

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

2114723

**BIOCHEMICKÁ CHARAKTERISTIKA CEREÁLIÍ
A PSEUDOCEREÁLIÍ Z HĽADISKA MOŽNOSTI ICH
VYUŽITIA V BEZLEPKOVEJ DIÉTE**

2010

Zuzana Kopálová, Bc.

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

**BIOCHEMICKÁ CHARAKTERISTIKA CEREÁLÍ
A PSEUDOCEREÁLÍ Z HĽADISKA MOŽNOSTI ICH
VYUŽITIA V BEZLEPKOVEJ DIÉTE**

Diplomová práca

Študijný program:	Aplikovaná biológia
Študijný odbor:	4.2.1 Biológia
Školiace pracovisko:	Katedra biochémie a biotechnológie
Školiteľ:	Prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc.

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Zuzana Kopálová týmto vyhlasujem, že záverečnú prácu na tému „Biochemická charakteristika cereálií a pseudocereálií z hľadiska možností ich využitia v bezlepkovej diéte“ som vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry, pričom záverečná práca nadväzuje na moju bakalársku prácu s názvom „Biochemická charakteristika niektorých cereálií a pseudocereálií a možnosti ich využitia v bezlepkovej diéte.“

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak hore uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 15. apríla 2010

Pod'akovanie

Touto cestou si dovoľujem srdečne poďakovať vedúcej diplomovej práce prof. RNDr. Zdenke Gálovej, CSc., za odborné usmernenie a cenné rady pri vypracovaní záverečnej diplomovej práce.

ABSTRAKT

Celiakia je autoimunitné zápalové ochorenie tenkého čreva, ktoré u geneticky citlivých jedincov spôsobujú prolamíny pšenice, ovsu, raže a jačmeňa. Vplyvom nich dochádza k lokálnemu poškodzovaniu klkov čreva a jedinou liečbou je celoživotné dodržiavanie bezlepkovej diéty. Pri nej pacienti musia zo svojho jedálneho lístka vylúčiť všetky produkty vyrobené z pšenice, jačmeňa, ovsu a raže. Cieľom diplomovej práce bolo okrem zoštudovania literatúry s problematikou celiakie aj analyzovať 12 genotypov cereálií a pseudocereálií (pšenica, amarant, cirok, pohánka, jačmeň a ovos) z hľadiska ich alergického účinku s možnosťou ich využitia pre potreby bezlepkovej diéty.

Biochemickými rozbormi sme stanovili obsah celkového dusíka, obsah hrubých bielkovín, frakčnú skladbu bielkovín, aktivitu niektorých hydrolytických enzýmov. Ďalej sme realizovali elektroforetické delenie zásobných bielkovín pomocou SDS-PAGE a na presnú detekciu celiakálne aktívnych bielkovín imunochemickú metódu ELISA. Získané výsledky sme vyhodnotili matematicko - štatistickými metódami pomocou programu Statgraphic 5.0.

Z hľadiska obsahu bielkovín a bielkovinových frakcií sme zistili výrazné rozdiely medzi analyzovanými materiálmi. Kým prevládajúcou frakciou pseudocereálií sú cytoplazmatické bielkoviny albumíny a globulíny (45,04 – 52,85 %), v cereáliách sú to zásobné prolamíny a glutelíny (45,24 – 70,83 %). Pseudocereálie amarant a pohánka sa vyznačovali nízkym zastúpením prolamínov, pričom ich percentuálne zastúpenie nepresiahlo hodnotu 5 %. Aktivita hydrolytických enzýmov (alfa-amylázy, kyslé, neutrálne a zásadité proteázy) bola v analyzovaných vzorkách nízka. Elektroforetickou analýzou sme zistili zastúpenie vysokomolekulárnych (HMW-GS) a nízkomolekulárnych (LMW-GS) glutelínových subjednotiek.

Prostredníctvom ELISA testu sme potvrdili prítomnosť celiakálne aktívnych lepkových bielkovín v pšenici, ovsu a jačmeni. V ostatných vzorkách plodín (cirok, pohánka, amarant) sme zistili obsah gluténu menší ako 0,02 %.

Na základe uvedených zistení môžeme povedať, že medzi plodiny vhodné na prípravu potravín pre ľudí trpiacich celiakiou možno zaradiť amarant, pohánku a podľa výsledkov ELISA testov aj cirok.

Kľúčové slová: bezlepková diéta, celiakia, pseudocereálie, SDS-PAGE, ELISA

ABSTRACT

Celiac disease is an autoimmune inflammatory disease of the small intestine, that is caused by prolamins of wheat and similar proteins in rye and barley, in genetically susceptible individuals. By eating or using products containing these proteins, villi in small intestine are being damaged or destroyed and the only treatment for celiac patients is to keep lifelong „gluten-free“ diet. Patients must avoid all food and products made of wheat, barley and rye. The aim of our study was apart from studying literary sources dealing with celiac disease also analyses of 12 genotypes of cereals and pseudocereals (wheat, amaranth, sorghum, buckwheat, rye and oat) in term of allergic effects and the possibility of using them for gluten-free diet.

Biochemical analyses were used to define total nitrogen, gross proteins, protein fractions, activity of some hydrolytic enzymes. There was an electrophoretic separation of storage proteins with the help of SDS- PAGE method carried, as well as another specific method ELISA assay. Our results were interpreted by using statistic method and the program Statgraphic 5.0.

As for gross proteins and fractional composition of proteins, we found out clear differences in between analysed materials. While the dominant fraction in pseudocereals the cytoplasmatic proteins albumins and globulins are (45,04 % - 52,85 %), storage proteins prolamins and glutelins are the most commonly (45,24 % - 70,83 %) in cereals. Pseudocereals amaranth and buckwheat were characterized by low content of prolamins, at which percents did not run over 5 %. The activity of hydrolytic enzymes (α amylase, acid, neutral and alcalic proteases) in analysed sampled was low. Contents of HMW-GS and LMW-GS were determined by electrophoretic separation in polyacrylamide gel.

ELISA assay confirmed presence of celiac allergic proteins in wheat, oats and barley. Content of gluten in the rest of samples (sorghum, buckwheat, amaranth) was less than 0,02%.

On the basis of introduced investigations, we can say, that amaranth, buckwheat and according to ELISA assay results sorghum as well, these agriculture crops can be used to prepare food products for celiac patients.

Key words: gluten-free diet, celiac disease, pseudocereals, SDS-PAGE, ELISA

Obsah

Obsah	5
Úvod	7
1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky.....	9
1.1 Charakteristika proteínov a ich biologická funkcia.....	9
1.2 Technologická kvalita zrna pšenice.....	12
1.3 Genetické markery technologickej kvality zrna pšenice	16
1.4 Celiakálne aktívne bielkoviny	20
1.5 Potravinová intolerancia.....	22
1.5.1 Intolerancia potravín imunologického pôvodu	23
1.6 Celiakia.....	24
1.6.1 História celiakie	26
1.6.2 Genetické faktory.....	26
1.6.3 Prezentácia ochorenia	27
1.6.4 Patogenéza	30
1.6.5 Epidemiológia	31
1.6.6 Liečba.....	32
1.7 Charakteristika niektorých pseudocereálií	34
2 Cieľ práce.....	39
3 Materiál a metodika.....	40
3.1 Biologický materiál	40
3.2 Biochemické rozborý.....	40
3.2.1 Stanovenie celkového dusíka podľa Kjeldala	40
3.2.2 Výpočet hrubých bielkovín.....	41
3.2.3 Spektrofotometrické stanovenie bielkovín podľa Bradforda.....	41
3.2.4 Stanovenie aktivity alfa-amylázy Spofa testom.....	42
3.2.5 Stanovenie aktivity proteáz S-testom proteáza univerzál	43
3.2.6 Stanovenie frakčnej skladby bielkovín podľa Golenkova	44
3.2.7 Elektroforetické delenie zásobných bielkovín	47
3.2.8 Enzýmová imunoanalýza pre kvantitatívnu analýzu gliadínu (Kat.č. R7001).....	48
3.2.9 Matematicko – štatistické vyhodnotenie.....	50

4	Výsledky a diskusia	51
5	Návrh na využitie výsledkov	63
6	Záver.....	64
7	Použitá literatúra	66

Prílohy

Úvod

Obilniny majú v historickom vývoji ľudstva najdôležitejšie postavenie spomedzi poľných plodín. Pestujú sa v prvom rade pre zrná na konzum, pre výživu zvierat, pre priemyselné spracovanie a ako osivo. Týmto sa stávajú tiež strategickou surovinou. Obilniny v ľudskej výžive zabezpečujú dnes rozhodujúcu časť energetického príjmu z potravín a nemalý podiel i z celkového príjmu bielkovín. Žiadna iná skupina potravín nie je taká harmonická, ako celé obilné zrná, sú schopné zabrániť civilizačným ochoreniam podmieneným výživou, oslabiť ich alebo aj úplne vyliečiť. Avšak sú nielen významným zdrojom rastlinných bielkovín, vitamínov a minerálnych látok, na druhej strane obsahujú nemalé množstvo alergénov.

Obsah a kvalita zásobných bielkovín (prolamíny a glutelíny) v najvyššej miere rozhodujú o technologických vlastnostiach zrna obilnín. Osobitný význam majú zásobné bielkoviny pšenice, ktorej prolamínová frakcia je dôležitá aj zo zdravotného hľadiska, pretože obsahuje celiakálne aktívne bielkoviny, ktoré u citlivých jedincov vyvolávajú alergické reakcie.

Problematika potravinových reakcií vstupuje stále viac do povedomia laickej verejnosti, ktorá veľmi často hľadá príčinu svojich zdravotných problémov v potravinách.

Potravinová alergia je klinický prejav senzibilizácie (precitlivelosti) voči potravinovým alergénom. Obvykle ide o zložitejšie bielkoviny s molekulovou hmotnosťou 5-100 kDa, na ktoré je jedinec citlivý. Táto precitlivelosť má imunologický podklad, je ňou postihnutých 6% detí vo veku do 5 rokov a asi 1 až 2% dospelých.

Významnou skupinou alergénov v zrne obilnín sú prolamíny. Vyznačujú sa nízkou stráviteľnosťou, nutričnou hodnotou a nízkym zastúpením esenciálnych aminokyselín.

Celiakia je multifaktoriálne autoimunitné ochorenie. Je charakterizované deštrukciou resorpčného epitelu v tenkom čreve, čo má za následok poruchu vstrebávania bielkovín a neschopnosť črevných stien spracovať lepok. Spôsobuje ju gliadín tým, že sa viaže na príslušné receptory na epitelových bunkách črevných klkov a pôsobí na ne cytotoxicky. Príznaky celiakálnej sprue boli popísané už v 2. storočí pred n. l.

Terapia ochorenia spočíva v prísnej bezlepkovej diéte, ktorá je celoživotná. Jej podstatou je príprava stravy, ktorá neobsahuje žiadny lepok, teda prísne vylúčenie múky a múčnych výrobkov vyrobených z pšenice, jačmeňa, ovsu a raže. Chyby v stravovaní opätovne vyvolávajú symptómy celiakie a po rokoch môžu spôsobiť rakovinu čreva a zhubné ochorenia, najmä ochorenia na malígne lymfómy.

Pseudocereálie nachádzajú čoraz väčšie využitie v racionálnej výžive, najmä pre vysoký obsah sacharidov, bielkovín, tukov, minerálnych látok a stopových prvkov. Na prípravu špeciálnych potravín sa využíva kukurica, ryža, cirok, pohánka, amarantus a ďalšie.

1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky

1.1 Charakteristika proteínov a ich biologická funkcia

Bielkoviny (proteíny) sú základné zlúčeniny živej hmoty, obsahujú priemerne asi 55% uhlíka, 21% kyslíka, 7% vodíka, 17% dusíka, malé množstvo síry a fosforu. Štruktúrou sa podobajú peptidom, avšak majú väčšiu relatívnu molekulovú hmotnosť (Ferenčík et al., 2000). Bielkoviny sú vysokomolekulárne organické látky, zložené zo zvyškov 20 rôznych aminokyselín a dvoch amidov pospájaných navzájom kovalentnou tzv. peptidovou väzbou. Relatívna molekulová hmotnosť bielkovín je vyššia ako 10 000 (Repka a Michalík, 1988).

Rastliny a niektoré mikroorganizmy si dokážu syntetizovať bielkoviny zo základných substrátov, akými sú napríklad oxid uhličitý, voda a anorganické dusíkové zlúčeniny. Živočíchy nemajú túto schopnosť, preto sú odkázané na príjem rastlinných alebo iných živočíšnych bielkovín, ktoré sa v procese trávenia štiepia na základné zložky – aminokyseliny a z nich potom budujú svoje špecifické bielkoviny (Michalík, 2005).

Podľa Ferenčíka et al. (2000) sa môžu bielkoviny skladať len z aminokyselín (jednoduché bielkoviny), alebo môžu ich molekuly obsahovať aj neproteínové zložky, ako ióny kovov, sacharidy, nukleotidy a iné látky (zložené bielkoviny).

Štruktúru bielkovín možno hierarchicky charakterizovať na štyroch úrovniach – ako primárnu, sekundárnu, terciárnu a kvartérnu štruktúru.

Murray et al. (2002) charakterizuje tieto štruktúry nasledovne:

Primárna štruktúra bielkovín je určená poradím (sekvenciou) aminokyselín. Repka a Michalík (1988) uvádzajú, že primárna štruktúra bielkovín je geneticky determinovaná.

Sekundárna štruktúra bielkovín charakterizuje priestorovú konfiguráciu polypeptidového reťazca. Poznáme dva základné typy sekundárnej štruktúry a to α – helix a β štruktúra skladaného listu. Obe konformácie sú stabilizované vodíkovými väzbami.

Podľa toho, či sa vodíkové väzby nachádzajú medzi dvoma rôznymi peptidovými reťazcami, alebo v rámci toho istého reťazca, delíme bielkoviny na:

-
- a) vláknité – vodíkové väzby sa nachádzajú medzi rôznymi (minimálne dvomi) rozvinutými peptidovými reťazcami
 - b) globulárne – vodíkové väzby sú vytvorené najmä medzi rôznymi časťami toho istého peptidového reťazca

Na tvorbe sekundárnej štruktúry bielkovín sa podieľajú okrem vodíkovej väzby aj disulfidové väzby, iónové väzby a hydrofóbne väzby (pôsobia najmä vo vnútornej časti molekuly bielkovín prostredníctvom reťazcov valínu, leucínu, izoleucínu a fenylalanínu) (Repka a Michalík, 1988).

Jednotlivé úseky bielkovín majú rozdielnu sekundárnu štruktúru na základe aminokyselín, ktoré sa v reťazci vyskytujú a po krátkych úsekoch dochádza k striedaniu napr. α a β – štruktúry bielkoviny v jednom reťazci (Grones, 1998). Sekundárne štruktúry bielkovín sú často organizované do domén – kompaktných jednotiek spojených polypeptidovou kostrou.

Terciárna štruktúra bielkovín popisuje vzájomné vzťahy týchto domén, spôsoby, akými sa pri skladaní bielkovín môžu dostať do tesného susedstva aminokyseliny značne od seba vzdialené v zmysle primárnej štruktúry, a ďalej väzby, ktoré stabilizujú tieto konformácie.

Na tvorbe terciárnej štruktúry sa podľa Repku a Michalíka (1988) podieľajú:

- a) vodíkové väzby medzi $-OH$ a NH_2 - skupinami,
- b) iónové väzby medzi kyslými a zásaditými aminokyselinami,
- c) van der Waalove sily medzi alifatickými a aromatickými bočnými reťazcami aminokyselín,
- d) hydrofóbne interakcie medzi hydrofóbnymi bočnými reťazcami aminokyselín a vodou.

Bielkoviny zostavené z dvoch alebo viacerých polypeptidových reťazcov spojených nekovalentnými väzbami vytvárajú **kvartérnu štruktúru** a nazývajú sa oligoméry.

Podľa Repku a Michalíka (1988) kvartérna štruktúra predstavuje priestorové usporiadanie opakujúcich sa identických subjednotiek do jednej väčšej molekuly. Výskyt kvartérnej štruktúry je obzvlášť charakteristický pre tvorbu zásobných rastlinných bielkovín.

Repka a Michalík (1988) uvádzajú klasifikáciu bielkovín z hľadiska ich fyzikálno – chemických a biologických vlastností nasledovne:

- a) podľa tvaru (vláknité a globulárne)

-
- b) podľa rozpustnosti (rozpustné a nerozpustné)
 - c) podľa prítomnosti neproteínovej zložky (jednoduché a zložené)
 - d) podľa biologických vlastností (katalytické, imunologické, regulárne, transportné, konštitučné)
 - e) podľa stavu degradácie (natívne a inaktivované) a ďalších vlastností

Na základe rozpustnosti bielkovín v rôznych rozpúšťadlách sa delia na albumíny, globulíny, prolamíny, glutelíny, históny a protamíny (Michalík, 2005).

Albumíny sú dobre rozpustné vo vode. Patrí sem napríklad leukozín pšenice, legumelín hrachu a typickým zástupcom je vaječný albumín.

Globulíny sú rozpustné v zriedených roztokoch NaCl, KCl. Patrí medzi ne napríklad fazeolín z fazule, legumín z hrachu, glycín zo sóje a tuberín zo zemiakov.

Prolamíny sú rastlinné bielkoviny, ktoré majú vysoký obsah prolínu a glutamínu. Sú rozpustné v 70 % etanole. K prolamínom zaradujeme gliadín pšenice, hordeín jačmeňa, zeín kukurice, avenín ovsá.

Glutelíny sú rastlinné zásobné bielkoviny, rozpustné v zásaditých roztokoch. Nachádzajú sa v zrne obilnín, kde spolu s prolamínmi tvoria lepok. Patrí sem glutenín pšenice, oryzeín ryže atď.

Históny sa vyskytujú hlavne v jadre buniek. Obsahujú najmä zásadité aminokyseliny, prevažne arginín a histidín.

Protamíny sú zásadité bielkoviny, dobre rozpustné vo vode, zriedených roztokoch solí a v minerálnych kyselinách. Vo forme nukleoprotamínov sa nachádzajú napríklad v spermiách rýb.

