L, Koning F. 2008a. Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut* 57(1):25-32.
- Mitea C, Kooy-Winkelaar Y, Van Veelen P, De Ru A, Drijfhout JW, Koning F, Dekking L. 2008b. Fine specificity of monoclonal antibodies against celiac disease-inducing peptides in the gluteome. *Am J Clin Nutr* 88(4):1057-66.
- Molberg Ø. 1998. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 4(8):713-7.
- Morón B, Cebolla Á, Manyani H, Álvarez-Maqueda M, Megías M, Thomas MdC, López MC, Sousa C. 2008. Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *Am J Clin Nutr* 87(2):405-14.
- Newnham ED. 2011. Does gluten cause gastrointestinal symptoms in subjects without coeliac disease? *J Gastroenterol Hepat* 132-4.
- Ney KH. 1971. Predictions of bitterness of peptides from their amino acid composition. *Z Lebensm Unters Forsch* 147:64-8.
- Osman AA, Uhlig HH, Valdes I, Amin M, Méndez E, Mothes T. 2001. A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13(10):1189-93.



- Pasini G, Simonato B, Giannattasio M, Peruffo ADB, Curioni A. 2001. Modifications of wheat flour proteins during in vitro digestion of bread dough, crumb, and crust: an electrophoretic and immunological study. *J Agric Food Chem* 49(5):2254-61.
- Piper JL, Gray GM, Khosla C. 2004. Effect of prolyl endopeptidase on digestive-resistant gliadin peptides in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 311(1):213-9.
- Polgár L. 2002. The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci* 59(2):349-62.
- Pomeranz Y, Shands HL. 1974. Food uses of barley. *Crit Rev Food Sci* 4(3):377-94.
- Posada J, Almenar J, Garcia Galindo J. 1971. A practical approach on protein stabilizers. *Proc Eur Brew Conv* 13:379-91.
- Pyle GG, Paaso B, Anderson BE, Allen DD, Marti T, Li Q, Siegel M, Khosla C, Gray GM. 2005. Effect of pretreatment of food gluten with prolyl endopeptidase on gluten-induced malabsorption in celiac sprue. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3(7):687-94.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Reviews* 62(3):597.
- R-Biopharm AG. 2007. RIDASCREEN® Gliadin competitive [tuoteinformaatio]. Darmstadt, Saksa: R-Biopharm AG.
- R-Biopharm AG. 2011. RIDASCREEN® Gliadin [tuoteinformaatio]. Darmstadt, Saksa: R-Biopharm AG.
- Rizzello CG, De Angelis M, Cagno R, Camarca A, Silano M, Losito I, Vincenzi M, Bari MD, Palmisano F, Maurano F, Gobbetti M. 2007. Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol* 73(14):4499-507.
- Robins G, Howdle PD. 2004. Advances in celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol* 20(2):95-103.
- Rubin CE, Brandborg LL, Phelps PC, Taylor HC. 1960. Studies of celiac disease. I. The apparent identical and specific nature of the duodenal and proximal jejunal lesion in celiac disease and idiopathic sprue. *Gastroenterology* 38(1):28-49.
- Scheibe B, Westermeier R. 2009. Gel electrophoresis in food analysis. Teoksessa: Semih Ö, toim. Handbook of food analysis instruments. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, Van Dijck PWM. 2002. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 59(4-5):426-35.
- Sebela M, Rehulka P, Kabrt J, Rehkova H, Ozdian T, Raus M, Franc V, Chmelik J. 2009. Identification of N-glycosylation in prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* and evaluation of the enzyme for its possible application in proteomics. *J Mass Spectrom* 44(11):1587-95.
- Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. 2002. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 297(5590):2275-9.
- Shan L, Marti T, Sollid LM, Gray GM, Khosla C. 2004. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochem J* 383:311-8.
- Shan L, Qiao SW, Arentz-Hansen H, Molberg Ø, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. 2005. Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *J Proteome Res* 4(5):1732-41.
- Shewry PR, Kreis M, Burgess SR, Parmar S, Mifflin BJ. 1983. The synthesis and deposition of the prolamin storage proteins (secalins) of rye. *Planta* 159(5):439-45.

