

APPLICATION OF WESTERN BLOT ANALYSIS FOR DETECTION OF PROLAMIN PROTEINS IN CEREAL GRAINS AND BREAD.*Peter Socha, Barbara Mickowska, Elżbieta Mazur, Dana Urminská, Ewa Cieřlik***ABSTRACT**

Celiac disease is an inflammatory condition of the small intestine in genetically susceptible individuals caused by ingestion of wheat gluten and corresponding proteins from barley and rye. Cereal storage proteins (prolamins) are responsible for immunological response of patients with celiac disease. Prolamins are alcohol soluble fractions, namely gliadins (wheat), hordeins (barley) and secalins (rye). The main triggering factor is wheat fraction with low molecular weight (20-30 kDa) called α -gliadins. Immunochemical detection of celiac active proteins is based on reactivity of gluten-detecting antibodies with prolamins extracted from cereals. In our study, we used Western blot analysis for detection of prolamins complex in cereal grains and processed foods (breads). Western blot was carried out by polyclonal antibody raised against wheat gluten. Reaction was positive for all kind of cereal grains. The samples of wheat and spelt wheat show much more positive affinity to antibody than rye and oat. As well as for cereal grains, all samples of bread showed positive immunological reaction with used antibody. Western blot analysis with gluten polyclonal antibody is suitable method for qualitative detection of prolamins complex in cereal grains and processed foods.

Keywords: Western blot, prolamins, cereal, celiac disease

ÚVOD

Obilniny tvoria najvýznamnejšiu skupinu plodín rastlinnej výroby na celom svete, pretože sú hlavným zdrojom energie a bielkovín a tiež poskytujú mnoho ďalších nutrične významných látok. Bielkoviny obilnín sú obyčajne klasifikované na základe ich rozpustnosti na: albumíny rozpustné vo vode, globulíny rozpustné v roztokoch solí, prolamíny rozpustné v alkohole a glutelíny rozpustné v zriedených roztokoch kyselín a zásad (Ciccocioppo et al., 2005; Yalçin, 2010). Prolamíny sú zásobné bielkoviny endospermu zrna cereálií (hlavne pšenice, raže a jačmeňa), pričom tvoria až 30-50 % z celkového obsahu bielkovín (Yalçin, 2010). V pšenici sa prolamíny nazývajú gliadíny, v jačmeni hordeíny, v raži sekalíny a v ovse aveníny. Glutelíny sa v pšenici nazývajú gluteníny. Hlavný rozdiel medzi gliadínmi a glutenínmi pšenice je v analýze ich funkčnosti. Gliadíny sú monoméne polypeptidové reťazce s molekulovou hmotnosťou 30-80 kDa a gluteníny sú viaceréazcové štruktúry polypeptidov navzájom pospájané disulfidickými väzbami s molekulovou hmotnosťou 15-150 kDa (Weber et al., 2009; van Eckert et al., 2010). Vaccino et al. (2009) rozčleňujú prolamíny do troch skupín: prolamíny chudobné na síru, prolamíny bohaté na síru a vysokomolekulárne (HMW) prolamíny. Prolamíny chudobné na síru sú tvorené prevažne ω -gliadínmi, pričom obsahujú malé množstvo alebo žiadne cysteínové zvyšky. Prolamíny bohaté na síru sú tvorené prevažne α/β - a γ -gliadínmi. HMW prolamíny pozostávajú z HMW glutenínových podjednotiek. Je všeobecne známe, že prolamíny sú hlavným spúšťajúcim faktorom celiakálneho ochorenia (Hill, McMillan, 2006).

Celiakálne ochorenie je jednou z najčastejšie sa vyskytujúcich vážnych potravinových intolerancií v ekonomicky vyspelých krajinách a vzniká ako dôsledok príjmu pšeničných, ražných, jačmenných a možných ovsených produktov v spojení s genetickou