Ďalej bielkoviny rozdeľujeme podľa funkčného významu bielkovinových zložiek (Prugar, Hraška, 1986):

- Protoplazmatické bielkoviny, medzi ktoré patria katalytické a konštitučné bielkoviny. Predstavujú ich albumíny a globulíny a nachádzajú sa najmä v klíčku a aleurónovej vrstve zrna.
- Zásobné bielkoviny slúžia ako zdroj dusíka pre rastúci organizmus. Charakterizuje ich vysoký obsah glutamínu, kyseliny glutámovej a prolínu. Patria sem prolamíny a glutelíny.

V procese dozrievania zrna prebieha syntéza rozličných bielkovín nerovnomerne a nezávisle od seba. Ako prvé sa syntetizujú štruktúrne a katalytické bielkoviny (albumíny a globulíny), potom zásobné bielkoviny. V posledných fázach vývinu zrna sa hromadia gliadíny a gluteníny (Prugar a Hraška, 1986).

1.2 Technologická kvalita zrna pšenice

Obilniny sú významným energetickým a bielkovinovým zdrojom vo výžive ľudí aj zvierat. Výživná hodnota bielkovín je nízka a je spôsobená nízkou stráviteľnosťou (Repka a Michalík, 1988).

Pre spracovanie obilnín, a to nielen chlebových je dôležitá ich technologická hodnota, ktorá predstavuje súhrn znakov a vlastností suroviny, ktoré umožňujú spracovateľovi maximálnu výťažnosť a požadovanú akosť finálneho produktu (Frančáková et al., 2005).

Technologická kvalita sa posudzuje podľa Karabínovej et al. (1999) z dvoch hľadísk, a to mlynárskeho, kde sa hodnotí vhodnosť na mletie, výťažnosť múky, tvrdosť zrna, hmotnosť tisíc zrn a pekárskeho, kde sa posudzuje obsah a kvalita mokrého lepku, sedimentačná hodnota, číslo poklesu, väznosť múky a objem pečiva.

Muchová (1998) uvádza, že skutočná technologická hodnota zrna pšenice sa prejaví až počas spracovania. Informácie o zložení zrna získané pri hodnotení rozborov správne zvolených znakov akosti nám umožnia predpokladať, ako sa zrno bude správať v mlynoch a do určitej miery aj ako sa múka z neho vymletá prejaví v konkrétnych technológiách.

Podľa Hubíka a Tichého (1998) je technologická akosť determinovaná predovšetkým geneticky, teda technologickým potenciálom danej odrody. Dominantnú úlohu pritom hrajú zásobné bielkoviny endospermu zrna, ktoré ako jediné z cereálií majú schopnosť tvoriť zložité heterogénne systavy bielkovín, škrobu, minerálií a lipidov pšeničného zrna a pridanej vody – hydratovaný bielkovinový komplex tzv. lepok. Ten sa vyznačuje viskoelastickými vlastnosťami. Podľa Michalíka (1994) je lepok dôležitý pri výrobe chleba. Lepkový bielkovinový komplex teda určuje hlavnou mierou technologickú akosť zrna potravinárskej pšenice.

Zásobné bielkoviny v zrne obilnín slúžia ako zdroj dusíka pre rastúci organizmus a charakterizuje ich nevyvážené aminokyselinové zloženie, z čoho je zrejma ich nevyhovujúca nutričná kvalita (Peťovský, 1986). Vyznačujú sa nízkou

rozpustnosťou a hydrolyzovateľnosťou, čo spôsobuje nedostatočnú stráviteľnosť (Michalík, 1994).

Obsah a kvalita zásobných bielkovín pšeničného zrna sú hlavným faktorom, ktorý ovplyvňuje technologickú kvalitu zrna pšenice. Gliadínové a glutenínové bielkoviny sú charakterizované dostatočnou genetickou a jej zodpovedajúcou fenotypovou premenlivosťou, vysokou expresivitou a heritabilitou. V dôsledku toho sa kvalitatívna skladba jednotlivých zón elektroforetického spektra ani ich kvantitatívna expresia nemení vplyvom agroekologických podmienok a možno ich teda využiť pre účely predikcie technologickej kvality zrna pšenice (Gálová et al., 1998).

Gluténové bielkoviny (gliadín, glutenín) tvoria okolo 80 % z celkového obsahu bielkovín zrna pšenice (van Herpen et al., 2008). V zrne rôznych odrôd pšenice sa obsah gliadínov pohybuje od 20 % do 40 % z celkového obsahu bielkovín (Gálová, 1997). Rastlina si ich syntetizuje len v zrne a sú rezervoárom živín pre klíčiacu rastlinu, nesyntetizujú sa v zelených častiach rastliny (Prugar a Hraška, 1986).

Hlavným miestom ukladania bielkovín v zrne pšenice sú tzv. bielkovinové telieska veľké 0,5 až 20 μm . Tieto sú lokalizované vo vnútri plastíd, prípadne vakuol. Syntéza zásobných bielkovín v endosperme prebieha v ribozómoch, ktoré sú uložené paralelne k lipoproteínovým membránam plastidov. Zásobné bielkoviny syntetizované v ribozómoch sa sekretujú do vnútra plastidu tvoriac jednotlivé bielkovinové telieska (Michalík, 1990).

Michalík (1994) uvádza, že v zložení frakčnej skladby bielkovinového komplexu sa prejavujú medzidruhové rozdiely. Jednotlivé frakcie sa líšia nielen rozdielnou rozpustnosťou v rôznych rozpúšťadlách, ale aj aminokyselinovým zložením, molekulovou hmotnosťou, fyzikálno – chemickými vlastnosťami, čo spôsobuje ich odlišnosť v biologickej významnosti výživnej a technologickej kvality (Michalík, 1998).

Biologická hodnota bielkovín je súčasťou výživnej hodnoty bielkovín. Pod biologickou hodnotou bielkovín sa rozumie zhoda aminokyselinového zloženia daných bielkovín s aminokyselinovým zložením tých bielkovín, ktoré sa využívajú na stavbu organizmu človeka, resp. živočícha. Esenciálne aminokyseliny si nevie živočíšny organizmus sám nasyntetizovať, a preto ich musí prijímať v potrave. Nedostatok akejkoľvek esenciálnej aminokyseliny v potrave ohraničuje využitie ostatných

aminokyselín, pričom využiteľnosť bielkovín je daná aminokyselinou prítomnou v najmenšom množstve (Starovičová, 2003).

Podľa Repku a Michalíka (1998) nízku výživnú hodnotu rastlinných bielkovín, najmä obilnín podmieňuje vysoký podiel bielkovinových frakcií typu prolamínov, pretože sa vyznačujú nízkym podielom esenciálnych aminokyselín (lyzín, metionín, arginín, tryptofán, treonín a pod.) a naproti tomu vysokým podielom neesenciálnych aminokyselín ako je kyselina glutamová a prolín. Z uvedeného vyplýva, že rastlinné bielkoviny nie sú plnohodnotné. Napríklad obsah lyzínu tvorí približne 1 %, pričom štandard FAO je 5,5 %. Obsah kyseliny glutámovej je vyšší ako 50 % a obsah prolínu je okolo 15 %. Cereálne proteíny sú preto schopné pokryť potrebu esenciálnych aminokyselín u dospelých asi na 60 % a u detí iba na 30 %, udáva Michalík (1994).

Ku zníženiu nutričnej hodnoty prispieva i technologické spracovanie obilného zrna. Pri mletí na bielu múku sa totiž odstraňuje embryo a aleurónová vrstva, ktoré sú obvyčajne bohatšie na bielkoviny s vyššou biologickou hodnotou (Prugar a Hraška, 1986).

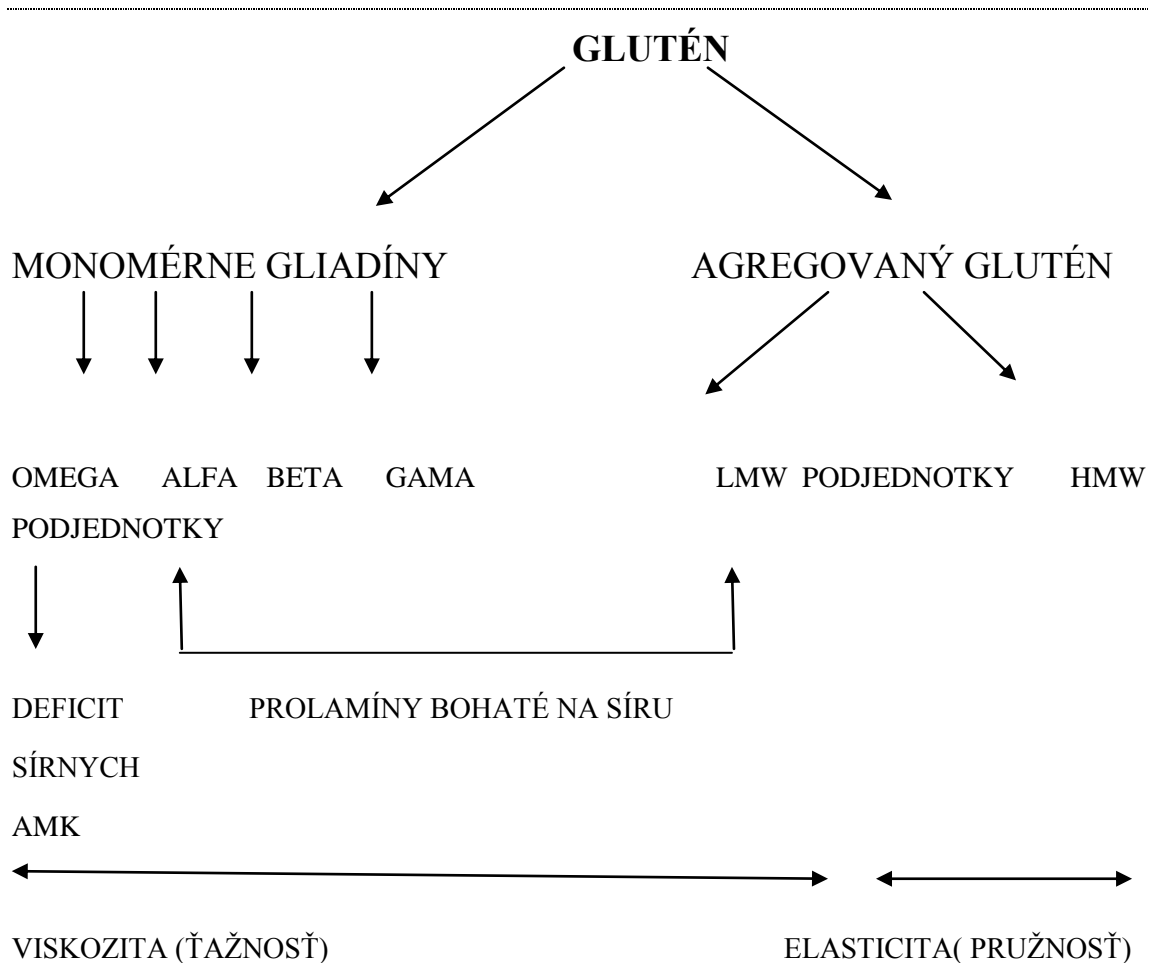
Lepok je komplex zásobných bielkovín obilného zrna, ktorý po hydratácii vytvára súvislú lepkavú nadmolekulovú štruktúru (Michalík et al., 2006).

Tvorba lepku je dôležitou vlastnosťou gliadínov a glutenínov. Má dôležitú úlohu v procese formovania pšeničného cesta a určuje jeho pekárske vlastnosti (Chňapek et al., 2006).

Glutén (lepok) je tvorený dvoma skupinami podjednotiek, a to vysokomolekulárnymi (HMW-GS) a nízkomolekulárnymi (LMW-GS). Zastúpenie vysokomolekulárnych glutenínových podjednotiek (HMW-GS) je podľa Gálovej et al. (2003) jedným z dôležitých faktorov ovplyvňujúcich technologickú kvalitu pšeničnej múky.

Gliadíny a gluteníny obsahujú sírne cysteínové zvyšky. Na základe ich množstva možno podľa Shewryho a Tathama (1997) deliť tieto bielkoviny na:

- Síru bohaté prolamíny (alfa, beta, gama gliadíny a nízkomolekulárne gluteníny – LMW-GS),
- Síru chudobné prolamíny (omega gliadíny),
- Vysokomolekulárne gluteníny (HMW-GS).



Obrázok 1: Klasifikácia gluténových bielkovín podľa Shewryho et al. (1988)

Gluteníny sú predstavované vysokomolekulárnymi (HMW) a nízkomolekulárnymi (LMW) podjednotkami. Približne 50 % zásobných bielkovín predstavujú gliadíny, zvyšných 10 % tvoria HMW glutenínové a 40 % LMW glutenínové podjednotky (Payne et al., 1983).

Podľa Karabínovej et al. (1997) gliadíny ľahko podliehajú peptizácii, majú emulzoidný charakter, vplyvajú na viskozitu – rozťažnosť a rozplývavosť cesta. Vzájomný pomer gliadínu a glutenínu určuje kvalitu lepku.

V procese dozrievania zrna sa v zásobných bielkovinách zvyšuje obsah tých aminokyselín, ktoré sa nachádzajú vo veľkom množstve v gliadínoch (prolín, leucín, kyselina glutámová a iné) a znižuje sa obsah aminokyselín, ktorých je v gliadínoch málo (lyzín, treonín, tryptofán, kyselina asparágová a iné) (Hraška, 1993).

Technologickú kvalitu zrna pšenice podľa Beža (1998) podmieňujú faktory biologické (veľkosť a tvar zrna, konzistencia endospermu, veľkosť briadky, hĺbka brušnej ryhy zrna, súdržnosť obalových vrstiev a endospermu) a faktory vonkajšieho prostredia (podmienky pestovania, ošetrovanie počas vegetácie, zber a pozberová úprava zrna, skladovanie a spracovanie zrna, prítomnosť cudzorodých látok v zrne).

Podľa Bajčiho et al. (1994) sa technologická kvalita pšenice posudzuje na základe skladovacej schopnosti (zmyslové ukazovatele – farba, vôňa, chuť; objektívne ukazovatele – vlhkosť, prímеси, nečistoty, zdravotný stav), znakov mlynárskej kvality (objemová hmotnosť, hmotnosť tisíc semien, sklovitosť) a znakov pekárskej kvality (hrubý proteín, mokrý lepok, napučívanie, ťažnosť, diastatická mohutnosť, číslo poklesu, sedimentačný test, fyzické vlastnosti cesta, pekársky pokus).

Pre formovanie technologickej kvality pšenice letnej je z hľadiska dôležitosti najvýznamnejším faktorom odroda, potom výživa a nakoniec priebeh poveternostných podmienok (Muchová, 1991).

Kvalita zrna pšenice je komplexnou vlastnosťou, na tvorbe ktorej sa podieľa viac génov. V súčasnosti je však už možné využiť techniky analýzy bielkovín a DNA na detekciu jednotlivých lokusov podieľajúcich sa na kvalite pšenice a tieto techniky použiť pri šľachtení, nákupe a spracovaní pšenice (Kraic a Gregová, 1998).

1.3 Genetické markery technologickej kvality zrna pšenice

Genetický marker je polymorfný znak, ktorého varianty vykazujú mendelistickú dedičnosť a môžu byť asociované s variabilitou úžitkových vlastností. Za najdokonalejšie markery spomedzi molekulárnych markerov sa považujú DNA markery (Trakovická, 1999).

Vhodný genetický marker by mal podľa Kraica (2004) spĺňať nasledovné kritériá:

- vysoká úroveň variability (polymorfizmu)
- vysoký stupeň dedivosti
- distribúcia po celom genóme rastliny (lokalizácia na viacerých chromozómoch)
- neovplyvniteľnosť vonkajšími podmienkami
- možnosť sledovania vo všetkých fázach rastu rastliny
- jednoduchá genetická interpretácia

-
- jednoznačnosť a presnosť
 - vysoká reprodukovateľnosť v rámci i medzi testovacími pracoviskami

Základnou charakteristikou genetického markera, použiteľného pre identifikáciu genotypov, je jeho polymorfizmus (mnohotvárnosť, variabilita). To znamená, že jeden typ markera sa nachádza vo viacerých odlišných formách, variantoch.

Polymorfizmus bielkovín a morfológických znakov je hlavným kritériom v systematike rastlín a tiež poskytuje dôležité informácie pre hodnotenie genotypu (Repka a Michalík, 1988).

Predpokladom využitia bielkovinových profilov ako genetických markerov je ich vysoký polymorfizmus, vysoká dedivosť bielkovinových profilov a možnosť ich genetickej interpretácie. Prolamínové a glutelínové bielkoviny pšenice tieto podmienky spĺňajú (Payne et al., 1987, Kolster et al., 1992).

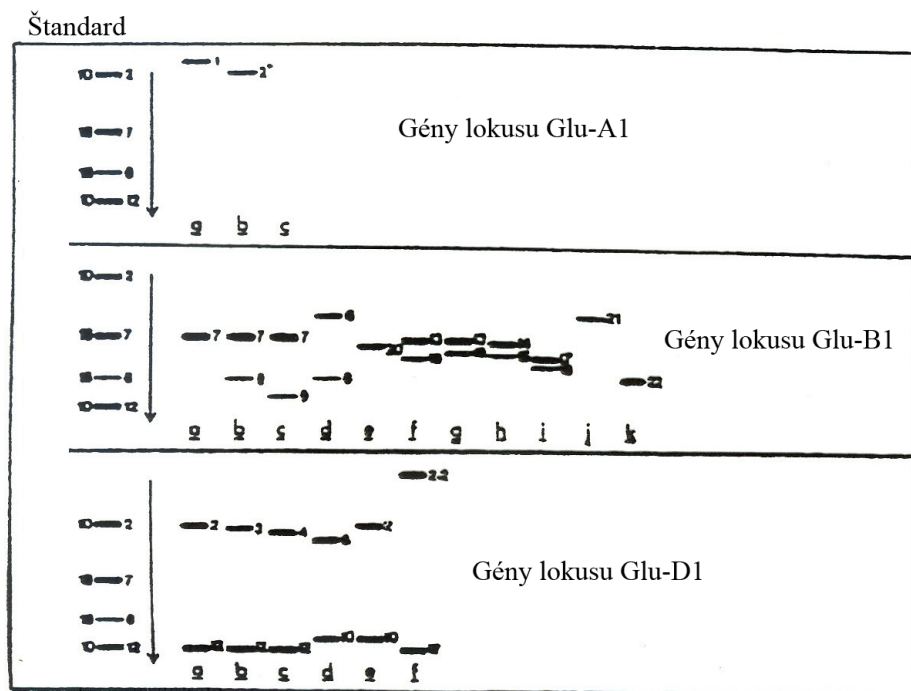
Gliadínové bielkoviny spĺňajú základné požiadavky, ktoré sa vyžadujú od markerov hospodársky dôležitých vlastností. Gliadínové spektrá sa vyznačujú výrazným polymorfizmom, podmieneným genetickou variabilitou v biosyntéze gliadínu. Polymorfizmus gliadínov podľa Prugara a Hrašku (1986) umožňuje markerovať celý rad hospodársky významných znakov a vlastností pšenice. Rovnako sa vyjadrujú aj Hischenhuber et al. (2006), ktorí tvrdia, že gliadíny sú dobrými markermi na meranie prítomnosti gluténu.