- Shewry PR, Miflin BJ. 1985. Seed storage proteins of economically important cereals. Teoksessa: Pomeranz Y, toim. *Advances in cereal science and technology*, vol XII. St. Paul, MN, USA: American Association of Cereal Chemists Inc. s 1-81.
- Shewry PR, Tatham AS, Forde J, Kreis M, Miflin BJ. 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *J Cereal Sci* 4(2):97-106.
- Shewry PR. 1993. Barley seed proteins. Teoksessa: MacGregor AW, Bhatti RS, toim. *Barley : chemistry and technology*. St.Paul, MN: American Association of Cereal Chemists. s 131-97.
- Shewry PR. 1995. Plant storage proteins. *Biol Rev Camb Philos Soc* 70(3):375.
- Shewry PR, Tatham AS. 1997. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *J Cereal Sci* 25(3):207-27.
- Shewry PR, Tatham AS. 1999. The characteristics, structures and evolutionary relationships of prolamins. Teoksessa: Shewry PR, Casey R, toim. *Seed proteins*. Dordrecht, Hollanti: Kluwer Academic Publishers. s 11-33.
- Shewry PR, Bechtel DB. 2001. Morphology and chemistry of the rye grain. Teoksessa: Bushuk W, toim. *Rye: production, chemistry, and technology*. 2. p. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists Inc. s 90-110.
- Siebert KJ, Carrasco A, Lynn PY. 1996. Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *J Agr Food Chem USA* 44(8):1997-2005.
- Siebert KJ. 1999. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. *J Agric Food Chem* 47(2):353-62.
- Siegel M, Bethune MT, Gass J, Ehren J, Xia J, Johannsen A, Stuge TB, Gray GM, Lee PP, Khosla C. 2006. Rational design of combination enzyme therapy for celiac sprue. *Chem Biol* 13(6):649-58.
- Simpson DJ. 2001. Proteolytic degradation of cereal prolamins - the problem with proline. *Plant Sci* 161(5):825-38.
- Sjöström H, Lundin KE, Molberg Ø, Körner R, McAdam SN, Anthonsen D, Quarsten H, Noren O, Roepstorff P, Thorsby E, Sollid LM. 1998. Identification of a gliadin T cell epitope in coeliac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal T cell recognition. *Scand J Immunol* 48(2):111-5.
- Skerritt JH, Hill AS. 1990. Monoclonal-antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. *J Agric Food Chem* 38(8):1771-8.
- Skerritt JH. 1999. Depolymerization of the glutenin macropolymer during dough mixing: I. Changes in levels, molecular weight distribution, and overall composition. *Cereal Chem* 76(3):395-401.
- Sollid LM. 2002. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2(9):647-55.
- Sollid LM, Khosla C. 2005. Future therapeutic options for celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2(3):140-7.
- Sontag-Strohm T. 2010. Viljaproteiinien uutto, elektroforeettinen erotus ja immunoblottaus, ETT720 Viljakemian työt [kurssityöohje]. Helsinki: Helsingin yliopisto.
- Sorell L, Lopez JA, Valdes I, Alfonso P, Camafeita E, Acevedo B, Chirido F, Gavilondo J, Méndez E. 1998. An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis. *FEBS Lett* 439(1):46-50.