predispozíciou u detí a dospelých (Ciacci et al., 2002; Wieser, Koehler, 2008). Celiakia sa môže vyskytnúť v akomkoľvek veku, pričom klinický prejav je rôzny, od subklinických až po ťažké symptómy. Hoci ochorenie primárne poškodzuje tenké črevo, vyskytovať sa môžu rozličné gastrointestinálne a extraintestinálne manifestácie (Hill, McMillan, 2006). Jedinou efektívnou liečbou celiakálneho ochorenia je celoživotná bezlepková diéta. Pacienti musia z potravy vylúčiť všetky výrobky z cereálií, ktoré obsahujú múku z pšenice (vrátane pšenice kamut, tvrdej a špaldovej), raže, jačmeňa, triticale a ovsa (Pruska-Kędzior et al., 2008). Podľa Codex Alimentarius Commission, ktorý bol v roku 2008 zrevidovaný, sú bezlepkové potraviny (tzv. „gluten-free“) definované ako potraviny obsahujúce menej než 20 ppm ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) bielkovín z pšenice, jačmeňa, raže a/alebo akýchkoľvek ich hybridných druhov (Weber et al., 2009). Naopak, vhodnými pre potreby bezlepkovej diéty sú niektoré ďalšie plodiny, pričom najčastejšie využívanými sú kukurica, ryža a sója. V súčasnej dobe sa pre potreby bezlepkovej diéty stále väčšia pozornosť venuje využívaniu tzv. pseudocereálií, a to pre ich nízky obsah prolamínovej frakcie a naopak vysoký obsah plnohodnotných bielkovín, tukov, minerálnych a balastných látok a obsahu škrobu. Môžu sa využívať aj ako čiastočná náhrada chlebového obilia (Zingone et al., 2010).

Prolamínové bielkoviny sa vyznačujú niekoľkými unikátnymi vlastnosťami, ktoré prispievajú k ich imunogenicite. Sú bohaté na aminokyseliny prolín a glutamín. Vďaka vysokému obsahu prolínu sú prolamíny relatívne rezistentné voči proteolyze v gastrointestinálnom trakte z dôvodu nedostatočnej post-prolínovej štiepiacej aktivity. Navyše, vysoký obsah glutamínu činí z prolamínov dobrý substrát pre enzým tkanivovú transglutaminázu (tTG). Prolamínové bielkoviny sú známe aj tým, že kódujú mnoho peptidov, ktoré sú schopné stimulovať T-bunky a vrodenu imunitnú reakciu. Najznámejší je 33-merný imunodominantný gliadínový peptid pozostávajúci z 33 zvyškov aminokyselín (56-88), ktorý je po deaminácii

enzýmom tTG významným stimulátorom T-buniek (Arendt, Dal Bello, 2008).

Pšeničné gliadíny a gluteníny plnia významnú úlohu aj z hľadiska reologických vlastností cesta, pričom ich funkcia je odlišná. Hydratované gliadíny sú viac elastickejšie a menej kohézne ako gluteníny a majú predovšetkým vplyv na viskozitu (rozťažnosť) cesta. Hydratované gluteníny sú kohézne, aj elasticke a sú zodpovedné za pevnosť a elasticitu cesta (Starovičová et al., 2003; Wieser, 2007). Takto hydratované gliadíny a gluteníny majú schopnosť vytvárať súvislú lepkavú mriežkovitú štruktúru, označovanú ako lepok (glutén). Tento jav je dôležitý z hľadiska prípravy kysnutého cesta a pečených produktov (Petr et al., 2003).

Pšeničná múka, ktorá sa získava z prevažnej časti endospermu zrna pšenice, slúži k výrobe rôznych produktov, napr. chleba, cestovín a pod. Obsahuje okolo 80 % celkových bielkovín zrna, z ktorých väčšinu predstavujú lepkové bielkoviny, gliadíny a gluteníny (Shewry, Halford, 2002). Kvalitu pšeničnej múky, rovnako ako aj visko-elastické a ťažné vlastnosti pšeničného cesta determinuje práve komplex glutenínov a gliadínov (Xie et al., 2010). Za technologické vlastnosti pečených produktov, najmä chleba, sú zodpovedné opäť spomínané lepkové bielkoviny (Sciarini et al., 2010).

Dôležitým kritériom pre stanovenie prítomnosti a obsahu prolaminov v zrne cereálií je výber vhodnej analytickej metódy (Ebo, Stevens, 2001). Základnými metódami pre stanovenie prítomnosti prolaminov sú frakcionácia cereálnych bielkovín na základe ich rozdielnej rozpustnosti v rôznych rozpúšťadlách a elektroforetická separácia bielkovín v polyakrylamidových géloch, SDS-PAGE a A-PAGE (Urminská et al., 2009). Tieto metódy sú však nepostačujúce na dôkladnú analýzu prolaminového komplexu zrna cereálií a preto sa v súčasnosti čoraz viac do popredia dostávajú imunochemické metódy, ako je napr. ELISA (enzýmová imunoabsorbentná analýza) a imunoblotting po SDS-PAGE (Battais et al., 2003). Tieto metódy poskytujú dôležité informácie, ako pre medicínsky výskum, tak aj pre oblasť cereálnej chémie. Poukazujú na imunoafinitu prolaminových bielkovín k sérovým protilátkam a na vzťahy medzi štruktúrnymi vlastnosťami bielkovín a ich alergenicitou (Waga, Zientarski, 2007).