Medzi elektroforetickými zložkami gliadínov a glutenínov existujú tak spoločné znaky pre všetky genómy, ako aj špecifické znaky pre každý genóm. Z uvedeného vyplýva, že podľa elektroforetických spektier bielkovín zrna je možné veľmi rýchlo identifikovať jednotlivé odrody pšenice, určiť prítomnosť markerových génov hospodársky významných vlastností a znakov (Repka a Michalík, 1988).

Zistenie Sozinova et al. (1974, Prugar a Hraška, 1986), že niektoré gliadínové zložky sa dedia spoločne ako blok, bolo výrazným pokrokom v štúdiu a využití gliadínových markerov. Gliadínový blok predstavuje skupinu blízko na seba viazaných gliadínových zložiek, ktoré vystupujú ako mendelistické štiepne jednotky, dedia sa spoločne a nerekombinujú sa v procese crossing – overu. Jednotlivé gliadínové lokusy tvoria alelické série s rozličnými gliadínovými blokmi. Alelické gliadínové bloky sa môžu odlišovať počtom gliadínových zložiek, čo podmieňuje genotypové rozdiely v zložení gliadínov jednotlivých línií kultivarov pšenice.

Gény podmieňujúce gliadínové bloky sú lokalizované v 1A, 1B, 1D, 6A, 6B, 6D chromozómoch. Ich syntéza je riadená lokusmi Gli-1, Gli-2 a Glu-2. Lokus Gli-1 je lokalizovaný na krátkom ramene chromozómov 1A, 1B, 1D a kóduje omega a gama gliadíny. Lokus Gli-2 je lokalizovaný na krátkom ramene chromozómov 6A, 6B, 6D s génmi kódujúcimi alfa a beta gliadíny (Shewry, 1986).

Na štandardnom type gliadínového spektra α gliadíny majú sedem zón, β gliadíny päť zón, γ gliadíny majú tiež päť zón a ω gliadíny desať zón (Prugar a Hraška, 1986).



Obrázok 2: Základný katalóg alel kódujúcich HMW glutenínové podjednotky (Payne et al. 1987)

Najvýznamnejšie použitie gliadínových blokov – markerov je v oblasti šľachtenia nových odrôd pšenice. Pomocou gliadínových blokov môžeme hodnotiť a vyberať rodičovské formy do hybridizačných programov, odhadovať početnosť genotypov nesúcich gény žiadaných vlastností v štiepiacich populáciách F_2 , F_3

a vyberať žiadúce genotypy rastlín v generácii F₂, alebo požadované genotypy línií v generácii F₃ a v mladších generáciách (Gálová, 2001).

Gliadínové bloky sa môžu využívať predovšetkým ako markery kvality múky, mrazuvzdornosti, odolnosti proti hrdzi trávovej, ale aj homozygotnosti a heterozygotnosti hybridných generácií. Maximálnu odolnosť majú tie typy, v ktorých sa nachádzajú gliadínové bloky Gld1 A1, Gld1 A2, Gld1 D5, Gld6 A3, Gld6 D2 a Gld1 B2. Repka a Michalík (1988) potvrdili, že blok Gld1 A4, ktorý podmieňuje syntézu gama gliadínov zvyšuje technologickú kvalitu múky. Gliadínový blok Gld1 B3 je marker odolnosti kultivaru voči hrdzi trávovej a Gld1 B1 je marker náchylnosti pre túto chorobu (Prugar a Hraška, 1986).

Pre potreby aplikácie gliadínových markerov bol vypracovaný katalóg alelických gliadínových blokov pšenice letnej. K elektroforetickým analýzám gliadínov bolo použitých 626 odrôd pšenice a bol vypracovaný katalóg elektroforetických zón, resp. blokov zón podjednotiek HMW glutenínov. Katalóg súborov gliadínových alelických blokov registrovaných odrôd pšenice je predpokladom používania metódy gliadínových markerov, k identifikácii odrôd, k stanoveniu odrodovej pravosti a odrodovej čistoty (Černý a Šašek, 1998).

Černý a Šašek (1996) uvádzajú, že markery na úrovni polymorfizmu DNA predstavujú skupinu molekulárnych markerov, ktorá sa stále viac využíva v šľachtiteľských programoch. Jedným z dôležitých šľachtiteľských cieľov pšenice je zlepšenie pekárskej akosti. Zastúpenie jednotlivých HMW glutenínových subjednotiek (HMW-GS) ovplyvňuje v kladnom alebo zápornom smere technologickú kvalitu zrna pšenice. Subjednotky 5+10 lokalizované na lokuse GLU – D1 pozitívne prispievajú k pekárskej kvalite múky, kým subjednotky 2+12 negatívne ovplyvňujú technologickú kvalitu zrna (Gálová et al., 1998). Kladný resp. záporný príspevok HMW-GS k technologickej kvalite sa dá vyjadriť bodovou hodnotou, pomocou tzv. Glu-skóre (Payne et al., 1987). Glu-skóre môže mať maximálnu hodnotu 10. Čím je táto hodnota vyššia, tým má pšenica lepšie technologické vlastnosti múky (Kolster, 1991).

Syntéza HMW glutenínových subjednotiek je podmienená multigénovými lokusmi. Chromozóm 1B riadi syntézu 12 rozdielnych HMW subjednotiek, chromozóm 1D podmieňuje celkovo 6 rozdielnych subjednotiek a chromozóm 1A 5 subjednotiek.

Tabuľka 1 : Hodnotenie glutenínových HMW subjednotiek pre výpočet Glu - score (Payne a Lawrence, 1983)

Stupeň	LOKUS		
	Glu A1	Glu B1	Glu D1
4	—	—	5 + 10
3	1	17 + 18	—
3	2	7 + 8	—
2	—	7 + 9	2 + 12
2	—	—	3 + 12
1	žiadny	7	4 + 12
1	—	6 + 8	—

Vysoká heterogenita, druhová a genotypová špecifickosť, rozdielne fyzikálno chemické vlastnosti predurčujú gluténové bielkoviny plniť úlohu markerov hospodársky významných vlastností pšenice (Gálová et al., 1997).

1.4 Celiakálne aktívne bielkoviny

Prevažná časť cereálnych, tzv. zásobných bielkovín zrna je lokalizovaná v endosperme, ktorý zahŕňa viac ako 80 % štruktúry zrna .

Bielkoviny typu albumínov a globulínov sú prednostne lokalizované v zárodku zrna a sú enzymaticky aktívne, dobre rozpustné vo fyziologických roztokoch a ľahko hydrolyzovateľné proteolytickými enzýmami, čo predurčuje ich dobrú stráviteľnosť (Michalík, 1994).

Prolamíny a glutelíny možno charakterizovať ako typické zásobné bielkoviny. Tieto sa vyznačujú schopnosťou vytvárať štruktúru pšeničného lepku, ktorý je dôležitý pri výrobe chleba. Ich nízka rozpustnosť a hydrolyzovateľnosť však spôsobuje nedostatočnú stráviteľnosť lepkových bielkovín (Michalík, 1994). Prolamíny sa u jednotlivých plodín nazývajú nasledovne: v pšenici gliadíny, v jačmeni hordeíny, v raži sekalíny, v ovse aveníny, v kukurici zeíny (Gianibelli et al., 2001). Prolamíny sa

vyznačujú vysokým podielom kyseliny glutámovej, ktorá je úplne amidovaná v podobe glutamínu a prolínu. Naproti tomu však vykazujú nízky podiel esenciálnych aminokyselín, najmä lyzínu (Michalík a Bauerová, 2001).

Glutelíny pšenice nazývame gluteníny. Gianibelli et al. (2001) konštatujú, že hlavný rozdiel medzi gliadínmi a glutenínmi nachádzame pri analýze ich funkčnosti. Kým gliadíny sú jednoduché polypeptidové reťazce, gluteníny sú viacerťazcové štruktúry polypeptidov pospájané disulfidovými väzbami.

Celiakálne aktívne bielkoviny sú prítomné v prolaminovej frakcii. Mimoriadnu pozornosť si zaslúži najmä frakcia prolaminových bielkovín s nízkou molekulovou hmotnosťou okolo 20 až 30 tisíc Da. V prípade zrna pšenice sa táto frakcia nazýva alfa – gliadíny a vykazuje toxické vlastnosti tým, že vyvoláva celiakálne ochorenie (Michalík, 1994). Tieto proteíny sú kódované v pšenici na lokuse Gli-2, s odhadom od 25-30 do 150 kópií tohto génu v haploidnom genóme (Van Herpen et al., 2008).

Podľa Michalíka a Bauerovej (2001) je alfa – gliadínová molekula zložená z N – koncovej domény s veľkosťou 95 aminokyselinových zvyškov. Je bohatá na prolín a glutamín (krátke repetitívne sekvencie) a dlhého úseku v počte 171 aminokyselinových zvyškov C – koncovej domény s nízkym podielom prolínu s absenciou repetitívnych sekvencií.

Identifikácia najmenšej stavebnej jednotky gliadínovej bielkoviny zodpovednej za exacerbáciu celiakie viedla k enzymatickej degradácii gliadínov až na úroveň peptidov a na prípravu a následne aj testáciu syntetických peptidov (Michalík, 1994). Výsledky konformačných štúdií alfa- gliadínov potvrdili prítomnosť troch celiakálne aktívnych tetrapeptidových fragmentov v N-koncovej oblasti bielkoviny. Dva z nich sú spoločné pre všetky alergénne fragmenty. Sú to Pro-Ser-Gln-Gln a Pro-Gln-Gln-Gln . Tieto fragmenty sú lokalizované v N- koncovej oblasti gliadínového polypeptidu (zvyšky 3-55, 3-19,39-45) a C-koncovej oblasti molekuly (fragment 211-217). Pôsobením chymotrypsínu, fragmenty zodpovedajúce zvyškom 1-30 a 31-50 vykazovali celiakálnu aktivitu, zatiaľ čo zvyšky 56-68 neboli aktívne (Shewry et al., 1992).

Identifikovaný imunodominantný epitop z alfa – gliadínu je považovaný za najvýznamnejší stimulačný aktivátor celiakie (Buráková et al., 2005). Ide o peptidový reťazec zložený z 33 aminokyselín, ktorého štruktúra je odolná voči ďalšiemu tráveniu, a ktorý obsahuje tri prekrývajúce sa epitopové sekvencie PFPQPQLPY, PQPQLPYPQ

a PYPQPQLPY, kde P je prolín, Q je glutamín, F je fenylalanín, L je leucín, Y je tyrozín a G je glycín (Hischenhuber et al., 2006).

Odkedy sa zistilo, že gliadínové bielkoviny spôsobujú u senzitívnych jedincov celiakiu, uskutočnilo sa mnoho výskumov, ktoré potvrdili, že toto ochorenie spôsobujú aj hordeíny, sekalíny a aveníny (Holečková a Michalík, 1993).

Svetová zdravotnícka organizácia vypracovala hraničné hodnoty obsahu prolaminových bielkovín v požívatinách využitím elektroforetickej metódy. Okrem tejto metódy sa využíva najmä RP-HPLC. Touto metódou sa otestoval široký sortiment cereálnych výrobkov.

1.5 Potravinová intolerancia

Nežiaduce odozvy organizmu, ktoré nespôsobuje imunitný systém, ale metabolizmus tela poznáme ako potravinová intolerancia (Németh, 2004). Do tejto skupiny zaraďujeme reakcie na alimentárne intoxikácie, ako aj reakcie na enzýmovú deficienciu, ktorá spôsobuje nedostatočné trávenie určitej zložky potravy, napr. laktózy (mliečneho cukru).

Potravinová intolerancia je pojem, ktorý popisuje množstvo reprodukovateľných nepriaznivých odoziev na potraviny vrátane alergických reakcií, ktoré postihujú imunitný systém, nepriaznivých odoziev zapríčinených enzýmovou nedostatočnosťou, farmakologických reakcií a iných nedefinovaných reakcií (Robinson, 2002).

Golian (1998) tvrdí, že intolerancia potravín (neznášanlivosť potravín) je porucha, ktorá znamená neprimeranú reakciu na jedlo. Niektoré potraviny alebo ich súčasti sú pritom príčinou ťažkostí nasledujúcich po prijatí jedla.

Príčiny týchto ťažkostí môžeme podľa Goliana (1998) rozdeliť do troch základných skupín:

- intolerancia potravín imunologického pôvodu
- intolerancia potravín iného pôvodu (metabolická, toxická, pseudoalergická ap.)
- intolerancia potravín psychického pôvodu

1.5.1 Intolerancia potravín imunologického pôvodu

Do tejto skupiny patria rôzne imunologicky podmienené reakcie na jedlo. Môžeme tiež použiť termín precitlivosť na potraviny. Sú to vyvinuté zmeny najrôznejších prejavov založené na alergickom podklade.

Osobitný typ imunologicky podmienenej reakcie na potraviny je potravinová alergia, čo je tzv. senzibilizácia na potraviny. Pri nej sa antigén z potraviny dostáva cez slizničnú bariéru do organizmu, viaže sa na špecifické protilátky a reakcia medzi antigénom a protilátkami spôsobí uvoľňovanie určitých aktívnych látok, ktoré spôsobujú alergie (Golian, 1998).

Potravinová alergia je definovaná ako IgE sprostredkovaná hypersenzitivita (Hodge et al., 2009). Podľa Németha (2004) je to nepriaznivá reakcia imunitného systému organizmu na určitú potravinu alebo jej zložku.

Potravinová alergia ako forma potravinovej intolerancie, ktorá je nepriaznivou odozvou imunitného systému postihuje 1-2 % detí a menej ako 1 % (0,2- 0,5 %) dospelých. V Európskej únii sa podľa zistení prejavuje alergická reakcia na potraviny u 3 až 7 miliónov ľudskej populácie.

Pri potravinovej alergii imunitný systém nevníma proteínovú zložku potraviny, na ktorú je jedinec citlivý, ako bezpečnú. Táto zložka sa nazýva alergén. Alergény sú esenciálne proteíny, je však zrejme, že nie všetky u ľudí iniciujú produkciu protilátok IgE, ktoré potom podnecujú vznik alergických reakcií. Potravinové alergie nie sú obvykle zapríčinené celou molekulou proteínu, ale iba jej samostatnou časťou (peptidom) a hlavne reaktívnou sekvenciou (epitopom) stavebnej jednotky aminokyseliny na peptide (Robinson, 2002).

Významným zdrojom potravinových alergénov sú arašidy, slepačie vajcia, sójové bôby, ryby, mliečne bielkoviny, oriešky (mandle, lieskový orech, pistácie, pekan, kešu), sezam, mäkkýše (Németh, 2004) a cereálie obsahujúce glutén, ako pšenica (Robinson, 2002). Príčinou môžu byť tiež niektoré druhy ovocia a zeleniny, v malej miere i mäso, orechy a čokoláda. Celkove sa uvádza 100 až 200 druhov potravín, ktoré môžu za rôznych okolností u niektorých jedincov vyvolať alergickú reakciu (Golian, 1998).

1.6 Celiakia

Pre celiakiu sa používajú viaceré synonymické názvy –Gecova – Herterova – Heubnerova choroba, infantilizmus intestinalis Herter, celiakálna sprue, gluténová enteropatia, gluténsenzitívna enteropatia, netropická sprue, idiopatická sprue u dospelých (Michalík a Bauerová, 2001).

Faulkner – Hogg et al. (2009) udávajú, že celiakia je reakcia sprostredkovaná lymfocytmi T a postihuje asi 1% populácie.

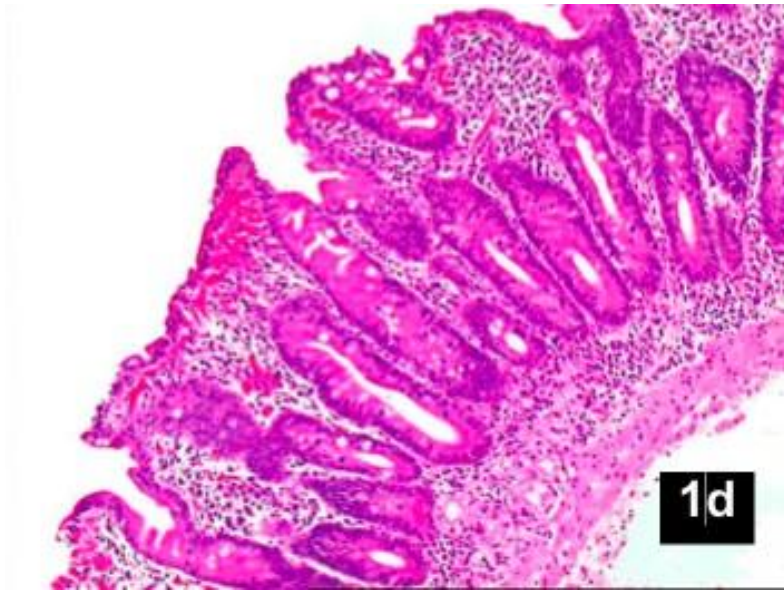
Celiakia sa považuje za metabolické ochorenie, pri ktorom potrava obsahujúca zásobné bielkoviny obilnín, najmä pšenice, jačmeňa, raže a ovsu vyvoláva poškodenia štruktúry malej intestinálnej sliznice tenkého čreva, ktoré spôsobuje disfunkciu buniek sliznice. Intolerancia k týmto bielkovinám väčšinou pretrváva po celý život (Šašinka a Kuchta, 1998).