- Souliman S, Blanquet S, Beyssac E, Cardot JM. 2006. A level A in vitro/in vivo correlation in fasted and fed states using different methods: applied to solid immediate release oral dosage form. *Eur J Pharm Sci* 27(1):72-9.
- Stenman SM, Lindfors K, Korponay-Szabo I, Lohi O, Saavalainen P, Partanen J, Haimila K, Wieser H, Mäki M, Kaukinen K. 2008. Secretion of celiac disease autoantibodies after in vitro gliadin challenge is dependent on small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits. *BMC Immunol* 9(6).
- Stenman SM, Lindfors K, Venäläinen JI, Hautala A, Männistö PT, Garcia-Horsman J, Kaukovirta-Norja A, Auriola S, Mauriala T, Mäki M, Kaukinen K. 2010. Degradation of coeliac disease-inducing rye secalin by germinating cereal enzymes: diminishing toxic effects in intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 161(2):242-9.
- Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, Moester M, Ru A, Baak-Pablo R, Veelen P, Edens L, Koning F. 2006. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol* 291(4):G621-9.
- Stern M, Ciclitira PJ, Van Eckert R, Feighery C, Janssen FW, Méndez E, Mothes T, Troncone R, Wieser H. 2001. Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur J Gastroen Hepat* 13(6):741-7.
- Sturgess R, Day P, Ellis HJ, Lundin KEA, Gjertsen HA, Kontakou M, Ciclitira PJ. 1994. Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet* 343(8900):758-61.
- Suske G, Wagner W, Follmann H. 1979. NADPH-dependent thioredoxin reductase and a new thioredoxin from wheat. *Z Naturforsch C* 34(3-4):214-21.
- Tatham AS, Shewry PR, Belton PS. 1990. Structural studies of cereal prolamins, including wheat gluten. *Teoksessa: Advances in Cereal Science and Technology*. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists Inc. s 1-78.
- Tereos Syral. 2011. Functional and soluble wheat proteins. Saatavilla: [http://www.syral.com/web/syral\\_web.nsf/Page/U2D2T6Q3/Functional\\_soluble\\_wheat\\_proteins?opendocument](http://www.syral.com/web/syral_web.nsf/Page/U2D2T6Q3/Functional_soluble_wheat_proteins?opendocument)  
Tulostettu: 6.5.2011.
- Thiele C, Gänzle G, Vogel RF. 2002. Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. *Cereal Chem* 79(1):45-51.
- Thiele C, Grassl S, Gänzle M. 2004. Gluten hydrolysis and depolymerization during sourdough fermentation. *J Agric Food Chem* 52(5):1307-14.
- Tuukkanen K, Loponen J, Mikola M, Sontag-Strohm T, Salovaara H. 2005. Degradation of secalins during rye sourdough fermentation. *Cereal Chem* 82(6):677-82.
- Tye-Din JA, Anderson RP, Ffrench RA, Browne GJ, Hodsmann P, Siegel M, Botwick W, Shreeniwas R. 2010. The effects of ALV003 pre-digestion of gluten on immune response and symptoms in celiac disease in vivo. *Clin Immunol* 134(3):289-95.
- Vader LW. 2003. Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology* 125(4):1105-13.
- Valdes I, Garcia E, Llorente M, Méndez E. 2003. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15(5):465-74.
- Van De Wal Y, Kooy Y, Van Veelen P, Pen S, Mearin L, Papadopoulos G, Koning F. 1998. Cutting edge: selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol* 161(4):1585-8.

- Van Eckert R, Bond J, Rawson P, Russell A. 2009. Immunoreactivity of three gluten-detecting monoclonal antibodies to PWG gliadin. Teoksessa: Stern M, toim. Proceedings of the 23rd meeting, Working Group on Prolamin analysis and Toxicity. Tübingen, Saksa: Verlag Wissenschaftliche Scripten. s 29-33.
- Venäläinen JI, Juvonen RO, Männistö PT. 2004. Evolutionary relationships of the prolyl oligopeptidase family enzymes. *Eur J Biochem* 271(13):2705-15.
- Verwei M, Arkbage K, Havenaar R, Berg H, Witthoft C, Schaafsma G. 2003. Folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *J Nutr* 133(7):2377-83.
- Wang C, Tian ZG, Chen LY, Temelli F, Liu H, Wang YX. 2010. Functionality of barley proteins extracted and fractionated by alkaline and alcohol methods. *Cereal Chem* 87(6):597-606.
- Weegels PL, Hamer RJ, Schofield JD. 1996. Functional properties of wheat glutenin. *J Cereal Sci* 23(1):1-18.
- Wieser H, Seilmeier W, Belitz HD. 1988. Comparative investigations of partial amino acid sequences of prolamins and glutelins from cereals - VIII. Amino acid sequences of glutelin peptides. *Z Lebensm Unters Forsch* 187(1):27-34.
- Wieser H, Seilmeier W, Belitz HD. 1994. Quantitative determination of gliadin subgroups from different wheat cultivars. *J Cereal Sci* 19(2):149-55.
- Wieser H. 1995. The precipitating factor in coeliac disease. *Baill Clin Gastroenterol* 9(2):191-207.
- Wieser H, Hartmann G, Koehler P. 2007. Studies on the degradation of gluten proteins during germination of wheat. Teoksessa: Lookhart GL, NgPKW, toim. 9th International Gluten Workshop, Gluten Proteins 2006. San Fransisco, California, USA: AACC International Inc. s 208-12.
- Wieser H, Vermeulen N, Gaertner F, Vogel R. 2008. Effects of different *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains and chemical acidification regarding degradation of gluten proteins during sourdough fermentation. *Eur Food Res Technol* 226(6):1495-502.
- Wieser H, Koehler P. 2009. Is the calculation of the gluten content by multiplying the prolamins content by a factor of 2 valid? *Eur Food Res Technol* 229(1):9-13.
- Wolters VM, Wijmenga C. 2008. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *Am J Gastroenterol* 103(1):190-5.
- Yoshimoto T, Kanatani A, Shimoda T, Inaoka T, Kobuto D, Tsuru J. 1991. Prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*: cloning and sequencing of the enzyme gene. *J Biochem* 110(6):873-8.