Cieľom práce bolo stanoviť vhodnosť použitia metódy Western blotu s využitím polyklonálnej anti-gluténovej protilátky na kvalitatívnu detekciu prolaminovej frakcie bielkovín zrna cereálií a na identifikáciu prolaminov v hotovom výrobku, konkrétne v chlebe.

MATERIÁL A METODIKA

Biologický materiál bol získaný z Katedry sacharidových technológií, Fakulty potravinových technológií, Poľnohospodárskej univerzity v Krakove (Poľsko).

Na analýzy boli použité:

1. zrná cereálií: pšenica letná (*Triticum aestivum L.*) – odroda Sakwa, pšenica špaldová (*Triticum spelta L.*) – odroda Schwabenkorn, odroda Jary B10 a obchodná bez špecifikácie odrody, raž siata (*Secale cereale L.*) –

odroda Amilo, ovos siaty (*Avena sativa L.*) – odroda Polar;

2. chleby z pšenice letnej (*Triticum aestivum L.*) a pšenice špaldovej (*Triticum spelta L.*): zmes pšeničnej miešanky BIO I. a BIO II. dostupná v obchodnej sieti, špaldový chlieb z odrody Oberkulmer Rothkorn, špaldový chlieb z odrody Frankienkorn a dva špaldové chleby z múky dostupnej v obchodnej sieti.

Vzorky zrn cereálií a chlebov boli zomleté na celozrnný šrot na laboratórnom mlyne.

Extrakcia bielkovín zo zrna cereálií a chlebov bola realizovaná pomocou magnetického miešadla s 15 ml rozpúšťadla na 1g vzorky po dobu 1 hod. pri laboratórnej teplote. Albumíny a globulíny boli extrahované 0,5 mol.dm⁻³ NaCl (dvakrát po sebe), zvyšky NaCl boli premyté destilovanou vodou a prolaminíny boli extrahované 70 % etanolom. Supernatant bol zakaždým centrifugovaný a prolaminíny lyofilizované.

SDS-PAGE prolaminov bola vykonaná podľa metodiky Schägger a von Jagov (Schägger, von Jagov, 1987). Elektrotransfer bielkovín na PVDF membránu ImmobilonP^{SQ} prebiehal 1,5 hod. pri 170 mA s použitím tmivého roztoku CAPS podľa postupu výrobcu (Millipore, USA). Bielkoviny na membráne boli vizualizované pomocou reverzibilnej farby Ponceau S.

Western blot bol realizovaný nasledovne:

1. blokovanie membrány 1 hod. (1% hovädzí sérový albumín v TBS; pH 7,6)
2. premytie membrány pomocou TBS 4-krát po dobu 15 min.
3. inkubácia s primárnou protilátkou 1,5 hod. (riedenie 1:1000)
4. premytie membrány pomocou TBS 5-krát po dobu 15 min.
5. inkubácia so sekundárnou protilátkou 1 hod. (riedenie 1:2000)
6. premytie membrány pomocou TBS 6-krát po dobu 15 min.
7. detekcia bielkovín na membráne pomocou 3,3'-diaminobenzidínu podľa odporúčania výrobcu (Sigma, USA)

Primárna anti-gluténová polyklonálna protilátka proti pšeničnému gluténu bola od firmy USBiological (USA) a sekundárna HRP protilátka, pripravená imunizáciou králikov, pochádzala od firmy BD Pharmingen (USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