Kohout (2005) uvádza, že celiakia je autoimunitné ochorenie spôsobené tvorbou protilátok proti bunkám sliznice tenkého čreva, vyvolané prítomnosťou lepku v potrave. Celiakia vzniká ako dôsledok tvorby protilátok proti vlastným tkanivám – bunkám sliznice tenkého čreva (enterocytom).

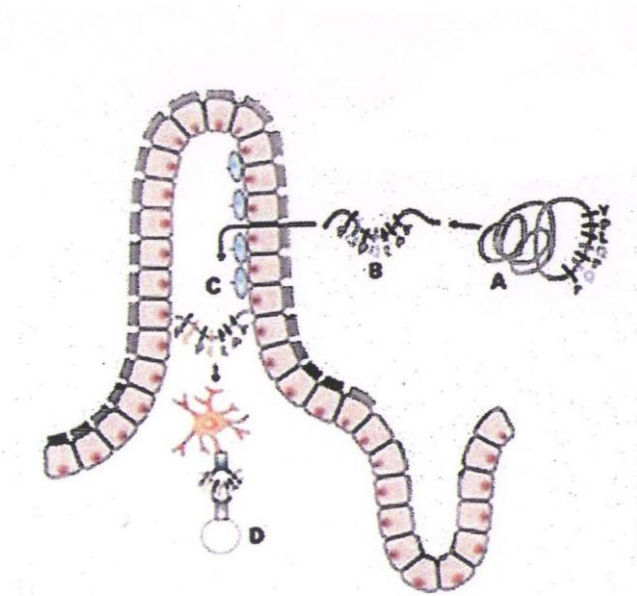
U osôb trpiacich celiakiou sa predpokladá genetická predispozícia, pričom prepuknutie ochorenia sa pripisuje spolupôsobeniu faktorov prostredia a hlavne konzumácii produktov na báze obilnín, ktoré obsahujú lepok (Michalík a Bauerová, 2001).

Týmto dochádza k zníženiu schopnosti prijímať dostatočné množstvo potravy. Nestrávené zvyšky sa vylučujú objemnými mastnými stolicami. Dôsledok deficitu vitamínov, minerálnych látok, aminokyselín, sacharidov a tukov je spomalenie rastu u detí, výskyt chudokrvnosti a u dospelých osteoporóza (Mařatka, 1988).

Celiakia je intolerancia gluténu spôsobujúca poškodenie tenkého čreva a znamená celoživotnú neznášanlivosť prolamínov. Ide o chronický zápal sliznice tenkého čreva a atrofiu črevných klkov, ktorými sa vstrebávajú živiny do krvi (obrázok 3). V dôsledku tohto sa zhoršuje vstrebávanie bielkovín, tukov ako aj cukrov. Osoby trpiace celiakiou majú obmedzenú digesciu v tenkom čreve (Buráková et al., 2005).



Obrázok 3 : Štruktúra sliznice tenkého čreva pri celiakálnom ochorení (<http> 1)



Obrázok 4 : Schematická predstava toxicity gliadínových bielkovín (McIMowat, 2003)

Celiakia je v detskom veku jedným z najčastejších ochorení na metabolickom podklade. Ide o chronické ochorenie črevnej sliznice spôsobené toxickým pôsobením lepku (obrázok 4), ktorý tvorí bielkovinovú súčasť rôznych obilnín (Jodl, 1988). Pacienti s celiakiou – deti i dospelí – reagujú na pšeničný glutén a bielkovinu

niektorých ďalších obilnín tak, že u nich dochádza k poškodeniu sliznice tenkého čreva. Takáto reakcia sa nazýva precitlivenosť na lepok.

1.6.1 História celiakie

Prvýkrát jej príznaky popísal v 2. storočí pred n.l. rímsky lekár Galenos a dal jej názov koiliakos z gréckeho črevné ťažkosti (Michalík a Bauerová, 2001).

Presný klinický popis tejto choroby podal v roku 1888 Samuel Gee ako detské ochorenie prejavujúce sa podvýživou, nadutým bruchom a hnačkami s mastnou stolicou (Loustarinen, 2003).

V roku 1924 Haas uskutočnil vlastný spôsob liečby. Vylúčil zo stravy chorých chlieb, zemiaky a obilniny a zaviedol banánovú diétu.

Počas 2. svetovej vojny sa v Holandsku zistilo, že zdravotný stav detí s celiakiou sa zlepšil po vylúčení cereálnych produktov. Zistenie, že jedlá obsahujúce múku zapríčinili zhoršenie, viedli Willema Dickeho k významnému zisteniu publikovanému v roku 1953, že toxickým agens je v prípade celiakie pšeničná múka resp. jej lepková frakcia (Ciclitira, 2001). Willem Dick ako prvý začal s bezlepkovou diétou.

O pár rokov neskôr (1956) Paulley a ďalší vedci zistili atrofiu malej intestinálnej sliznice tenkého čreva s chronickým zápalom pri celiakálnom ochorení. Rozvoj perorálnej intestinálnej biopsie Shinerom v roku 1957 výrazne zjednodušil diagnostiku celiakie (Loustarinen, 2003).

1.6.2 Genetické faktory

Celiakia je ochorenie, ku ktorému sa dispozícia dedí, nie je to však dedičnosť recesívna či dominantná, preto je celiakia častejšia u príbuzných pacientov, ktorí týmto ochorením už trpia (Kohout, 2005).

Pravdepodobnosť výskytu glutén- senzitivity enteropatie rastie od 10 do 20 % u osôb, ktoré majú priamy vzťah s ľuďmi s celiakiou (Nelsen, 2002).

Zvláštny systém HLA tkanivových antigénov ukazuje na častejší výskyt týchto znakov v skupine postihnutých detí a ich príbuzných (Jodl, 1988).

Z výsledkov Trowsdale a Campbella (1988, Michalík, Bauerová, 2001) vyplýva, že hlavný histokompatibilný systém je HLA-komplex (human leukocytes antigens). HLA systém tvoria antigény I. triedy (HLA-A, HLA-B, HLA-C), II. triedy (HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DP) a III. triedy. Antigény I. a II. triedy sú nevyhnutné pre rozpoznávanie vlastných a cudzích antigénov (Cordain a Simopoulos, 1999).

Z HLA antigénov I. triedy bola potvrdená silná asociácia s genotypom HLA-B8. Až 80 % chorých na celiakiu je nositeľom tohto genotypu (Michalík a Bauerová, 2001). V európskej populácii je frekvencia HLA- B8 vysoká, lebo z evolučného hľadiska bola krátko vystavená vplyvu cereálií. Populácie blízkeho východu, kde bol tento vplyv dlhší, bola zistená nízka frekvencia výskytu tohto genotypu (Cordain a Simopoulos, 1999).

Z HLA antigénov II. triedy vykazujú najväčšiu frekvenciu výskytu antigény HLA- DR3, HLA-DQW2, HLA-DR4 a HLA-DR7 (Michalík, Bauerová, 2001). Fazekašová (1998, cit. Michalík a Bauerová, 2001) potvrdila v našich podmienkach 95 % zastúpenie HLA-DW2 u chorých jedincov, kým v zdravej populácii je táto hodnota 34 %. Genotyp kódujúci HLA-DQW2 tvoria alely DQA1*0501 a DQB1*0201. Jedincom, ktorí majú tieto alely v homozygotnom stave, sa môže ochorenie rozvinúť v skoršom veku a s väčšou intenzitou ako u heterozygotov (Murray, 1999). V severnej Európe je tento genotyp prítomný u 98 %, v južnej Európe u 92 % pacientov. Je buď dedený v cis väzbe s genotypom HLA-DR3, alebo v trans väzbe s genotypom HLA-DR5/DR7 (Ciclitira, 2001).

Celiakia sa vyskytuje u ľudí s nízkym výskytom antigénu HLA-B8 alebo dokonca s absenciou tohto antigénu. Jedinci s antigénom HLA-B8 vykazujú 10 – násobne väčšie riziko ochorenia v porovnaní s osobami, u ktorých tento antigén chýba (Michalík a Bauerová, 2001).

V súvislosti s mechanizmom reakcie deaminovaného gliadínu treba pripomenúť antigény HLA – DQ2 a HLA – DQ8, ktoré aktivujú cytotoxické T lymfocyty a tým ničenie črevného epitelu a tvorbu protilátok proti gliadínu. Štúdia Faulkner – Hogg et al. (2009) odhaduje, že 30 – 40 % belochov je nositeľom génu pre HLA – DQ2 a HLA – DQ8, ale iba u menej ako 3 % sa celiakia vyvinie. Preto pre patogenézu ochorenia je potrebná interakcia genetických, imunologických a environmentálnych faktorov.

1.6.3 Prezentácia ochorenia

Celiakia sa môže objaviť kedykoľvek, najčastejšie je to však u detí v neskoršom kojeneckom alebo batolaťom veku. Závisí od doby, kedy bola podaná prvá potrava obsahujúca lepok (Jodl, 1988).

Klinický prejav ochorenia prichádza zvyčajne v 2. roku života s pribúdajúcim vekom dieťaťa a sa postupne môžu vyskytovať patologické črevné symptómy. Sú prípady, kedy črevné problémy ustúpia v období puberty. Ochorenie však môže opäť

prepuknúť v dospelosti ako reakcia na rôzne druhy záťaže organizmu a zmeny životného prejavu jedinca – klimatické zmeny, diéta, stres (Michalík a Bauerová, 2001).

Nelsen (2002) uvádza, že neliečená celiakia sa spája s mnohými príznakmi (tabuľka 2).

Tabuľka 2 : Symptómy celiakie a možné príčiny

Symptómy	Možné príčiny
únava	anémia,aktívacia imunitného systému
strata hmotnosti	malabsorpcia živín
hnačka, bolesti brucha	tuková stolica, zvýšená rýchlosť prechodu živín GIT
anémia	nedostatok železa, vit B12, kyseliny listovej
bolesti končatín	osteoporóza
výskyt aftov, zápal jazyka	nedostatok vitamínov
neploďnosť	deficiencia železa, folátu, zinku
poruchy zubnej skloviny	demineralizácia počas vývinu chrupu v detstve
plynatosť	sekundárne trávenie cukrov intestinálnou flórou

Celiakia je charakterizovaná deštrukciou resorpčného epitelu v tenkom čreve, čo spôsobuje zníženie absorpčnej plochy a má za následok malabsorpciu živín (Faulkner – Hogg et al., 2009).

Caglar et al. (2009) uvádza, že výsledkom malabsorpčného profilu je poškodenie klkov, ktoré je spôsobené aktiváciou bunkovej a protilátkovej imunity proti gluténu.

Ciclitira (2001) taktiež uvádza, že klasická prezentácia ochorenia v detskom veku je manifestáciou malabsorpčného syndrómu – poruchy funkcie sliznice tenkého čreva a že ochorenie sa zvyčajne prezentuje po odkojení a zavedení cereálií do stravy dieťaťa.

Podobne sa vyjadruje aj Kohout (1999), podľa ktorého sa celiakia prejavuje najčastejšie u dojčiat v šiestom až deviatom mesiaci života pri prechode na výživu s obsahom cereálnych výrobkov.

Medzi príznaky, ktoré sa prejavujú vo väčšej alebo menšej intenzite patria podľa Jodla (1988) opakované hnačky, zapáchajúca objemná stolica, zväčšenie bruška, zníženie chuti do jedla, zvracanie a psychické zmeny, ktoré sa môžu objaviť u pacienta náhle. Faulkner – Hogg et al. (2009) ďalej pridávajú stratu hmotnosti, plynatosť, kŕče v brušku a vyčerpanosť ako ďalšie prejavy celiakie u detí. Ochorenie však môžeme objaviť aj u pacientov, kde typické príznaky chýbajú úplne alebo čiastočne a má asymptomatický priebeh.

V dôsledku deficitu vitamínov, najmä rozpustných v tukoch (A,D,E,K), minerálnych látok (Ca, Fe), aminokyselín, sacharidov a tukov dochádza k spomaleniu rastu u detí, vyskytuje sa chudokrvnosť a u dospelých a prejavuje krehkosť kostí. Môže dochádzať taktiež k deformácii štruktúry bunkových organel a nadmolekulárnych štruktúr ako sú mitochondrie, ribozómy, endoplazmatické retikulum, čo negatívne vplyva na priebeh látkového metabolizmu a výkonnosť organizmu.

Z uvedeného je zrejmé, že okrem črevných porúch môže celiakia vyvolávať viaceré sprievodné javy. Medzi najčastejšie patria kožné vyrážky (Michalík a Bauerová, 2001).

Reakcia autoimunitného systému spustená gluténom môže tiež spôsobovať rozvinutie autoimunitných tyreoidných ochorení a táto asociácia s celiakálnym ochorením je dobre známa (Caglar et al., 2009).

Hischenhuber et al. (2006) dokonca celiakiu spája aj s selektívnou deficienciou IgA a Downovým syndrómom.

Mařatka (1988) uvádza aj ďalšie komplikácie, medzi ktoré patrí:

- karcinóm jejunu, prípadne karcinómy iných orgánov
- neurologické komplikácie – sensorická porucha vnímania rúk a nôh
- psychiatrické poruchy – schizofrénia, depresie, epilepsia
- ulcéózna jejunoileitída
- dermatitis herpetiformis

Wills (2000) uvádza, že poruchy centrálného nervového systému ako epilepsia, myoclonus, ataxia, očné poruchy, mnohopočetné poškodenie CNS a demencia len slabo reagujú na bezlepkovú diétu, zatiaľ čo poškodenia periférnych nervov sa môžu dodržiavaním bezlepkovej diéty eliminovať. Mechanizmy, ktoré zodpovedajú za výskyt týchto ochorení u pacientov s celiakiou a ich reakciu na bezlepkovú diétu sú neznáme a predpokladá sa, že sú imunologického pôvodu alebo súvisia s deficienciou vitamínov.

Klinické príznaky u jednotlivých sa u jednotlivých pacientov značne líšia ako v rozsahu manifestácie ochorenia tak i v dĺžke jeho trvania (Michalík a Bauerová, 2001).

1.6.4 Patogenéza

V snahe vysvetliť príčiny ochorenia boli formulované dve základné hypotézy, ktoré vychádzajú z predstavy o dedičnej poruche látkového metabolizmu (vrátane aktivity hydrolytických enzýmov v tenkom čreve) a o autoimunitnej reakcii na prítomnosť gliadínových bielkovín. Dedičná porucha syntézy glykoproteínov a tvorby bunkovej membrány enterocytov v komplexe s gliadínovými bielkovinami môže byť príčinou vzniku ochorenia (Michalík a Bauerová, 2001).

Podľa Ďuriša a kol. (2001) spôsobuje celiakiu gliadín tým, že uvoľňuje epitelové bunky črevných klkov z bazálnej membrány. Mechanizmus tohto účinku nie je presne známy. Ak sú na epitelových bunkách črevných klkov patologicky prítomné príslušné receptory, viaže sa na ne a pôsobí cytotoxicky. Gliadín môže indukovať primárnu imunologickú reakciu, ktorá poškodí vilózný epitel. Cytotoxickú imunologickú reakciu by mohol iniciovať nahromadený gliadín, ak chýba špecifická sliznicová peptidáza na jeho odbúranie.

Súčasná štúdie potvrdzujú, že prijatý α -gliadín a príbuzné peptidy sa viažu na tkanivovú transglutaminázu v enterocytoch. Transglutamináza deaminuje glutamín (α -gliadín je ohatý na glutamín) na kyselinu glutamovú. Deaminácia takto zvýši imunotoxicitu α -gliadínu tvorením epitopov, ktoré sú rozpoznávané bunkami imunitného systému ako cudzie (Nelsen, 2002). Tým sa zvýši afinita medzi hydrolyzovanými peptidmi a HLA antigénmi II. Triedy DQ2 a DQ8 k antigén prezentujúcim bunkám (Hischenhuber et al., 2006). Ďalej je spustená zápalová reakcia, ktorá spôsobuje typickú atrofiu klkov ako ju poznáme pri celiakii (Nelsen, 2002).

Zvýšená tvorba protilátok IgA, IgE, HLA na prítomnosť gliadínov a ich hromadenie na povrchu epitelových buniek vedie k atrofii klkov a následne spôsobuje

zmenšenie resopčného povrchu tenkého čreva, čo je príčinou vzniku malabsorpčného syndrómu. Tieto zmeny ovplyvňujú negatívnym spôsobom vstrebávanie živín a zdravotný stav ľudí (Michalík a Bauerová, 2001). Koncentrácia IgA v sére chorých na celiakiu je o 65 – 100 % vyššia (Kadlec, 1993).

Na vzniku celiakie sa podieľa trojica faktorov: genetická predispozícia, environmentálne faktory (prolamíny) a tiež imunologické faktory. Môže byť výsledkom evolučnej kolízie medzi kultiváciou pšenice a ľudským imunitným systémom (Murray, 1999).

1.6.5 Epidemiológia

Celiakálne ochorenie postihuje ľudí všetkých etnických skupín a častejšie ženy ako mužov (Hischenhuber et al., 2006), hoci častejšie sa vyskytuje u ľudí európskeho pôvodu, ako aj v Severnej Amerike a Austrálii. Len zriedka ju možno pozorovať u ľudí afro – karibského pôvodu (Ciclitira, 2001).

Epidemiologické štúdie vykonané v rôznych krajinách a na rôznych skupinách pacientov poukazujú na to, že výskyt celiakie bol v minulosti preukazne podhodnotený. Zvýšenie podozrenia a uvedomenia si rizika celiakálneho ochorenia je výsledkom nárastu počtu diagnostikovaných prípadov (Murray, 1999).