**LIITTEET****Liite 1. Aminohappojen lyhenteet (Campbell 1995)**

Aminohappo	3-kirjaiminen lyhenne	1-kirjaiminen lyhenne
Glysiini	Gly	G
Alaniini	Ala	A
Valiini	Val	V
Leusiini	Leu	L
Isoleusiini	Ile	I
Prolini	Pro	P
Fenyylialaniini	Phe	F
Tyrosiini	Tyr	Y
Tryptofaani	Trp	W
Seriini	Ser	S
Treoniini	Thr	T
Kysteiini	Cys	C
Metioniini	Met	M
Arginiini	Arg	R
Histidiini	His	H
Lysiini	Lys	K
Asparagiinihappo	Asp	D
Glutamiinihappo	Glu	E
Asparagiini	Asn	N
Glutamiini	Gln	Q

## Liite 2. Tutkimuksessa käytetyt reagenssit ja laitteet

Käytetyt reagenssit olivat analyysilaatuisia.

### Mallasautolyysaattien valmistamisessa käytetyt reagenssit ja laitteet:

Etikkahappo (CH<sub>3</sub>COOH), Merck KGaA, Darmstadt, Saksa

Maitohappo (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>), Fluka Chemie AG, Buchs, Saksa

Ultrasentrifugimylly, Retsch ZM-200, Retsch, Haan, Saksa

### Zymografisissa määrittämisessä käytetyt reagenssit, tarvikkeet ja laitteet:

Gelatiinigeeli Novex® Zymogram 10 % Gelatin Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Kaseiinigeelit Novex® Zymogram 12 % Casein Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Ajopuskuri Tris-Glycine SDS Running Buffer, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Näytepuskuri Tris-Glycine SDS Sample Buffer, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Molekyyliammassamarkkeri SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, Bio-Rad Laboratories, USA

Zymogram Developing Buffer, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Zymogram Renaturing Buffer, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

### Elektroforeesissa käytetyt reagenssit, tarvikkeet ja laitteet:

Geelit NuPAGE Novex® Bis-Tris 12 %, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Glyseroli (HOCH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH), May & Baker Ltd, Dagenham, England

Bromifenolisininen (C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S), Merck KGaA, Darmstadt, Saksa

2-Merkaptoetanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS), Fluka Chemie AG, Buchs, Saksa

Ajopuskuri NuPAGE MOPS [3-(N-morfolino)propanisulfonihappo] SDS-puskuri, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

NuPAGE-antioksidantti, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Molekyyliammassamarkkeri Novex Sharp Pre-Stained Protein, Invitrogen, CA, USA

Elektroforeesilaitte XClee SureLock Mini Cell, Invitrogen, CA, USA

Virtalähde Power Pack 300, Bio-Rad Laboratories, USA

Väriaine Serva Blue R, Serva Feinbiochemica GmbH, Saksa

Trikloorietikkahappo (TCA,  $C_2HCl_3O_2$ ), Mallindckrodt Baker B.V., Deventer, Alankomaat

Vapaan aminotyypin määrittämisessä käytetyt reagenssit ja laitteet:

Kidevedellinen dinatriumvetyfosfaatti ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ), Merck KGaA, Darmstadt, Saksa

Kaliumdivetyfosfaatti ( $KH_2PO_4$ ), RdH Laborchemikalien GmbH & Co. KG, Seelze, Saksa

Ninhydriini ( $C_9H_6O_4$ ), Sigma, Oakville, Kanada

Fruktoosi ( $C_6H_{12}O_6$ ), Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Kaliumjodaatti ( $KIO_3$ ), Sigma-Aldrich Inc., MO, USA

Glysiini ( $C_2H_5NO_2$ ), Sigma-Aldrich Inc., MO, USA

Lämpöblokki QBD2 Grant, Grant Instruments Ltd, Cambridge, Englanti

Spektrofotometri, Perkin-Elmer Lambda UV/VIS, Perkin-Elmer, MA, USA

Tietokoneohjelma, KinLab version 2.80.02, ©1996–1999, The Perkin Elmer Corporation, MA, USA

Kokoekskluusiokromatografisissa määrittämisissä tarvittavat reagenssit ja laitteet:

Asetonitrili G Chromasolv ( $C_2H_3N$ ), Sigma-Aldrich Inc., MO, USA

Viaalipullot Autosampler Vials 2 ml, BROWN Chromatography Suppliers, Wertheim, Baden-Wuerttemberg, Saksa