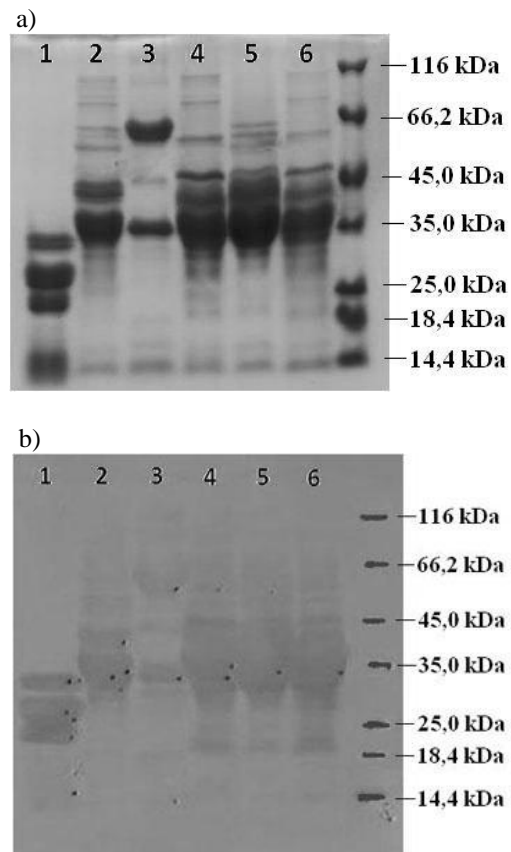
V práci boli analyzované prolaminové frakcie bielkovín, extrahované zo zrna vybraných cereálií a chlebov, a to pomocou imunologickej metódy Western blotting. Izolované prolaminíny boli separované na polyakrylamidovom géli prostredníctvom SDS-PAGE a vizualizované pomocou Coomassie Brilliant Blue. Po elektrotransfere prolaminov z gélu na PVDF membránu boli farbené reverzibilnou farbou Ponceau S. Membrána s naviazanými prolaminmi bola najprv inkubovaná s primárnou anti-gluténovou protilátkou a následne so sekundárnou protilátkou značenou enzýmom chrenovou peroxidázou. Po imunoblottingu boli prolaminíny vizualizované pomocou 3,3'-diaminobenzidínu. Fragmenty bielkovín na membráne sa porovnávali s detekovanými bielkovinami na polyakrylamidovom géli.

Analýzou vzoriek pšeníc *Triticum aestivum* a *Triticum spelta* sa zistilo, že separované prolamíny sa svojou molekulovou hmotnosťou výrazne od seba neodlišujú (obrázok 1a). V pšenici špaldovej sú fragmenty výraznejšie ako v pšenici letnej. Na základe použitého markera pre SDS-PAGE je možné stanoviť molekulové hmotnosti jednotlivých prolamínových frakcií. **Van Eckert et al. (2010)** udávajú, že molekulové hmotnosti gliadínov sú nasledovné: 32 kDa pre α -gliadíny, 38-42 kDa pre γ -gliadíny, 55-79 kDa pre ω -gliadíny. Bielkoviny s molekulovou hmotnosťou vyššou ako 90 kDa sú HMW glutenínové podjednotky. V tejto gliadínovej frakcii sú prítomné celiakálne aktívne epitopy a vo vzťahu k celiakii je najviac riziková frakcia s molekulovou hmotnosťou okolo 20-30 kDa, nazývaná α -gliadíny (**Petr et al., 2003; Urminská et al., 2009**). Práve tieto α -gliadíny sú vo veľkom množstve zastúpené ako v pšenici letnej, tak aj v troch analyzovaných vzorkách pšenice špaldovej. Pri posudzovaní reakcie blotovaných bielkovín s polyklonálnou protilátkou je možné konštatovať, že všetky prolamínové frakcie pšeníc s molekulovou hmotnosťou vyššou ako \approx 20 kDa vysoko pozitívne reagovali a boli vizualizované na membráne. Imunologická reakcia nebola pozorovaná pri frakciách s nižšou molekulovou hmotnosťou (< 20 kDa), ktoré nereagovali s protilátkou (obrázok 1b). Na základe získaných výsledkov sa potvrdilo, že pšenica (vrátane pšenice špaldovej) obsahuje vysoké koncentrácie celiakálne aktívnych bielkovín.

Prolamíny raže (*Secale cereale* L.) sa skladajú z dvoch hlavných fragmentov veľkých približne 35 kDa a 66 kDa, čo poukazuje na prítomnosť bielkovín typu α -gliadínov (35 kDa) a tiež ω -gliadínov (66 kDa), ktoré sú v pšenici menej výrazné (obrázok 1a). Prolamínové frakcie raže vykázali slabšiu afinitu k použitej polyklonálnej protilátke, ako tomu bolo v prípade pšeničných bielkovín. Napriek tomu, že bola imunologická reakcia slabšia, protilátka detegovala prítomnosť celiakálne aktívnych bielkovín aj v raži (obrázok 1b).