Výskyt celiakálnych ochorení vzrástol v určitých zemepisných oblastiach po roku 1960, čo súvisí s uplatnením malých črevných biopsií vo všeobecnej klinickej praxi. Aj dnes sa ťažko získavajú presné epidemiologické údaje o celiakii, pretože asymptomatický (bezpríznakový) priebeh choroby predstavuje skutočne väčšiu úroveň problematickej a gluténovej odozvy, čo nemôže všeobecne vylúčiť prechodnú gluténovú neznášanlivosť (Kohout a Pavlíčková, 1994).

V minulosti sa predpokladala frekvencia výskytu ochorenia približne 1:1500 pre populáciu západoeurópskych krajín (Murray, 1999).

V posledných rokoch viedol rozvoj screeningových metód k prehodnoteniu odhadov skutočného výskytu celiakie. Populačné štúdie publikované v Spojených štátoch amerických potvrdili, že prevalencia výskytu celiakie je približne jeden prípad na 250 osôb, obzvlášť u ľudí s európskymi predkami (Nelsen, 2002). Veľmi vysoké hodnoty výskytu dosahuje toto ochorenie v západnom Írsku (1:300), Taliansku (1:180). Veľký výskyt je aj v Škótsku s frekvenciou 1:850, 1:960 vo Švédsku, 1:5000 v Severnej Amerike. V Japonsku a Afrike sa udáva len malý výskyt (Príkazská,

Dvorská, 1998). V bývalom Československu bola frekvencia ochorenia 1:500 až 1:1000 (Jodl, 1988).

V západnej Európe je 0,5 až 1 % obyvateľov postihnutých celiakálnou sprue, udáva Van Herpen et al. (2008).

Teda vo výskyte celiakie sú zrejmé geografické rozdiely. Postupne stúpa aj vek pacientov s diagnózou celiakie (Murray, 1999).

Podobné výsledky ako v USA a v Európe zistili aj štúdie z Afriky, Južnej Ameriky a Ázie, čiže kontinentov, kde sa celiakia pokladala za raritné ochorenie. Na základe výsledkov týchto štúdií možno povedať, že celiakia je jednou z najfrekvencovanejších chorôb na genetickom základe, s výskytom 1 chorého na 100 až 300 jedincov v celosvetovej populácii (Fasano, 2001).

1.6.6 Liečba

Doporučenou terapiou takto postihnutých pacientov je vylúčenie gliadínu z diéty (bezlepkové potraviny) alebo permanentné podávanie peptidázových preparátov (Michalík et al., 2006).

Liečba celiakie zahŕňa celoživotnú elimináciu potravín obsahujúcich glutén. Ovos, ktorý nebol kontaminovaný inými zrnami je tolerovaný väčšinou pacientov, nie však všetkými (Faulkner – Hogg et al., 2009).

Terapia celiakie a celiakálneho syndrómu je diéta, ktorej základom je úplné vylúčenie múky z obilnín z potravy. Súčasťou prevencie je okrem dostatočnej dĺžky dojčenia aj dodržiavanie zásady, že dieťa do dovŕšenia 6. mesiaca života nesmie dostať žiadne múčne výrobky (teda ani zäsmážku, krupicu, piškoty, vložky, krúpy a pod.).

Diéta pri celiakii nesmie obsahovať gliadín ani glutén, čiže pacient nesmie konzumovať výrobky, pri príprave ktorých boli použité pšenica, raž, jačmeň, a v podmienkach SR aj ovos. Sú preto zakázané aj údenárske mäsové výrobky a konzervy. K dispozícii je už viacero hotových bezlepkových prípravkov (Šašinka, Kuchta, 1998).

Podobne sa vyjadrujú aj Kohout a Pavlíčková (1994), ktorí uvádzajú, že po potvrdení diagnózy je základným liečebným opatrením neodkladné zavedenie bezlepkovej diéty. Diéta spočíva vo vylúčení látok, ktoré zaťažujú a dráždia sliznicu tenkého čreva. V rámci nej sú prísne zakázané, a to aj v stopových množstvách všetky výrobky z pšenice, raže, jačmeňa a ovsa. Súčasťou prevencie celiakie je okrem

dodržiavania bezlepkovej diéty aj sledovanie incidencie tejto choroby v rôznych časových obdobiach.

Špeciálna diéta, pri ktorej lepek chýba v strave nevedie k problémom a dobre sa znáša. Deti s takouto diétou sa vyvíjajú normálne (Künzel, 1990).

Podľa Majorovej (2005) je bezlepková diéta pri celiakii doživotná. Už aj malé opakované diétne chyby vedú k ničeniu črevnej sliznice, často bez akýchkoľvek klinických prejavov.

V súvislosti s bezlepkovou diétou si treba uvedomiť, že lepkové proteíny sú prítomné v širokom sortimente potravinárskych výrobkov a aditív, ako sú napr. polievky, cukrovinky, výrobky z mäsa, korenie, pivo a pod. V ojedinelých prípadoch je nevyhnutné bezlepkovú diétu kombinovať s vylúčením mliečnych výrobkov (Michalík, Bauerová, 2001).

Pri liečení možno použiť výrobky na báze kukurice, prosa, ryže, pohánky, amarantu, pretože ich prolamíny nevykazujú celiakálnu aktivitu.

Povolené potraviny pri bezlepkovej diéte (Šedivá, 1995):

- mäso a mäsové výrobky
- mlieko a mliečne výrobky s nižším obsahom tuku
- vajcia
- tuky
- múčne výrobky iba bez obsahu lepku
- zelenina
- zemiaky
- strukoviny
- ovocie

Medzi **zakázané potraviny** patria:

- múka pšeničná, ražná, jačmenná, krúpy, ovsené vločky, krupica, múčne prílohy, zäsmažky, pekárenské a cukrárenské výrobky
- údeniny, mäsové konzervy, paštéty
- majonéza, káfovina, polotovary
- múčniky, kupované pudinky a krémy
- vyprážené jedlá, loj, masť, prepálené tuky

-
- ostré korenie a kečup
 - nafukujúca zelenina, hrušky, višne a čerešne

Medzinárodný symbol – preškrtnutý klas označuje všetky potraviny, ktoré boli pripravené špeciálne pre pacientov s celiakálnou sprue. Toto označenie bolo doporučené všetkým výrobcom diétnych potravín preto, aby chránilo pacientov pred potravou obsahujúcou lepok.

Setty et al. (2008) udávajú možné nové formy liečby celiakie v budúcnosti, ako je aplikácia glutén-degradujúcich enzýmov v potrave, rozvoj alternatívnych bezgluténových plodín prostredníctvom genetických modifikácií ako aj použiteľnosť rôznych foriem imunoterapie.

Podľa Van Herpena et al. (2008) moderné biotechnológie ponúkajú možnosť odstrániť najviac toxické epitopy bielkovín pomocou transgenézy alebo in vitro mutagenézy.

1.7 Charakteristika niektorých pseudocereálií

Pseudocereálie sa v súčasnosti dostávajú do povedomia vedeckej aj laickej verejnosti. Sú to nové potravinové zdroje cenných látok.

Pseudocereálie z botanického hľadiska nemožno zaradiť k obilninám, majú však vzhľadom k svojmu zloženiu a možnostiam spracovania podobné vlastnosti.

Charakteristika pseudocereálií vychádza z nasledovných skutočností: sú málo prešľachtené, vhodné do rôznych prírodných podmienok, nenáročné na vstupy, odolné voči chorobám, majú nižšiu produkciu a vyššiu nutričnú hodnotu i obsah špecifických látok. Okrem väčšieho obsahu základných nutričných látok a ich veľmi priaznivého zloženia, je významný i obsah špecifických zdravotne významných látok (rutín pri pohánke, flavonoidy pri amarante ap.) (Moudrý et al., 1998).

Pseudocereálie sú významným zdrojom sacharidov, prispievajú k pokrytiu dennej potreby esenciálnych mastných kyselín. Láskavec, pohánka, proso rovnako ako kukurica neobsahujú žiaden lepok (Kováčová a Pekárková, 1996). Podľa Michalíka et al. (2006) možno predpokladať, že nízky podiel prolaminových bielkovín, charakteristický pre bielkovinový komplex viacerých pseudocereálií je predpokladom pre ich využitie pre potreby bezlepkovej diéty.

Využitie pseudocereálií je veľmi rozmanité. Hlavné využitie je v potravinárstve – racionálnej výžive (Petr et al., 2003). Ďalšie využitie nachádzajú vo výžive hospodárskych zvierat. Široké uplatnenie našli tieto plodiny v kozmetickom a farmaceutickom priemysle. Aj do okrasného záhradníctva začali prenikať nové rody napr. proso, mohár, láskavec.

Pohánka – *Fagopyrum*

Pravlast'ou pohánky je pohorie Himaláje. Ešte aj dnes sa tam nachádza množstvo divých a kultúrnych foriem. Do Európy sa dostala v 13. storočí po vpáde Tatárov (Karabínová et al., 2001).

Pohánka sa využíva najmä vo východnej Ázii, avšak produkty z pohánkovej múky sa dnes stávajú populárnymi aj v západných krajinách ako zdravá potravina s vysokým obsahom proteínov (Kezuka et al., 2009).

Chemickým zložením semena a spôsobom pestovania je pohánka zaradená do skupiny obilnín. Pohánka obsahuje dobre stráviteľné glycidy (55-59 %), bielkoviny (11-12%), tuky (2-3%), minerálne látky (2,5- 2,8%, celulóza (11-14,5%), voda (14%) (Karabínová et al., 1997).

V bielkovinovom komplexe pohánky je podľa Karabínovej et al. (2001) vysoký podiel frakcie dobre rozpustných albumínov a globulínov, minimálny obsah ťažko rozpustných prolaminov, čím sa vysvetľuje dobrá stráviteľnosť pohánky. Má priaznivú skladbu aminokyselín, vysoký podiel lyzínu, vysoký obsah bielkovín, ktorý varíruje od 7 % do 21% v závislosti od agroekologických podmienok počas rastu ako aj od odrody (Muchová et al., 2001). Obsahuje veľa fosforu, draslíka, železa, medi a tiež aneurín, niacín a organické kyseliny citrónovú, jablčnú, šťaveľovú (Karabínová et al., 1997).

Pohánka sa používa na výrobu krúpov, krupice, múky, vločiek, pohánkového medu, rôznych druhov jemného a trvanlivého pečiva. Je vhodná pre diabetikov pri bezlepkovej diéte, posilňuje imunitný systém, reguluje zrážanlivosť krvi a obsah cholesterolu. Pomáha pri poruchách zažívacieho ústrojenstva.

Pohánka obsahuje alkaloid rutín. Pre farmáciu sa priemyselne izoluje a využíva sa pri liečbe artériosklerózy.

Zberová plocha pohánky bola v roku 1999 273,7 ha a v roku 2000 233,6 ha (Karabínová et al., 2001).

Cirok – *Sorgum*

Cirok slúži ako viacúčelová plodina. Je to prastará kultúrna plodina. Uvádza sa, že cirok metlový pochádza z Číny a Etiópie (Karabínová et al., 2001).

Pestovanie ciroku je v celosvetovom meradle veľmi významné. Predstavuje najvýznamnejšiu obilninu suchých a teplých oblastí. Produkcia ciroku zaujíma medzi obilninami 5 – 8 miesto. Zrno má podobnú výživnú hodnotu ako ryža. Je dobrou surovinou pre škrobárenský, liehovarnický a pivovarnický priemysel (Karabínová et al., 1997).

Rozdelenie ciroku podľa hospodárskeho využitia:

- 1) zrnový – pestovaný pre veľké nahé obilky ako potravina, máva dlhšiu vegetačnú dobu
- 2) cukrový – pestuje sa pre kŕmne účely i pre cukrovú šťavu, získavanú zo stebľa
- 3) technický – metlový, pestovaný pre dlhé metliny slúžiace k výrobe metiel
- 4) sudánsky – sudánska tráva pestovaná ako silne odnožujúca krmovina.

Plevnatá obilka ciroku obsahuje 10 – 14% vlákniiny, nahá obilka 14% vody a 86% sušiny, z toho 9 – 14% bielkovín, 66 – 71% sacharidov, 3 – 5% tuku, 1,5 – 2,5% minerálnych látok (Karabínová et al., 1997).

V roku 1998 bola zberová plocha ciroku na zrno na Slovensku 9,7 ha, v roku 1999 to bolo na 10, 4ha. V roku 2000 bol cirok pestovaný na výmere 50,7 ha (Karabínová et al., 2001).

Proso – *Panicum*

Proso patrí popri pšenici a jačmeni medzi najstaršie obilniny. Za prvotné stredisko vzniku sa považuje Stredná a Východná Ázia.

Proso patrí do triedy jednoklíčnolistových, čeľaď lipnicovité. Podľa utvárania metliny sa delí na päť poddruhov. U nás sa pestuje len poddruh prosa rozložitého (*Panicum miliaceum ssp. effusum*).

Proso je veľmi odolné voči suchu, preto bolo prvou plodinou pestovanou v suchých oblastiach východnej Ázie (Lu et al., 2009). Olúpané zrnó sa používa ako chutná a výživná potravina, ale aj ako krmivo pre hydinu, ošípané, ryby a domáce vtáctvo (Karabínová et al., 1997).

Proso sa považuje za diétnu potravinu, má priaznivý pomer živín, blížiaci sa odporúčanému pomeru medzi bielkovinami, tukmi a sacharidmi. V priemere obsahuje 60% škrobu, 10% bielkovín, 4% tuku a 8% vlákniny. V porovnaní s pšenicou obsahuje dvojnásobné množstvo vitamínov B1 a B2 (Karabínová et al., 2001).

Proso sa pestuje hlavne na konzumné účely. Lúpané obilky sú chutné, rýchlo variteľné a dobre stráviteľné. Pripravuje sa z nich kaša a používajú sa aj k výrobe chleba. Lúpané obilky môžu tiež slúžiť ako náhrada sladu pri výrobe piva a vyrába sa z nich aj lieh (Karabínová et al., 1997).

Zberová plocha prosa u nás bola v roku 1998 711,7 ha, v roku 1999 to bolo 1003,8 ha. Ročník 2000 bol pestovateľsky nepriaznivý a vtedy sa proso pestovalo na výmere 700 ha (Karabínová et al., 2001).

Láskavec – *Amaranthus*

Amarant je v Amerike známy už viac ako 8000 rokov. Dnes ho poznáme ako potravinu, krmovinu i ako liečivú rastlinu. Pestovali ho už starí Mayovia, Aztékovia a Inkovia, pre ktorých bol posvätnou plodinou, nazývali ho „svätým zrnom“ (http 2).

Amarant patrí do čeľade *Amaranthaceae*, kde zaraďujeme 65 druhov a asi 900 rodov. Najznámejší je rod *Amaranthus*.

Stonky amarantu sú priame, okrúhle, slabo alebo silno rozvetvené, olistené, vysoké 1,3 až 3 m. Súkvetie je zložitá metlna. Mladé listy sa používajú ako zelenina. Semeno má vysoký obsah bielkovín a vynikajúce aminokyselinové zloženie. Obsahuje veľa Ca, Fe a vitamínu E (Karabínová et al., 1997).

Amarant patrí k najstarším cereáliám na svete. Medzi cereálie ho zaraďujeme pre jeho obsah sacharidov. Tento je podobný obsahu sacharidov v bežných cereáliách s vysokou stráviteľnosťou. Amarant by mohol patriť k strukovinám, lebo má vyššiu proteínovú hodnotu ako napríklad sója, či dokonca mlieko (Žajová, 2006).

Amarantová múka je charakteristická oveľa vyššou koncentráciou bielkovín (17,9%) než je múka cereálií (8,5 – 14%). Obsah tuku je relatívne rovnako vysoký (7,7%) v porovnaní s kukuricou (4,5%), ryžou a pšenicou (2,1%) a výrazne vyšší

i obsah popola. Obsah škrobu je v amarante porovnateľný s obsahom najdôležitejších cereálií. Amarantový škrob je veľmi jemný, preto sa používa ako nosič aromatických a chuťových látok. Semená amaranta sú rovnako dobrým zdrojom minerálnych látok a vitamínov (Michalová, 1999). A čo je dôležité z hľadiska výživy ľudí, semená neobsahujú lepek (Žajová, 2006).

Využitie amaranta je mnohostranné – využíva sa k priamej konzumácii, je súčasťou mnohých potravinárskych výrobkov, surovinou pre ďalšie priemyselné odvetvia, nachádza uplatnenie i v krmivárstve. Semená amaranta sa používajú ako ingrediencia pri výrobe rôznych pekárskejších výrobkov, cestovín i detskej výživy (Dodok, 1997).

Amarant je svojimi vlastnosťami dôležitý ako prevencia pre všetky vekové kategórie. Výnimočne pozitívny význam má pre malé deti (lyzín podporuje tvorbu mozgových buniek) a pre športovcov (minerály, vitamíny, nenasýtené mastné kyseliny a kvalitná bielkovina podporujú rast svalové hmoty). U staršej generácie podporuje regeneráciu buniek a významne ovplyvňuje látkovú výmenu ([http 2](#)).

Amarant je v našich podmienkach novou netradičnou plodinou, preto sa jeho pestovanie ako alternatívnej plodiny zatiaľ overuje. Doteraz získané výsledky v podmienkach Slovenskej i Českej republiky svedčia o jeho vhodnosti do ekologických a alternatívnych foriem hospodárenia (Michalová, 1996).

2 Cieľ práce

Cieľom diplomovej práce bolo analyzovať vzorky šiestich druhov cereálií a pseudocereálií (pšenica, cirok, ovos, pohánka, amarant, jačmeň) z hľadiska možnosti ich využitia pre potreby bezlepkovej diéty.

V súvislosti s uvedeným bolo potrebné:

1. Zoštudovať a spracovať literatúru týkajúcu sa danej problematiky.
2. Analyzovať vzorky šiestich druhov cereálií a pseudocereálií z hľadiska niektorých biochemických ukazovateľov
 - stanovenie aktivity alfa-amylázy, kyslých, zásaditých a neutrálnych proteáz,
 - stanovenie celkového dusíka, obsahu bielkovín a zastúpenie jednotlivých bielkovinových frakcií,
 - výpočet koeficienta nutričnej kvality,
 - elektroforetické delenie zásobných bielkovín pomocou SDS-PAGE,
 - imunologická analýza ELISA testom.
3. Výsledky vyhodnotiť matematicko – štatistickými metódami.