Adapterit Limited Volume Inserts 0,3 ml, BROWN Chromatography Suppliers, Wertheim Baden-Wuerttemberg, Saksa

Kolonne 1, Superdex Peptide 10/300 GL, GE Healthcare Biosciences Ab, Uppsala, Ruotsi

Kolonne 2 Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare Biosciences Ab, Uppsala, Ruotsi

1200 HPLC-laitteisto, Agilent Technologies, Waldbronn, Saksa

Detektori Multiple Wavelength Detector, Hewlett Packard series 1050, Waldbronn, Saksa

Tietokoneohjelma, Agilent ChemStation for LC, Agilent Technologies 2001–2006, Waldbronn, Saksa

Immunoblottauksessa käytetyt reagenssit, tarvikkeet ja laitteet:

Polyvinylideenifluoridikalvo, Immun-Blot PVDF Membrane for protein Blotting (0,2  $\mu m$ ), Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

(20  $\times$ ) NuPAGE Transfer Buffer, Invitrogen, CA, USA

Metanoli ( $CH_3OH$ ), Mallindckrodt Baker B.V., Deventer, Alankomaat

Natriumkloridi (NaCl), Sigma-Ultra, Sigma-Aldrich Inc., MO, USA

Tween 20 (polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatti, C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>O<sub>27</sub>), Merck KGaA, München, Saksa

Kidevedellinen magnesiumkloridi (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O), RdH Laborchemikalien GmbH & Co. KG, Seelze, Saksa

Naudan seerumin albumiini (BSA), Sigma Chemical, St. Louis, USA

Polyklonaalinen Anti-Gliadin (Wheat) G-9144, Sigma-Aldrich Inc., MO, USA

Anti-Rabbit IgG (Fc) AP-konjugaatti B, Promega Corporation, Madison, WI, USA

Alkaalinen fosfataasi (AP) -konjugaatti A, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Alkaalinen fosfataasi (AP) -konjugaatti B, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Titriplex III (Na<sub>2</sub>EDTA, C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>·2H<sub>2</sub>O), Merck KGaA, Darmstadt, Saksa

Skanneri, HP Scanjet 3570C, St. Paul, MN, USA

R5-ELISA-määrittelyssä käytetyt reagenssit, tarvikkeet ja laitteet:

Kompetitiivinen R5-ELISA -analyysi, Ridascreen® Gliadin competitive, R-Biopharm, Darmstadt, Saksa

Kalagelatiini, Sigma-Aldrich, MO, USA

Sandwich R5-ELISA -analyysipaketti, Ridascreen® Gliadin, R-Biopharm, Darmstadt, Saksa

Kuoppalevyn pesulaite, Biochrom ASYS Atlantis, ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Itävalta

Kuoppalevynlukija, Labsystems Original Multiskan EX, MTX Lab Systems, Inc., Vienna, VI, USA

Tietokoneohjelma, Ascent Software version 2.6, ©1996–2002, Thermo LabSystems Oy, Kuopio

Muut käytetyt reagenssit:

Milli-Q-vesi, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA

Natriumasettaatti (CH<sub>3</sub>COONa), Merck KGaA, Darmstadt, Saksa

Natriumhydroksidi (NaOH), Merck KGaA, Darmstadt, Saksa

Kloorivetyhappo (HCl), RdH Laborchemikalien GmbH & Co. KG, Seelze, Saksa

Dinatriumvetyfosfaatti (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), RdH Laborchemikalien GmbH & Co. KG, Seelze, Saksa

Natriumdivetyfosfaatti (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Merck KGaA, Darmstadt, Saksa



Etanoli (Etax Aa,  $C_2H_5OH$ ), Altia Oyj, Rajamäki

Natriumlauryylisulfaatti (SDS,  $C_{12}H_{25}NaO_4S$ ), Sigma-Aldrich, MO, USA

Tris(hydroksimetyyli)aminometaani ( $C_4H_{11}NO_3$ ), Trisma-Base, Sigma-Aldrich Inc., MO, USA

Lisäksi käytettiin seuraavia laitteita:

Inkubaattori, Heidolph Incubator 1000, Heidolph Instruments, Swabach, Saksa

Ravistelija, Roto-Shake Genie, Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA

Kylmäsentrifugi Centrifuge 5810 R, Eppendorf Ab, Hampuri, Saksa

Pakkaskuivuri, Heto DryWinner FD8, Heto-Holmen A/S, Allerød, Tanska

Sentrifugi Eppendorf Centrifuge 5154 C, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hampuri, Saksa