Ovos siaty (*Avena sativa* L.) ako jediná analyzovaná cereália obsahoval prolamínové frakcie s molekulovou hmotnosťou nižšou ako 35 kDa (obrázok 1a). Reakciou s polyklonálnou protilátkou boli aj v ovse detegované alergénne peptidy (obrázok 1b), napriek tomu, že viacerí autori (**Størsrud et al., 2003; Arentz-Hansen et al., 2004**) tvrdia, že bielkoviny ovsu nemajú epitopy, ktoré vyvolávajú celiakiu. Napríklad monoklonálna protilátka R5 používaná pri sendvičovej ELISA analýze reaguje iba s prolamínmi pšenice, jačmeňa a raže a nevykazuje žiadnu krížovú reakciu s bielkovinami ovsu a tiež kukurice, ryže, prosa, pohánky, quinoi a láskavca (**Petr et al., 2003**). Polyklonálne protilátky majú väčší počet väzobných miest pre rozpoznávanie epitopov bielkovín, čiže existuje pri nich väčšia pravdepodobnosť vzniku krížových reakcií. Podľa niektorých autorov je konzumácia čistých ovsených produktov bezpečná pre pacientov s celiakiou, kým názory ďalších autorov sú rozdielne a výrobky z ovsu vylučujú z bezpeklivej diéty. **Silano et al. (2007)** vo svojej práci uviedli, že ovos je bezpečný pre celiatikov a môže byť zahrnutý do bezpeklivej diéty. Podobne, **Janatuinen et al. (1995 a 2002)** vo svojej štúdii uviedli, že ovos bol veľmi dobre

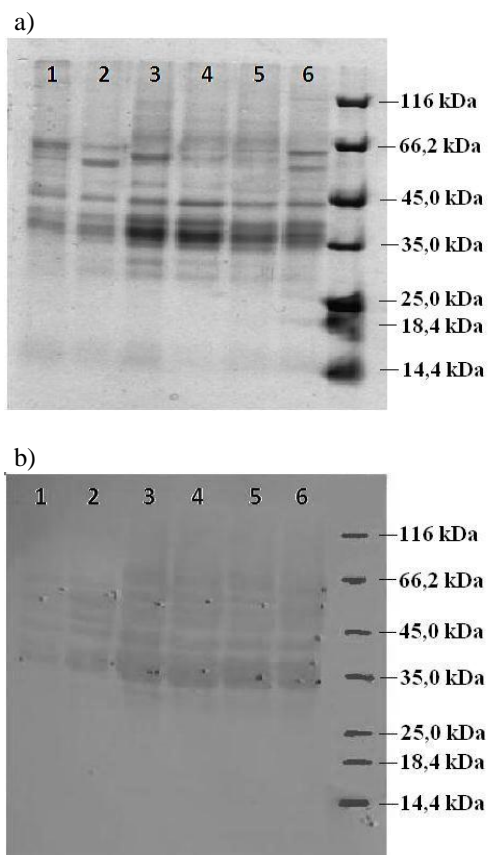
tolerovaný celiatikmi, nebol príčinou histologických zmien a neindukoval imunitnú reakciu. **Petr et al. (2003)** uvádza, že ovos môže byť zaradený do výživy celiatikov pre priaznivé zloženie bielkovinových frakcií a plnohodnotnejšie aminokyselinové zloženie ako majú bielkoviny pšenice, raže a jačmeňa. Naproti tomu, **Lundin et al. (2003)** pozorovali u niektorých pacientov s celiakiou konzumujúcich ovos čiastočnú atrofiu klkov a prítomnosť T-buniek reaktívnych voči avenínom ovsu.



Obrázok 1 (a) SDS-PAGE elektroforéza a (b) Western blot prolaminov ovsu siateho (*Avena sativa* L.), raže siatej (*Secale cereale* L.), pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) a pšenice špaldovej (*Triticum spelta* L.): 1. ovos Polar, 2. pšenica letná Sakwa, 3. raž Amilo, 4. pšenica špaldová Jary B10, 5. pšenica špaldová – obchodná, 6. pšenica špaldová Schwabenkorn.