3 Materiál a metodika

3.1 Biologický materiál

V práci bol použitý rastlinný materiál získaný z Génovej banky semenných druhov SR SCPV CVRV v Piešťanoch. Analyzovaných bolo šesť vzoriek: Ovos jarný (*Avena sativa* - Azúr, Aragon), Pohánka obyčajná (*Fagopyrum esculentum* – Bogatyr, Pyra), Cirok cukrový (*Sorghum dochna technicum* – Hemaize, B'cukrový), Amaranť (*Amaranthus L.* – Olpir, Amar 2R-R158), Pšenica letná, forma ozimná (*Triticum aestivum L.* – Lívia, Hana), Jačmeň jarný (*Hordeum vulgare L.* – Nitran, SK 5451).

3.2 Biochemické rozbory

3.2.1 Stanovenie celkového dusíka podľa Kjeldala

Princíp stanovenia

Stanovenie je založené na spaľovaní rastlinnej hmoty v Kjeldahlovej banke v prostredí koncentrovanej kyseliny sírovej a vhodného katalyzátora. Dusík viazaný v organickej hmote sa pri oxidácii v prostredí koncentrovanej kyseliny sírovej mení na amoniak, ktorý reaguje s kyselinou sírovou za vzniku síranu amónneho. Proces mineralizácie rastlinnej hmoty oxidáciou v prostredí horúcej kyseliny sírovej je veľmi zložitý. Kyselina sírová odoberá látke kyslík a vodík. Časť kyseliny sírovej sa varom rozkladá a uvoľňuje kyslík, ktorý oxiduje uhlík na oxid uhličitý. Zložité dusíkaté látky sa vplyvom kyseliny sírovej štiepia na jednoduchšie, až na oxid uhličitý, vodu a amoniak. Amoniak, ktorý reakciou vzniká, sa viaže na kyselinu sírovú a vzniká síran amónny. Zo síranu amónneho sa amoniak ako slabšia zásada vytesní prebytkom alkalického hydroxidu. Vytesnený amoniak sa predestiluje do predlohy so známym množstvom kyseliny sírovej (Michalík et al.,2008).

Vlastné stanovenie

Do suchej Kjeldahlovej banky sme odvážili 3 g mletého zrna, pridali sme 25 ml koncentrovanej kyseliny sírovej, zahriali a spaľovali. Po spálení sme vzorku kvantitatívne preniesli do 250 ml banky, doplnili sme destilovanou vodou a premiešali. Z roztoku sme odpipetovali 25 ml, pridali 30 % roztoku hydroxidu sodného v prebytku

a predestilovali sme do predlohy s $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ kyseliny sírovej. Nezreagovaný roztok kyseliny sírovej sme pretitrovali pomocou $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ hydroxidu sodného na metylčerveň. Od množstva kyseliny sírovej v predlohe sme odpočítali množstvo spotrebovaného $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ hydroxidu sodného, pričom pre výpočet sme vychádzali zo vzťahu, že $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ kyseliny sírovej zodpovedá 1,401 mg dusíka.

3.2.2 Výpočet hrubých bielkovín

Obsah bielkovín sme vypočítali prepočtom z obsahu celkového dusíka stanoveného podľa Kjeldahla nasledovne:

$$\% \text{ hrubých bielkovín} = \% \text{ N} \cdot \text{koeficient}$$

3.2.3 Spektrofotometrické stanovenie bielkovín podľa Bradforda

Princíp stanovenia

Podľa Gálovej et al. (2005) je princíp stanovenia založený na maxime absorpcie farbiva CBB-250 v jej kyslom roztoku po vytvorení komplexu proteínu a farbiva. Posun maxima je charakteristický pri vlnových dĺžkach zo 465 na 595 nm. Prírastok absorpcie pri 595 nm je po vytvorení kalibračnej krivky úmerný množstvu vytvoreného komplexu. Komplex proteínu a farbiva sa vytvorí v priebehu niekoľkých minút (5), má vysoký extinkčný koeficient a je stály až na jednu hodinu. Výhody tejto metódy sú v rýchlosti analýzy, vysokej citlivosti (1 mg), kompatibilite až k 61 interferenčným látkam a v jej nenáročnosti. Zvlášť pozoruhodná črta tohto typu metód je vysoká špecifita k proteínu spôsobujúca rozdielnu odozvu rôznych bielkovín. Aplikácia tejto metódy pri kvantifikácii heterogénnych zmesí bielkovín vyžaduje pozornú kalibráciu a prípravu inertných štandardov

Príprava roztokov

Zásobný roztok sme pripravili rozpustením 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 v 100 ml koncentrovanej 88 % H_3PO_4 . Pridali sme k tomu 47 ml koncentrovaného metanolu a zmiešali. Pracovný roztok sme pripravili zriedením 73,5 ml zásobného roztoku s 500 ml deionizovanej vody. Roztok prefiltrujeme do zásobnej fľaše cez modrý

filtračný papierik. Slepý pokus má byť okolo nuly (A_{595}). Koncentrát ako aj pracovný roztok sme uskladnili v chladničke.

Vlastné stanovenie

50 μ l filtrátu + 150 μ l extrakčného tlmivého roztoku spolu zmiešame. Z roztoku odpipetujeme 100 μ l, dáme do 5 ml roztoku Bradforda. Necháme stáť minimálne 5 minút a v priebehu 5-60 minút meriame absorbanciu pri vlnovej dĺžke 595 nm.

3.2.4 Stanovenie aktivity alfa-amylázy Spofa testom

Aktivitu alfa-amylázy sme stanovili tabletkami Spofa testu (Slovakofarma, a. s., Hlohovec).

Princíp stanovenia

Testovacie tabletky obsahujú nerozpustný škrob s kovalentne viazaným farbivom, zložky fosfátového tlmivého roztoku (pH 7), aktivátor enzýmu a ako neaktívnu zložku, mikrokryštalickú celulózu. Ak je v skúmanej vzorke prítomný enzým alfa-amylázy, tento hydrolyzuje nerozpustný farebný škrob, ktorý prechádza do roztoku a sfarbuje ho. Aktivita prítomnej alfa-amylázy je úmerná zafarbeniu roztoku meranému pri absorbancii 620 nm.

Extrakcia alfa-amylázy

Enzým sme extrahovali z 1 gramu čerstvo pomletého šrotu pšenice 5 ml 0,2 mol.dm⁻³ acetátového tlmivého roztoku pri laboratórnej teplote 24 °C. Alikvotné objemy číreho supernatantu sme použili na stanovenie aktivity alfa-amylázy.

Vlastné stanovenie

K 0,5 ml supernatantu sme pridali 1 ml 0,2 mol.dm⁻³ acetátového tlmivého roztoku (pH 5,5) a nechali temperovať 5 minút pri teplote 37 °C vo vodnom kúpeli. Pinzetou sme pridali 1 tabletu Spofa-testu a nechali inkubovať 15 minút pri teplote 37 °C bez premiešania. Po 15 minútach sme pridali 4 ml zastavovacieho roztoku (10 g Na₂CO₃ + 900 ml destilovaná voda + 100ml acetón), pričom sa reakčný roztok dobre

premiešal a potom sme reakčný roztok prefiltrovali. Absorbanciu číreho supernatantu sme merali pri 620 nm oproti slepému pokusu.

3.2.5 Stanovenie aktivity proteáz S-testom proteáza univerzál

Aktivitu alkalických, neutrálnych a kyslých proteáz sme stanovili tabletami S – test proteáza univerzál (Lachema Brno a. s.).

Princíp stanovenia

Účinnou zložkou tablety S- TEST proteáza univerzál je nerozpustný proteín s kovalentne viazaným farbivom, ktorý sa pôsobením proteolytických enzýmov hydrolyzuje a prechádza do roztoku vo forme rozpustných zafarbených peptidov. Intenzita zafarbenia filtrátu je úmerná aktivite prítomnej proteázy. Testovacia tableta neobsahuje zložky tlmivého roztoku, ktoré sa musia pridávať podľa potreby pri stanovení príslušných proteáz.

Príprava roztokov

Tlmivé roztoky: pripravili sme pre každý stanovený proteolytický enzým ako je uvedené v tabuľke:

Tabuľka 3 : Príprava reakčných roztokov

Typ proteáz	pH	Zložky tlmivého roztoku
Alkalické proteázy	8	4 g Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O + 0,2 g NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O + 1,5 g NaCl v 1000 ml dest. vody
Neutrálne proteázy	7	4 g Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O + 0,2 g NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O + 1,5 g NaCl v 1000 ml dest. vody
Kyslé proteázy	1,5	0,05-0,1 mol.dm ⁻³ .HCl
Zastavovací roztok		10 g Na ₂ CO ₃ + 100 ml acetónu + 900 ml dest. vody

Pracovný postup

Navážili sme 0,5 g pšeničného šrotu, pridali 10 ml príslušného fosfátového tlmivého roztoku a dali trepať na 15 minút. Potom sme roztok prefiltrovali do centrifugačných skúmaviek.

Vlastné stanovenie

Do skúmavky sme dali 0,5 ml zásobného roztoku o príslušnom pH a 0,1 ml enzýmu. Obsah skúmavky sme temperovali 5 minút pri teplote 37 °C. Po uplynutí daného času sme skúmavku vybrali z vodného kúpeľa a pridali sme 1 tabletu S-testu. Vzorku sme inkubovali 15 minút pri 37 °C. Po inkubácii sme pridali 4 ml zastavovacieho roztoku, reakčnú zmes sme dobre premiešali a nie skôr ako po 5 minútach sme vzorku prefiltrovali. Absorbancia číreho filtrátu sa meria oproti vode pri 620 nm v 1 cm kvete.

Z nameranej hodnoty absorbancie sa objemová aktivita vypočíta podľa vzorca:

$$\text{Objemová aktivita} = A : T \cdot 2.10^6$$

T absorbancia nameraná na úplnej hydrolyze testovanej tablety. Pre každú výrobnú šaržu je udaná zvlášť. Pre nás sa $T = 8,8$ pre kyslé a neutrálne proteázy, pre zásadité $T = 4,94$.

A absorbancia nameraná po reakcii vzorky pri 620 nm.

U jednotka proteolytickej aktivity. Zodpovedá aktivite, ktorá hydrolyzuje 1 mg chromolytického proteínového substrátu podľa vzorca:

$$\text{špecifická aktivity enzýmu} = \frac{\text{objemová aktivita enzýmu}}{\text{obsah bielkovín}}$$

3.2.6 Stanovenie frakčnej skladby bielkovín podľa Golenkova

Vlastné stanovenie

Pšeničné zrná sme zhomogenizovali na laboratórnom mlyne Frithish Pulveri Sette na zrnitosť 0,2 mm. Základné bielkovinové frakcie albumíny (Alb), globulíny (Glo),

prolamíny (Pro) a glutelíny (Glu) sme získali extrakciou v príslušných rozpúšťadlách podľa unifikovanej Golenkovej metódy (ICC metóda) (Michalík, 2002).

Albumíny a globulíny sme extrahovali 10 %-ným chloridom sodným (1. frakcia), prolamíny 70 %-ným etanolom (2. frakcia), glutelíny 0,2 %-ným hydroxidom sodným (3. frakcia) a nakoniec nám ostal nerozpustný zvyšok (4. frakcia). Každú extrakciu sme opakovali 3-krát a v supernatantoch 1, 2, 3 a vo frakcii nerozpustného zvyšku 4 sme stanovili obsah dusíka podľa Kjeldahla, ďalej sme urobili prepočet na sušinu a vypočítali percentuálne zastúpenie jednotlivých frakcii nasledovne:

$$N1 + N2 + N3 + N4 = N \text{ sum}$$

$$\text{obsah Alb + Glo (\%)} = \frac{N1}{N \text{ sum}} \qquad \text{obsah Pro (\%)} = \frac{N2}{N \text{ sum}}$$

$$\text{obsah Glu (\%)} = \frac{N3}{N \text{ sum}} \qquad \text{obsah zvyšku (\%)} = \frac{N4}{N \text{ sum}}$$

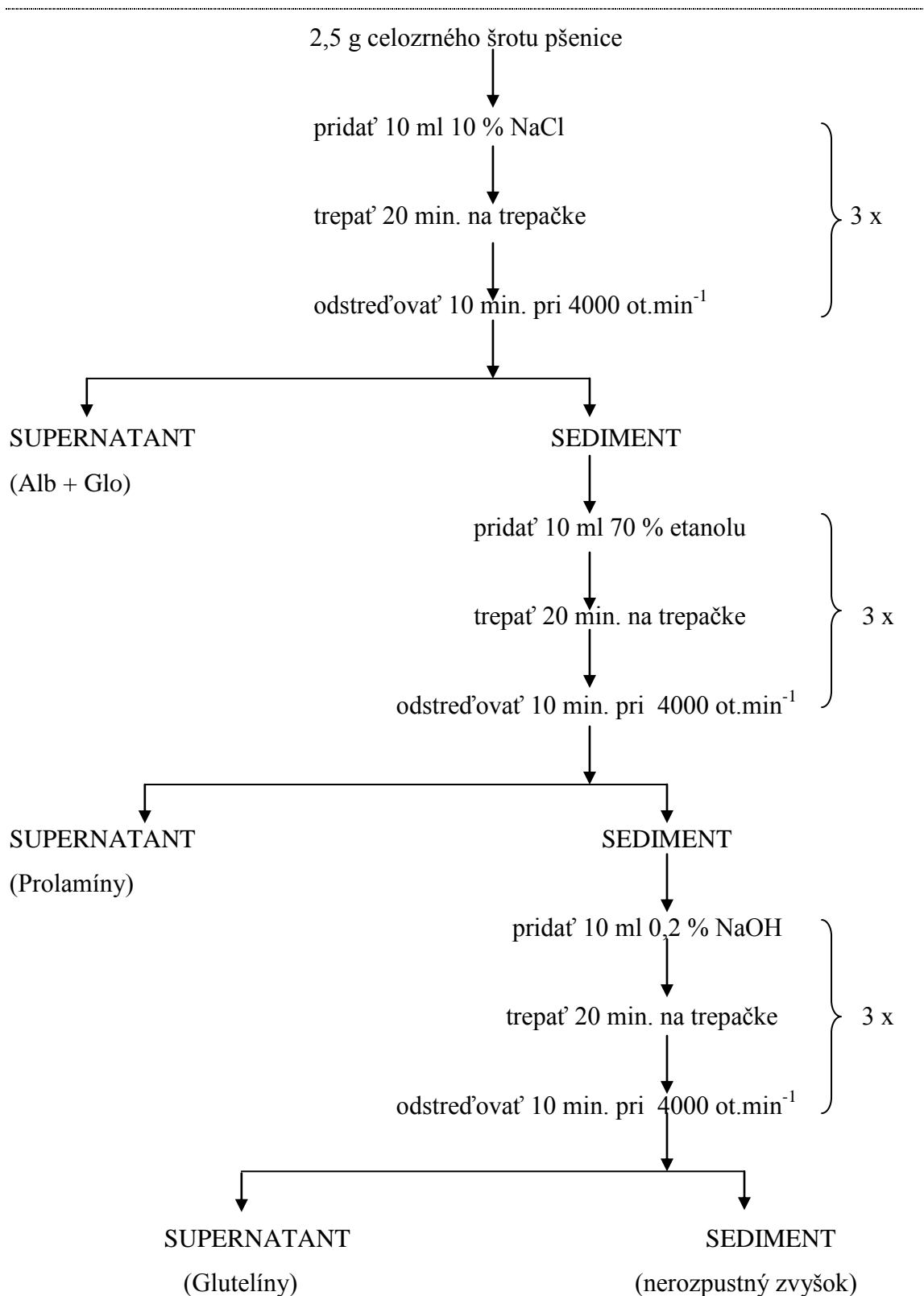
Obsahy jednotlivých frakcií sme použili pre výpočet koeficientu nutričnej kvality (KNK):

$$\frac{\text{Alb + Glo + Zvyšok}}{\text{Pro}} \times 100$$

Ďalej sme počítali vzájomné interakčné vzťahy medzi jednotlivými bielkovinovými frakciami:

Pro + Glu – súčet lepkotvorných bielkovín (gliadíny, gluteníny)

Pro : Glu – pomer lepkotvorných bielkovín, ktorý charakterizuje do určitej miery vlastnosti lepku



Obrázok 5 : Schéma izolácie jednotlivých bielkovinových frakcií podľa Golenkova (ICC metóda)

3.2.7 Elektroforetické delenie zásobných bielkovín

Princíp stanovenia

Separácia denaturovaných proteínov prebieha v prostredí jednosmerného elektrického prúdu v polyakrylamidovom géli za prítomnosti SDS ako činidla eliminujúceho náboj smerom k anóde na základe ich molekulovej hmotnosti. Vlastné stanovenie sme uskutočnili podľa metodiky odporúčanej medzinárodnou organizáciou ISTA, ISTA SDS-PAGE (Wrigley, 1992).