Pomocou metódy Western blot boli analyzované aj prolamínové frakcie bielkovín v chlebe, a to v chlebe pripravenom zo zmesi múk pšenice letnej a pšenice špaldovej a chleby pripravené iba zo špaldovej múky. Elektroforetickou analýzou sa zistilo, že prolamínové fragmenty na polyakrylamidovom géli boli menej výraznejšie, a v menšom množstve, v porovnaní s prolamínmi izolovanými zo zrna cereálií (obrázok 2a). Pravdepodobnou príčinou je enzymatická hydrolyza a tepelné spracovanie počas pečenia, a tiež možná nekompletná extrakcia prolamínových bielkovín z tepelne spracovaných potravín. V chleboch z múky pšenice letnej je možné pozorovať malé množstvo slabšie viditeľných fragmentov s molekulovou hmotnosťou väčšou ako 30 kDa. V chleboch z múky pšenice špaldovej sú tieto fragmenty viditeľnejšie, výrazné sú predovšetkým peptidy s

molekulovou hmotnosťou 35-45 kDa. Reakciu s polyklonálnou protilátkou bola detekovaná prítomnosť všetkých prolaminových frakcií s molekulovou hmotnosťou väčšou ako 30 kDa, a to vo všetkých vzorkách pšeničných chlebov (obrázok 2b). Silná pozitívna imunologická reakcia bola pozorovaná aj pri frakciách prolaminov, ktoré boli slabšie separované elektroforetickým delením. Analýzy potvrdili prítomnosť celiakálne aktívnych frakcií bielkovín aj v hotových pekárenských výrobkoch, teda aj po tepelnej úprave rastlinnej suroviny.



Obrázok 2 (a) SDS-PAGE elektroforéza a (b) Western blot prolaminov extrahovaných z chlebov z pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) a pšenice špaldovej (*Triticum spelta* L.): 1. zmes pšeničnej miešanky BIO I., 2. zmes pšeničnej miešanky BIO II., 3. špaldový chlieb z odrody Oberkulmer Rothkorn, 4. špaldový chlieb z múky dostupnej v obchodnej sieti, 5. špaldový chlieb z odrody Frankienkorn, 6. špaldový chlieb z múky dostupnej v obchodnej sieti.

Polyklonálne a monoklonálne anti-gliadinové protilátky rozpoznávajú epitopy v pšeničnom lepku a tiež prolamíny v jačmeni a raži. Monoklonálne protilátky sú oveľa viac citlivejšie a špecifickejšie a sú navrhnuté proti konkrétnym sekvenciám aminokyselín v polypeptidovom reťazci, čo predstavuje ich obrovskú výhodu. Napríklad monoklonálna protilátka R5 používaná pri sendvičovej ELISA analýze reaguje s epitopmi aminokyselínových sekvencií QQFPF, QQQFP, LQFPF a QLFPF. Ďalšia monoklonálna protilátka PN3 bola navrhnutá proti syntetickému peptidu pozostávajúcemu z 19 aminokyselín, ktorý v natívnom stave tvorí časť α -

gliadínu (Ellis et al., 1998). Polyklonálne protilátky rozpoznávajú väčšie množstvo epitopov prolaminových bielkovín, čiže je tu vyššia pravdepodobnosť vzniku krížových reakcií. Okrem definovania imunologických vlastností prolaminov, poskytuje Western blot aj informácie o ich fyzikálno-chemických vlastnostiach, ktoré sa získavajú z elektroforetických profilov (Waga, Węgrzyn, 2000). V porovnaní s ELISA analýzou je to výhoda, pretože tá poskytuje informácie iba o kvantite prolaminov.

ZÁVER

V práci bola použitá metóda Western blot s využitím polyklonálnej protilátky na analýzu prolaminového komplexu vybraných druhov cereálií a hotových výrobkov, chlebov. V analyzovaných vzorkách zrna obilnín bola pozitívne potvrdená reakcia s použitou polyklonálnou protilátkou vo všetkých druhoch cereálií. Najviac reaktívne boli vzorky pšenice letnej a pšenice špaldovej, kde sa potvrdila prítomnosť celiakálne aktívnych bielkovín. Pozitívna reakcia s protilátkou sa potvrdila aj v zrnách raže a ovsu. Prolamíny extrahované z chlebov sa po elektroforéze separovali na menšie fragmenty v menšom množstve, ale s použitou protilátkou vykázali rovnakú afinitu ako prolamíny extrahované zo zrn obilnín. Na základe získaných výsledkov detekcie prolaminových frakcií bielkovín v analyzovanom biologickom materiáli, je možné konštatovať, že použitá metóda Western blot je vhodná na stanovenie prítomnosti prolaminov v obilninách a tiež v tepelne spracovaných produktoch z obilnín.