Príprava deliaceho gélu

11,43 ml 1 mol.dm⁻³ Tris-HCl (pH 8,8)

17,48 ml roztoku AA-BIS (54,49 g akrylamidu a 0,72 g N,N'-metylénbisakrylamidu v objeme 250 ml)

0,3 ml 10 % (w/v) roztoku SDS

0,76 ml 4 % (w/v) roztoku persíranu amónneho

0,06 ml TEMED

Príprava štarovacieho gélu

1,236 ml 1 mol.dm⁻³ Tris-HCl (pH 6,8)

8,3 ml roztoku AA-BIS (7,29 g akrylamidu a 0,125 g N,N'-metylénbisakrylamidu v objeme 100 ml)

0,1 ml 10 % (w/v) roztoku SDS

0,8 ml 2 % (w/v) roztoku persíranu amónneho

0,03 ml TEMED

Zloženie elektródového tlmivého roztoku

28,2 g glycínu

3 g Tris-HCl

2 g SDS v objeme 2000 ml

Zloženie zásobného roztoku pre extrakciu glutenínov

12,5 ml 1 mol.dm⁻³ Tris-HCl (pH 6,8)

20 ml glycerolu

24,1 ml redetilovanej vody

4,0 g SDS

20,0 mg Pyronín G (prípadne Y)

Extrakcia glutenínov

Pred každou extrakciou sme pripravili čerstvý extrakčný roztok zmiešaním 4,25 ml zásobného roztoku + 0,75 ml 2-merkaptotanolu + 10 ml redestilovanej vody. Glutenínové podjednotky sme extrahovali z mechanicky homogenizovaných suchých zlyofilizovaných vzoriek zrn. Na 1 mg rozdrveného zrna sme pridali 8 μ l extrakčného roztoku. Po dobu 30 minút a pri teplote 25 °C sa vzorky trepli na trepačke. Takto vyextrahované vzorky sme 15 minút inkubovali pri teplote 100 °C vo vodnom kúpeli. Po ich ochladení a odcentrifugovaní (15000 ot/min, 10 min) sme supernatant zliali do vopred pripravených nových skúmaviek.

Pracovný postup

Sklá sme dôkladne umyli, vysušili a mastné nečistoty sme odstránili etanolom. Medzi sklá pravého a ľavého okraja sme umiestnili tesnenia, sústavu spevnenú svorkami sme umiestnili do stojana. Pripravený deliaci gél sme opatrne premiešali pipetou a vliali medzi platne do výšky asi 1,5 cm od horného okraja. Na vyrovnanie hladiny gélu sme použili pár kvapiek butanolu. Deliaci gél sme nechali polymerizovať. Premiešaný štarovací gél sme navrstvili na deliaci a rýchlo umiestnili hrebeň, nakoľko štarovací gél rýchlo polymerizuje. Po stuhnutí gélu sme hrebeň opatrne vytiahli a komôrky sme vyčistili filtračným papierom; do každej komôrky sme naniesli 5 μ l vzorky. Platne s nanesenými vzorkami sme umiestnili do elektroforetickej komory a naliali sme elektródový roztok. Elektroforetické delenie prebiehalo pri 10 mA, 500 V a 50 W približne 6 – 10 hodín, pri konštantnej teplote 15 °C, až kým farbička Pyronín G nedosiahol koniec gélu.

Farbenie gélu

Gély sa farbía celú noc v roztoku obsahujúcom 190 ml 10 % kyseliny trichlóroctovej s 10 ml 0,5 % Coomasie brilliant blue R 250 v etanole. Po zafarbení farbu zlejeme a gél odfarbujeme v destilovanej vode do bezfarebného pozadia.

3.2.8 Enzýmová imunoanalýza pre kvantitatívnu analýzu gliadínu (Kat.č. R7001)

ELISA – enzýmová imunoabsorbčná analýza (Enzyme Linked ImunnoSorbent Assay)

je metóda detekcie a kvantifikácie látok, založená na princípe špecifickej väzby medzi antigénom a zodpovedajúcou protilátkou.

Imunologickú analýzu sme robili pomocou komerčného testu **RIDASCREEN® Gliadin** pre kvantitatívne stanovenie gliadínov. Vo vzorkách bola stanovená absorbancia roztoku pri 450 nm.

Zo zostrojenej kalibračnej krivky sme zistili hodnotu koncentrácie gliadínu.

Test a potrebné chemikálie sme vybrali z chladničky 1 hodinu pred vlastným stanovením a nechali ich temperovať na laboratórnu teplotu. Pred samotným použitím sme jednotlivé fľaštičky jemne premiešali. Dôležitý je aj krok premývania. Bolo potrebné zabezpečiť, aby sa platnička nevysušila medzi jednotlivými krokmi.

Princíp testu

Princípom testu je antigén-protilátková reakcia. Jamky mikrotitračnej platničky sú pokryté špecifickými protilátkami pre gliadín. Po prídavku roztoku vzorky vzniká antigén-protilátkový komplex (Ab-Ag-komplex). Pridaný enzýmový (peroxidázový) konjugát sa naviaže k Ab-Ag-komplexu a vzniká protilátka-antigén-protilátka komplex (sendvičový komplex). Po prídavku roztoku substrátu (peroxid močoviny) a chromogénu (tetrametylbenzidín) sa jamky inkubujú. Naviazaný enzýmový konjugát zmení bezfarebný chromogén na modrý produkt. Pridanie zastavovacieho roztoku spôsobí zmenu farby z modrej na žltú. Meranie prebieha fotometricky pri 450 nm. Absorbancia je priamo úmerná koncentrácii gliadínu vo vzorke.

Extrakcia koktejlovým roztokom (oficiálna AOAC-RI metóda)

Odporúča sa pracovať v digestore, pretože koktejlový roztok obsahuje β -merkaptotenol. Navážili sme 0,25 g zhomogenizovanej vzorky, pridali 2,5 ml koktejlového roztoku, uzatvorili a dobre premiešali. Ďalej sme vzorky inkubovali 40 minút pri 50°C. Vzorku sme nechali vychladnúť a potom zmiešali s 7,5 ml 80 % etanolu. Uzatvorili a nechali miešať 1 hodinu v trepačke pri izbovej teplote (20 - 25°C).

Postup testu

1. Potrebné množstvo jamiek sme vložili do mikrotitračného držiaka. Všetky štandardy a vzorky sme aplikovali dvakrát.

-
2. Do jednotlivých jamiek sme pridali po 100 μ l štandardných roztokov a pripravených vzoriek a nechali inkubovať 30 minút pri izbovej teplote (20 - 25°C).
 3. Vyliali sme tekutinu z jamiek a držiak s jamkami otočenými vrchnou stranou dole sme vyklepali na absorpčný papier (3 krát po sebe) a odstánili sme tak všetku prebytočnú tekutinu z jamiek. Jamky sme premyli 250 μ l zriedeného premývacieho tlmivého roztoku a vyliali. Tento premývací proces sme opakovali ešte dvakrát.
 4. Pridali sme 100 μ l zriedeného enzýmového konjugátu do každej jamky a nechali inkubovať 30 minút pri izbovej teplote (20 - 25°C).
 5. Tekutinu sme vyliali z jamiek a držiak s jamkami otočenými vrchnou stranou dole sme prudko vyklepali na absorpčný papier (3 krát po sebe) a odstránili tak všetku tekutinu z jamiek. Jamky sme naplnili 250 μ l zriedeného premývacieho tlmivého roztoku a vyliali. Tento premývací proces sme opakovali ešte dvakrát.
 6. Do každej jamky sme potom pridali 50 μ l substrátu a 50 μ l chromogénu. Ručným kývavým pohybom platničky sme jamky jemne premiešali a inkubovali 30 minút v tme pri izbovej teplote 20 - 25°C.
 7. Napokon sme do každej jamky pridali 100 μ l zastavovacieho roztoku. Ručným kývavým pohybom platničky sme jamky jemne premiešali a zmerali absorbanciu pri 450 nm. Použili sme reader EL800 od firmy BioTek.
 8. Vzorky sme vyhodnotili pomocou vyhodnocovacieho programu Gen 5 1.06.

3.2.9 Matematicko – štatistické vyhodnotenie

Získané výsledky sme vyhodnotili matematicko – štatistickými metódami pomocou programu Statgraphic verzia 5.0. Počítali sme priemer, smerodajnú odchýlku, minimum, maximum a variačný koeficient. Výsledky imunoanalýzy sme vyhodnotili pomocou programu Gen 5 1.06.

4 Výsledky a diskusia

Celiakia je zápalové ochorenie malej intestinálnej sliznice tenkého čreva (Wieser, 2008). Vzniká po príjme gluténu v potrave, resp. ho vyvolávajú určité aminokyselinové sekvencie a z nich vytvorená sekundárna štruktúra peptidov, nachádzajúce sa v prolamínoch pšenice, raže a jačmeňa (gliadíny, sekalíny a hordeíny).

Toxickým faktorom, ktorý vyvoláva poškodenie funkcie črevnej sliznice, je prolamínová frakcia zásobných bielkovín v zrne obilnín. Podstatou je deaminácia gliadínu enzýmom transglutamináza (tTG) a následná aktivácia cytotoxických T-buniek, a tým zmena protilátkovej a bunkovej imunitnej odpovede. T-bunky spôsobujú deštrukciu klkov črevného epitelu a rovnako aj tvorbu protilátok proti gliadínu a transglutamináze (Faulkner – Hogg et al., 2009).

Základným opatrením je prísna bezlepková diéta, ktorej podstatou je vylúčenie všetkých potravín obsahujúcich lepok. Hoci poškodenie sliznice tenkého čreva vyvolávajú predovšetkým prolamíny pšenice (gliadíny), z potravy treba vylúčiť aj prolamíny ďalších obilnín ako raže (sekalíny), jačmeňa (hordeíny) a ovsu (aveníny). Kopálová (2008) uvádza, že diéta je pri liečbe na prvom mieste, ak ju pacient dodržiava, nie sú potrebné žiadne lieky.

V súčasnosti sa pozornosť zameriava na využitie pseudocereálií z hľadiska rozšírenia sortimentu potravín pri bezlepkovej diéte. V nadväznosti na uvedené sme sa v našej práci zamerali na hodnotenie šiestich druhov cereálií a pseudocereálií, pričom každý druh bol reprezentovaný dvomi genotypmi.

V celozrnnom šrote vzoriek bol stanovený obsah celkového dusíka. Z našich výsledkov (tab. 4) vyplýva, že obsah celkového dusíka sa pohyboval v rozmedzí od 1,21 % do 1,99 %, pričom priemerná hodnota bola 1,63 %. Najvyššiu hodnotu sme zistili vo vzorke pšenice Livia (1,99 %) a naopak najnižšia hodnota bola zistená vo vzorke jačmeňa Nitran (1,21 %). Veľkosť smerodajnej odchýlky je 0,25 %.

Bielkoviny sú prvým produktom expresie génov a sú dôležité z hľadiska nutričného a technologického. Z celkového obsahu dusíka bol vypočítaný obsah hrubých bielkovín pomocou prepočítacích koeficientov. Z výsledkov uvedených v tabuľke 4 vyplýva, že obsah bielkovín varíruje v závislosti od druhu plodiny v rozmedzí hodnôt od 6,87 % do 11,35 %, pričom najvyšší obsah bielkovín bol zistený v pšenici Livia (11,35 %) a najnižší obsah v jačmeni Nitran (6,87 %), čo je o 39,47 %

menej. Obsah bielkovín mal klesajúci trend v analyzovaných vzorkách nasledovne: amarant (v priemere 11,00 %), pšenica (v priemere 10,15 %), ovos (v priemere 9,89 %), pohánka (v priemere 9,805 %), cirok (v priemere 8,39 %) a jačmeň (v priemere 7,61 %). Priemerná hodnota obsahu bielkovín v analyzovaných vzorkách bola 9,48 %. Naše analýzy potvrdili aj výsledky Muchovej (2001), ktorá uvádza, že obsah bielkovín v zrne pšenice sa pohybuje od 8 % do 20 %, pričom priemerný obsah je v rozsahu od 12 % do 13,3 %. Gálová et al. (2006) udáva priemerný obsah bielkovín v ciroku zrnovom aj cukrovom 9,8 %, v pohánke 6,7 %. Podľa Michalíka et al. (2006) klimatické podmienky, predovšetkým teplo a vlhko rozhodujú o využívaní primárnych fotosyntetických produktoch na cieľnú syntézu bielkovín a škrobu. z tohto dôvodu obsah bielkovín v tej istej odrode závisí od podmienok pestovania.

Tabuľka 4 : Obsah celkového dusíka, hrubých bielkovín a koeficienta nutričnej kvality v analyzovaných vzorkách

DRUH / ODRODA	N_c , %	HB, %	KNK, %
Pšenica / Livia	1,99	11,35	65,63
Pšenica / Hana	1,57	8,96	87,41
Amarant / Olpir	1,89	10,8	2226,92
Amarant / Amar 2R- R158	1,96	11,20	2780,77
Cirok / Hemaize	1,29	7,36	166,76
Cirok / B' cukrový	1,66	9,43	140,98
Pohánka / Bogatyr	1,59	9,51	1546,79
Pohánka / Pyra	1,68	10,10	2641,58
Ovos / Azúr	1,68	9,81	184,45
Ovos / Aragon	1,71	9,98	183,62
Jačmeň / Nitran	1,21	6,87	141,34
Jačmeň / SK 5451	1,35	8,35	151,41
Priemer	1,63	9,48	859,81
Smerodajná odchýlka	0,25	1,41	1102,12
Minimum	1,21	6,87	65,63
Maximum	1,99	11,35	2780,77
Variačný koeficient, %	15,48	14,84	1,28

Vysvetlivky: N_c- celkový dusík, HB- hrubé bielkoviny, KNK- koeficient nutričnej kvality

Koeficient nutričnej kvality (KNK) udáva výživovú a nutričnú kvalitu jednotlivých plodín. Z výsledkov z tabuľky 4 možno vidieť, že najvyššiu hodnotu (KNK) dosiahol amarant (v priemere 2503,85 %) a pohánka (2094,19 %). Najnižšiu výživovú kvalitu a teda najnižší koeficient nutričnej kvality sme zistili v pšenici (v priemere 76,52 %). Ovos, cirok a jačmeň vykázali hodnoty od 140,98 % do 184,45 %. Ďalej sme určili priemernú hodnotu koeficienta nutričnej kvality 859,81 % a variačný koeficient (1,28 %).

Tabuľka 5 : Percentuálne zastúpenie bielkovinových frakcií v analyzovaných vzorkách

DRUH / ODRODA	Alb + Glo	Pro	Glu	Zvyšok	pro+glu	pro/glu
Pšenica / Lívia	22,24	43,67	27,16	6,42	70,83	1,61
Pšenica / Hana	25,53	38,38	27,88	8,02	66,26	1,38
Amarant / Olpir	52,43	3,12	26,35	17,05	29,47	0,12
Amarant/ Amar 2R-158	52,85	2,60	24,69	19,45	27,29	0,11
Cirok / Hemaize	19,6	32,61	12,63	34,78	45,24	2,58
Cirok/ B'cukrový	10,51	33,90	17,46	37,28	51,36	1,94
Pohánka / Bogatyr	50,47	4,98	17,35	26,56	22,33	0,29
Pohánka / Pyra	45,04	3,03	15,03	35,00	18,06	0,20
Ovos / Azúr	21,69	17,17	50,03	9,98	67,20	0,34
Ovos/ Aragon	19,34	16,42	52,48	10,81	68,90	0,31
Jačmeň /Nitran	29,52	29,10	27,94	11,61	57,04	1,04
Jačmeň / SK 5451	29,77	26,28	33,33	10,02	59,61	0,79
Priemer	31,58	20,94	27,69	18,92	48,63	0,89
Smerodajná odchýlka	14,75	15,03	12,63	11,53	19,58	0,82
Minimum	10,51	2,60	12,63	6,42	18,06	0,11
Maximum	52,85	43,67	52,48	37,28	70,83	2,58
Variačný koeficient, %	46,69	71,77	45,61	60,97	0,40	0,92

Vysvetlivky: alb+glo-albumíny +globulíny, pro-prolamíny, glu-glutelíny

Bielkovinový komplex zrna analyzovaných cereálií a pseudocereálií je možné rôznymi extrakčnými činidlami rozdeliť na frakcie albumínov a globulínov, rozpustných v NaCl, prolamínov, rozpustných v etanole a glutelínov, rozpustných

v NaOH. Albumíny a globulíny (protoplazmatické bielkoviny) sú dôležité z nutričného hľadiska, nakoľko sa vyznačujú priaznivým aminokyselinovým zastúpením najmä esenciálnych aminokyselín. Prolamíny a glutelíny (zásobné bielkoviny) sú charakteristické nízkym obsahom esenciálnych aminokyselín, sú súčasťou lepku a rozhodujú predovšetkým o technologických vlastnostiach zŕn (Michalík, 1994). Z hľadiska možného využitia pseudocereálií vo výžive celiakov je dôležité poznať obsah jednotlivých bielkovinových frakcií, predovšetkým frakcie prolaminových bielkovín, ktoré sú zodpovedné za ochorenie (Kopálová, 2008).

Nízka rozpustnosť a hydrolyzovateľnosť zásobných bielkovín, nízky obsah a nevyrovnané zastúpenie esenciálnych aminokyselín prolaminových bielkovín ich zaraďuje z výživového hľadiska medzi bielkoviny, ktoré nie sú plnohodnotné (Gálová, 1997).

Albumíny sú bielkoviny rozpustné vo vode pri slabokyslej alebo neutrálnej reakcii. Globulíny sú bielkoviny rozpustné v roztokoch neutrálnych solí. Z našich výsledkov vyplýva, že zastúpenie albumínov a globulínov (tab. 5) v analyzovaných vzorkách sa pohybovalo od 10,51 % do 52,85 %. Variačný koeficient je vysoký – 46,69 %. Najvyššie zastúpenie cytoplazmatických bielkovín sme stanovili v amarante (v priemere 52,64 %) a v pohánke (v priemere 47,75 %). Najnižšie zastúpenie vykázal cirok (v priemere 15,05 %), čo svedčí o jeho nízkej výživovej kvalite. Závery Michalíka et al. (2006), ktorý udáva percentuálne zastúpenie frakcie albumínov a globulínov pri pšenici 24,18 %, pri amarante 56,17 % a pri pohánke 50,0 % sme našimi výsledkami potvrdili. Z uvedeného ďalej vyplýva, že dominantnou frakciou v amarante a pohánke sú nutrične vysokohodnotné cytoplazmatické bielkoviny, ktoré sa približujú strukovinám, čo potvrdzuje aj Michalík et al. (2006).