LITERATÚRA

- ARENDE, E. K., DAL BELLO, F., 2008. *Gluten-free cereal products and beverage*. USA: Elsevier Inc., 2008, 445 p. ISBN 978-0-12-373739-7.
- ARENTEZ-HANSEN, H., FLECKENSTEIN, B., MOLBERG, Ø., SCOTT, H., KONING, F., JUNG, G., ROEPSTORFF, P., LUNDIN, K. E. A., SOLLID, L. M., 2004. The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. In *PLoS Medicine*, vol. 1, 2004, no. 1, p. 84-92.
- BATTAIS, F., PINEAU, F., POPINEAU, Y., APARICIO, C., KANNY, G., GUERIN, L., MONERET-VAUTRIN, D. A., DENERY-PAPINI, P., 2003. Food allergy to wheat: identification of immunoglobulin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. In *Clinical & Experimental Allergy*, vol. 33, 2003, no. 7, p. 962-970.
- CIACCI, C., CIRILLO, M., CAVALLARO, R., MAZZACCA, G., 2002. Long-term follow-up of celiac adults on gluten-free diet: prevalence and correlates of intestinal damage. In *Digestion*, vol. 66, 2002, no. 3, p. 178-185.
- CICCOCIOPPO, R., DI SABATINO, A., CORAZZA, G. R., 2005. The immune recognition of gluten in celiac disease. In *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 140, 2005, no. 3, p. 408-416.
- EBO, D. G., STEVENS, W. J., 2001. IgE-mediated food allergy – extensive review of the literature. In *Acta Clinica Belgica*, vol. 56, 2001, no. 4, p. 234-247.
- ECKERT van, R., BOND, J., RAWSON, P., KLEIN, CH. L., STERN, M., JORDAN, T. W., 2010. Reactivity of gluten detecting monoclonal antibodies to a gliadin reference material. In *Journal of Cereal Science*, vol. 51, 2010, no. 2, p. 198-204.
- ELLIS, H. J., ROSEN-BRONSON, P., O'REILLY, N., CICLITIRA, P. J., 1998. Measurement of gluten using a

- monoclonal antibody against a coeliac toxic peptide of A gliadin. In *Gut*, vol. 43, 1998, no. 2, p. 190-195.
- HILL, P. G., McMILLAN, P. A., 2006. Anti-tissue transglutaminase antibodies and their role in the investigation of coeliac disease. In *Annals of Clinical Biochemistry*, vol. 43, 2006, no. 2, p. 105-117.
- JANATUINEN, E. K., PIKKARAINEN, P. H., KEMPPAINEN, T. A., KOSMA, V. M., JÄRVINEN, R. M. K., UUSITUPA, M. I. J., JULKUNEN, R. J. K., 1995. A comparison of diets with and without oats in adults with coeliac disease. In *The New England Journal of Medicine*, vol. 333, 1995, no. 16, p. 1033-1037.
- JANATUINEN, E. K., KEMPPAINEN, T. A., JULKUNEN, R. J. K., KOSMA, V. M., MÄKI, M., HEIKKINEN, M., UUSITUPA, M. I. J., 2002. No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. In *Gut*, vol. 50, 2002, no. 3, p. 332-335.
- LUNDIN, K. E. A., NILSEN, E. M., SCOTT, H. G., LØBERG, E. M., GJØEN, A., BRATLIE, J., SKAR, V., MENDEZ, E., LØVIK, A., KETT, K., 2003. Oats induced villous atrophy in coeliac disease. In *Gut*, vol. 52, 2003, no. 11, p. 1649-1652.
- PETR, J., MICHALÍK, I., TLASKALOVÁ, H., CAPOUCHOVÁ, I., FAMĚRA, O., URMINSKÁ, D., TUČKOVÁ, L., KNOBLOCHOVÁ, H., 2003. Extension of the spectra of plant products for the diet in coeliac disease. In *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 21, 2003, no. 2, p. 59-70.
- PRUSKA-KĘDZIOR, A., KĘDZIOR, Z., GORĄCY, M., PIETROWSKA, K., PRZYBYLSKA, A., SPYCHALSKA, K., 2008. Comparison of rheological, fermentative and baking properties of gluten-free dough formulations. In *European Food Research and Technology*, vol. 227, 2008, no. 5, p. 1523-1536.
- SCIARINI, L. P., RIBOTTA, P. D., LEÓN, A. E., PÉREZ, G. T., 2010. Influence of gluten-free flours and their mixtures on batter properties and bread quality. In *Food and Bioprocess Technology*, vol. 3, 2010, no. 4, p. 577-585.
- SHEWRY, P. R., HALFORD, N. G., 2002. Cereal seed storage proteins: structure, properties and role in grain utilization. In *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, 2002, no. 370, p. 947-958.
- SCHÄGGER, H., VON JAGOW, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. In *Analytical Biochemistry*, vol. 166, 1987, no. 2, p. 368-379.
- SILANO, M., BENEDETTO, R., MAIALETTI, F., VINCENZI, A., CALCATERRA, R., CORNELL, H. J., VINCENZI, M., 2007. Avenins from different cultivars of oats elicit response by coeliac peripheral lymphocytes. In *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 42, 2007, no. 11, p. 1302-1305.
- STAROVIČOVÁ, M., GÁLOVÁ, Z., KNOBLOCHOVÁ, H., 2003. Identification of glutenin marker in cultivars of three wheat species. In *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, vol. 39, 2003, no. 2, p. 51-57.
- STØRSRUD, P., HULTHÉN, L. R., LENNER, R. A., 2003. Beneficial effects of oats in the gluten-free diet of adults with special reference to nutrient status, symptoms and subjective experiences. In *British Journal of Nutrition*, vol. 90, 2003, no. 1, p. 101-107.
- URMINSKÁ, D., SOCHA, P., VOLLMANNOVÁ, A., 2009. ELISA and PAGE analysis of protein determinants from cereal and pseudocereal grain causing human coeliac disease. In *FEBS Journal*, vol. 276, 2009, no. 1, p. 94.
- VACCINO, P., BECKER, H. A., BRANDOLINI, A., SALAMINI, F., KILIAN, B., 2009. A catalogue of *Triticum monococcum* genes encoding toxic and immunogenic peptides for coeliac disease patients. In *Molecular Genetics and Genomics*, vol. 281, 2009, no. 3, p. 289-300.
- WAGA, J., WĘGRZYN, P., 2000. Relationship between some gliadin protein subunits and variation of agronomic traits winter wheat cultivars and strains. In *Biuletyn IHAR*, vol. 215, 2000, p. 61-67.
- WAGA, J., ZIENTARSKI, J., 2007. Isolation and purification of individual gliadin proteins by preparative acid polyacrylamide gel electrophoresis (A-PAGE) for allergenic research. In *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, vol. 57, 2007, no. 1, p. 91-96.
- WEBER, D., CLÉROUX, CH., GODEFROY, P. B., 2009. Emerging analytical methods to determine gluten markers in processed foods – method development in support of standard setting. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 395, 2009, no. 1, p. 111-117.
- WIESER, H., 2007. Chemistry of gluten proteins. In *Food Microbiology*, vol. 24, 2007, no. 2, p. 115-119.
- WEISER, H., KOEHLER, P., 2008. The biochemical basis of coeliac disease. In *Cereal Chemistry*, vol. 85, 2008, no. 1, p. 1-14.
- XIE, Z., WANG, C., WANG, K., WANG, P., LI, X., ZHANG, Z., MA, W., YAN, Y., 2010. Molecular characterization of the coeliac disease epitope domains in a-gliadin genes in *Aegilops tauschii* and hexaploid wheats (*Triticum aestivum* L.). In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 121, 2010, no. 7, p. 1239-1251.
- YALÇIN, E., 2010. Effect of partial removal of prolamins on some chemical and functional properties of barley flours. In *Food Science and Biotechnology*, vol. 19, 2010, no. 3, p. 735-742.
- ZINGONE, F., CAPONE, P., CIACCI, C., 2010. Coeliac disease: Alternatives to a gluten free diet. In *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, vol. 1, 2010, no. 1, p. 36-39.

Acknowledgements:

This work was realized under the direction of supervisor Dr. Barbara Mickowska, Malopolska Centre of Food Monitoring and Certification, Krakow and carried out with the financial support of project KEGA 334-013SPU-4/2010 and project OP EU ITMS 26220120054.

Contact address:

Peter Socha, Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia. E-mail: ing.peter.socha@gmail.com

Barbara Mickowska, Malopolska Centre of Food Monitoring and Certification, Faculty of Food Technology, Agriculture University in Cracow, Balicka 122, 30-149 Cracow, Poland. E-mail: bmickowska@ar.krakow.pl

Elżbieta Mazur, Malopolska Centre of Food Monitoring and Certification, Faculty of Food Technology, Agriculture University in Cracow, Balicka 122, 30-149 Cracow, Poland. E-mail: ela_mazur@interia.pl

Dana Urmínská, Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia. E-mail: Dana.Urminska@uniag.sk

Ewa Cieślík, Malopolska Centre of Food Monitoring and Certification, Faculty of Food Technology, Agriculture University in Cracow, Balicka 122, 30-149 Cracow, Poland. E-mail: rrciesli@cyf-kr.edu.pl