Veľmi podobné rozdielne zastúpenie sme pozorovali aj v zásobných bielkovinách, ktoré sú dôležité z hľadiska technologickej kvality. Prolamíny pšenice resp. gliadíny sú významnou súčasťou lepkového komplexu, pôsobia preto výrazne na akosť múky (Kopálová, 2008). Percentuálne zastúpenie frakcie prolaminov bolo v rozsahu od 2,60 % do 43,67 % s variačným koeficientom 71,77 % a smerodajnou odchýlkou 12,63 %. Najvyššiu hodnotu sme zistili v pšenici (v priemere 41,03 %), ciroku (v priemere 33,25 %) a jačmeni (v priemere 27,69 %). Stredné zastúpenie mal ovos (v priemere 16,80 %). Naopak amarant s obsahom prolaminov v priemere 2,86 % a pohánka s priemerom 4 % vyhovujú požiadavkám pre obsah

prolamínov pri výrobe bezlepkových potravín. Podľa platnej legislatívy plodinu, ktorá vykazuje obsah prolamínov do 6 % je možné použiť na výrobu bezlepkových potravín.

Zastúpenie frakcie glutelínov variovalo v rozmedzí od 12,63 % do 52,48 %. Najvyššie hodnoty sme zistili v ovsí (v priemere 51,25 %), jačmeni (v priemere 30,64 %), pšenici (v priemere 27,52 %) a v amarante (v priemere 25,52 %). Najnižšie zastúpenie sme zistili v ciroku (v priemere 15,04 %) a pohánke (v priemere 16,19 %).

Z výsledkov z tabuľky 5 ďalej vyplýva, že plodiny s najvyšším percentuálnym zastúpením zásobných bielkovín prolamínov a glutelínov sú pšenica, jačmeň, ovos a cirok. K plodinám s nižším obsahom zásobných bielkovín a teda aj s nižšou technologickou kvalitou môžeme zaradiť pohánku a amarant.

Tabuľka 6 : Aktivita alfa- amylázy v analyzovaných vzorkách

DRUH / ODRODA	OA ($\mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$)	OB ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	ŠA ($\mu\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1}$). 10^{-3}
Pšenica / Lívia	1,51	6,01	0,25
Pšenica / Hana	3,15	5,03	0,63
Amarant / Olpir	4,29	5,77	0,74
Amarant / Amar 2R-R158	3,15	5,89	0,53
Cirok / Hemaize	2,22	4,42	0,50
Cirok / B'cukrový	3,38	3,44	0,98
Pohánka / Bogatyr	1,03	4,42	0,23
Pohánka / Pyra	8,60	6,01	1,43
Ovos / Azúr	1,03	4,05	0,25
Ovos / Aragon	3,15	3,68	0,86
Jačmeň / Nitran	3,15	5,64	0,56
Jačmeň / SK 5451	2,92	4,05	0,72
Priemer	3,13	4,87	0,64
Smerodajná odchýlka	1,99	0,97	0,34
Minimum	1,03	3,44	0,23
Maximum	8,60	6,01	1,43
Variačný koeficient, %	63,60	19,86	53,81

Vysvetlivky: OA – objemová aktivita, OB – obsah bielkovín, ŠA – špecifická aktivita

Hydrolytické enzýmy majú veľký význam z hľadiska kvality zrna, nakoľko determinujú výživnú, technologickú a osivársku hodnotu zrna. K najvýznamnejším

patria amylolytické a proteolytické enzýmy (Urminská, Michalík, 1996). Vysoký obsah alfa-amylázy počas dozrievania pšenice zodpovedá za odchýlky hodnôt významných technologických parametrov zrna. Z uvedeného je zrejmé, že aktivita alfa-amylázy je dôležitou charakteristikou ovplyvňujúcou technologickú kvalitu zrna. Klíčenie zrna je sprevádzané prudkým nárastom aktivity hydrolytických enzýmov, čo má za následok zníženie pekárskej kvality múky (Gálová, 1997).

Sledovali sme dva typy hydrolytických enzýmov, a to alfa-amylázy (ovplyvňujú chlebopekárenskú kvalitu produktov) a proteázy (zásadité, neutrálne, kyslé), ktoré sa nachádzajú najmä v klíčku a v aleurónovej vrstve zrna.

Amylázy sú enzýmy, ktoré hydrolyticky štiepia škrob. Z výsledkov tabuľky 6 vyplýva, že špecifická aktivita sa pohybuje od $0,23 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 10^{-3}$ do $1,43 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 10^{-3}$. V priemere je to $0,64 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 10^{-3}$. Zistili sme, že aktivita alfa-amylázy je v zrne resp. v semene v plnej biologickej zrelosti nízka, čo sa priaznivo odráža na štruktúre a kvalite lepku a v konečnom dôsledku na dobrej technologickej kvalite múky. Uvedené je v súlade s výsledkami Urminskej a Michalíka (1996), ktorí uvádzajú, že zdravé a suché zrná rôznych obilnín vykazujú relatívne nízke aktivity rôznych amyláz, čo umožňuje ich dobrú skladovateľnosť. Najvyššiu špecifickú aktivitu sme pozorovali pri pohánke (v priemere $0,83 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 10^{-3}$), a ciroku (v priemere $0,74 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 10^{-3}$), najnižšiu pri pšenici (v priemere $0,44 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 10^{-3}$).

Proteázy sú hydrolytické enzýmy štiepiace peptidové väzby v bielkovinách a peptidoch až na aminokyseliny.

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že špecifická aktivita neutrálnych proteáz (tabuľka 7) sa pohybuje v priemere okolo $0,45 \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Najvyššiu hodnotu sme zistili v pšenici Lívia ($0,82 \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) a najnižšiu aktivitu dosiahli pohánka a ovos (v priemere $0,26 \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ a $0,03 \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$), čo predstavuje u pohánky o 68 % nižšiu hodnotu v porovnaní so pšenicom a u ovsa dokonca až o 96 %.

Špecifická aktivita kyslých proteáz (tabuľka 8) bola tiež nízka. Výnimkou bola vzorka amarantu Amar 2R-R158, kde hodnota aktivity dosiahla až $10,66 \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Priemerná hodnota špecifickej aktivity zásaditých proteáz (tab.9) bola $0,62 \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Minimálnu hodnotu dosahoval amarant Olpir a pohánka Bogatyr (obe vzorky $0,06 \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) a maximálnu hodnotu sme zistili vo vzorke amarantu amr 2R-R158 ($1,37 \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$), čo je o 95,6 % viac.

Tabuľka 7 : Aktivita neutrálnych proteáz v analyzovaných vzorkách

DRUH / ODRODA	OA (U·dm⁻³)	OB (mg·ml⁻¹)	ŠA (U·mg⁻¹)
Pšenica / Livia	3409,09	4,17	0,82
Pšenica / Hana	2272,72	5,03	0,45
Amarant / Olpir	3409,09	5,03	0,67
Amarant / Amar 2R-R158	3409,09	5,64	0,60
Cirok / Hemaize	2272,60	3,68	0,62
Cirok / B'cukrový	3409,09	4,29	0,79
Pohánka / Bogatyr	227,20	4,42	0,05
Pohánka / Pyra	2272,72	4,79	0,47
Ovos / Azúr	227,20	3,68	0,06
Ovos / Aragon	nedetekovateľné	nedetekovateľné	nedetekovateľné
Jačmeň / Nitran	2272,72	4,79	0,47
Jačmeň / SK 5451	2272,72	4,66	0,49
Priemer	2121,19	4,18	0,45
Smerodajná odchýlka	1294,16	1,43	0,28
Minimum	nedetekovateľné	nedetekovateľné	nedetekovateľné
Maximum	3409,09	5,64	0,82
Variačný koeficient, %	61,01	34,27	61,38

Vysvetlivky: OA – objemová aktivita, OB – obsah bielkovín, ŠA – špecifická aktivita

Tabuľka 8 : Aktivita kyslých proteáz v analyzovaných vzorkách

DRUH / ODRODA	OA (U·dm⁻³)	OB (mg·ml⁻¹)	ŠA (U·mg⁻¹)
Pšenica / Livia	227,20	4,05	0,06
Pšenica / Hana	nedetekovateľné	4,66	nedetekovateľné
Amarant / Olpir	227,20	4,05	0,06
Amarant / Amar 2R-R158	43181,81	4,05	10,66
Cirok / Hemaize	227,20	3,68	0,06
Cirok / B'cukrový	nedetekovateľné	3,68	nedetekovateľné
Pohánka / Bogatyr	227,20	4,05	0,06
Pohánka / Pyra	1136,36	4,42	0,26
Ovos / Azúr	227,20	4,42	0,05
Ovos / Aragon	nedetekovateľné	5,40	nedetekovateľné
Jačmeň / Nitran	nedetekovateľné	4,05	nedetekovateľné
Jačmeň / SK 5451	nedetekovateľné	4,30	nedetekovateľné
Priemer	3787,78	2,78	0,93
Smerodajná odchýlka	12409,6	2,07	3,06
Minimum	nedetekovateľné	3,68	nedetekovateľné
Maximum	43181	4,66	10,66
Variačný koeficient, %	327,62	74,38	328,05

Vysvetlivky: OA – objemová aktivita, OB – obsah bielkovín, ŠA – špecifická aktivita

Z výsledkov uvedených v tabuľkách 6, 7, 8 a 9 vyplýva, že v analyzovaných vzorkách pseudocereálií bola aktivita hydroláz nízka, čo signalizuje ich dobrú technologickú a nutričnú kvalitu.

Tabuľka 9 : Aktivita zásaditých proteáz v analyzovaných vzorkách

DRUH / ODRODA	OA (U·dm ⁻³)	OB (mg·ml ⁻¹)	ŠA (U·mg ⁻¹)
Pšenica / Lívia	404,80	6,14	0,07
Pšenica / Hana	4048,58	5,03	0,80
Amarant / Olpir	404,80	6,38	0,06
Amarant / Amar 2R-R158	8097,16	5,89	1,37
Cirok / Hemaize	404,80	5,76	0,07
Cirok / B'cukrový	4048,58	4,66	0,87
Pohánka / Bogatyr	404,80	6,62	0,06
Pohánka / Pyra	6072,88	5,89	1,03
Ovos / Azúr	6072,80	5,77	1,05
Ovos / Aragon	4048,58	4,79	0,85
Jačmeň / Nitran	2024,29	5,15	0,39
Jačmeň / SK 5451	4048,58	4,91	0,82
Priemer	3340,05	5,58	0,62
Smerodajná odchýlka	2624,51	0,65	0,47
Minimum	404,80	4,66	0,06
Maximum	8097,16	6,62	1,37
Variačný koeficient, %	78,58	11,71	75,16

Vysvetlivky: OA – objemová aktivita, OB – obsah bielkovín, ŠA – špecifická aktivita

Aggregovaný glutén možno na základe molekulovej hmotnosti jeho podjednotiek diferencovať na nízkomolekulárne komponenty gluténu (LMW-GS) a vysokomolekulárne komponenty gluténu (HMW-GS) (Gálová et al., 2006).

Elektroforéza v prítomnosti SDS – SDS PAGE je jednoduchá, rýchla a reprodukovateľná metóda pre kvalifikovanú charakterizáciu a porovnanie bielkovín. Táto metóda separuje bielkoviny na základe rozdielnej relatívnej molekulovej hmotnosti. (http 3).

Z elektroforeogramov (obr. 26) vyplýva, že HMW-GS subjednotky sa separujú v prvej tretine polyakrylamidového gélu. Ich najnižšie zastúpenie (tab.10) vykázali obe odrody ciroku (v priemere 0,01%), ďalej amarant (v priemere 1,095%) a ovos (v priemere 1,675%). Najvyššie zastúpenie sme zaznamenali v pšenici Lívia (28,405%). Nízkomolekulové glutenínové podjednotky (LMW-GS) sa separujú v druhej tretine

gél. Ich zastúpenie sa pohybovalo od 2,48% do 60,99%. Medzi plodiny s najvyšším percentuálnym zastúpením patria obe odrody pšenice (v priemere 57,75%), pohánky (v priemere 52,87%), amarantu (v priemere 49,28%) a jačmeňa (v priemere 45,10%). Nižšie hodnoty boli zistené pri ciroku (v priemere 16,54%) a ovsí (v priemere 26,84%), pričom rozdiely medzi ich zastúpením v jednotlivých odrodách široko varírovali. Uvedené je v súlade s výsledkami práce Michalíka et al. (2006), ktorí uvádza priemerné zastúpenie LMW pri obilninách 58,72 % a pri pseudoobilninách 41,71 %.

Tabuľka 10 : Kvantitatívne vyhodnotenie SDS-PAGE analýzy zásobných bielkovín v percentách

DRUH / ODRODA	HMW-GS, %	LMW-GS + GLI, %	ALB + GLO, %
Pšenica / Lívia	28,405	60,99	10,605
Pšenica / Hana	11,46	54,50	34,04
Amarant / Olpir	1,87	48,78	49,37
Amarant / Amar-2R-R158	0,32	49,78	49,90
Cirok / Hemaize	nedetekovateľné	30,60	69,41
Cirok / B'cukrový	0,02	2,48	97,50
Pohánka / Bogatyr	3,40	54,40	42,21
Pohánka / Pyra	3,42	51,34	45,24
Ovos / Azúr	2,56	49,06	48,38
Ovos / Aragon	0,79	4,62	94,59
Jačmeň / Nitran	7,82	40,13	52,05
Jačmeň / SK 5451	5,53	50,08	44,39
Priemer	5,47	41,40	53,14
Smerodajná odchýlka	8,01	19,23	24,18
Minimum	nedetekovateľné	2,48	10,605
Maximum	28,405	60,99	97,5
Variačný koeficient, %	1,47	0,46	0,46

Vysvetlivky: HMW-GS – vysokomolekulárne glutenínové podjednotky, LMW-GS – nízkomolekulárne glutenínové podjednotky, GLI – gliadíny, ALB+GLO – albumíny + globulíny

ELISA je preferovaná forma zisťovania obsahu gluténu vo vzorkách pre jej vysokú citlivosť, presnosť, jednoduché použitie a pre komerčnú dostupnosť ELISA

kitov. Táto metóda, tak ako všetky ostatné imunochemické metódy, využíva interakciu antigénu so špecifickými protilátkami za tvorby komplexu antigén-protilátka. Stanovenie tohto komplexu je umožnené naviazaním vhodnej značky (napr. enzýmu) na jeden z imunoreaktantov. Podľa Michalíka et al. (2006) je v súčasnej dobe možné urobiť objektívne závery iba na základe obsahu lepkových bielkovín stanovených práve ELISA testom.

Hischenhuber et al. (2006) konštatujú, že navrhovaný Codex Alimentarius limituje obsah gluténu na 20 mg.kg⁻¹ pre prirodzene bezlepkové potraviny. Pre produkty, ktoré nie sú prirodzene bezlepkové je stanovená maximálna hranica obsahu gluténu na 200 mg.kg⁻¹, čo zodpovedá 0,02% gluténu (Wieser a Koehler, 2008; Palenčárová a Gálová, 2010).

Tabuľka 11: Výsledky obsahu lepkových bielkovín stanovených ELISA metódou

DRUH / ODRODA	% gluténu
Pšenica / Lívia	6,68
Pšenica / Hana	5
Amarant / Olpir	0,0067
Amarant / Amar 2R- R158	0,0084
Ciok / Hemaize	0,0000686
Ciok / B' cukrový	0,0001296
Pohánka / Bogatyr	0,003253
Pohánka / Pyra	0,0189494
Ovos / Azúr	0,13404
Ovos / Aragon	0,864752
Jačmeň / Nitran	6,6252
Jačmeň / SK 5451	4,5559

Z našich výsledkov uvedených v tabuľke 11 vyplýva, že amarant (v priemere 0,0075 %), ciok (v priemere 0,000099%) a pohánka (v priemere 0,0110 %) vyhovujú podľa platného Codex Alimentarius kritériu pre zaradenie k potravinám označeným ako bezgluténové (gluten-free).

ELISA test tiež potvrdil predpoklad nadlimitného podielu gluténu v pšenici (v priemere 5,8445 %), v jačmeni (v priemere 5,5905 %) a v ovsí (v priemere 0,4994 %), čím sa tieto stávajú nevhodné pre pacientov s celiakiou.

5 Návrh na využitie výsledkov

V diplomovej práci sme spracovali prehľad o súčasnom stave problematiky celiakálneho ochorenia. Pozornosť sme pritom zamerali na genetické faktory, prezentáciu ochorenia, patogenézu, ale aj epidemiológiu a prípadnú liečbu. Charakterizovali sme celiakálne aktívne bielkoviny, ku ktorým sa zaraďujú gliadíny pšenice, hordeíny jačmeňa, sekalíny raže a aveníny ovsa. Celiakálne aktívna je najmä frakcia prolaminových bielkovín s nízkou molekulovou hmotnosťou okolo 30 kDa. Kľúčovým riešením pri tomto type ochorenia je dodržiavanie prísnej diéty, ktorej základom je vylúčenie lepkových bielkovín z potravy.

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva:

- pšenica a jačmeň sú plodiny nevhodné na prípravu bezlepkových potravín nakoľko vykazujú vysoký obsah prolaminovej frakcie od 26,28 % do 43,67 % a rovnako aj ELISA testom sme detekovali vysokú celiakálnu toxicitu gliadínových bielkovín,
- ovos je plodina, pri ktorej sa výsledky a názory viacerých autorov rozchádzajú, nakoľko potraviny z ovsa sú niektorými jedincami s celiakiou dobre tolerované,
- pre bezlepkovú diétu je možné odporučiť pseudocereálie amarantus a pohánku, a taktiež aj cirok, pri ktorých obsah gluténových bielkovín nepresiahol limitnú hodnotu 0,02%,
- ELISA test RIDASCREEN® Gliadin je citlivý imunologický test, ktorý je vhodný na presnú detekciu celiakálne aktívnych bielkovín v potravinách, požívatinách a potravinových zdrojoch,
- Metodiku ISTA SDS-PAGE môžeme odporučiť pre identifikáciu a charakteristiku genetických zdrojov pšenice na základe prítomnosti HMW subjednotiek glutenínov, nakoľko ich rozlišovacia schopnosť v géli je dobrá.

6 Záver

Cieľom diplomovej práce bola biochemická charakteristika šiestich druhov cereálií a pseudocereálií (pšenica, cirok, ovos, pohánka, amarant, jačmeň) a ich prípadné využitie pre potreby bezlepkovej diéty. Na základe získaných experimentálnych výsledkov môžeme urobiť nasledovné závery:

- Najnižší obsah dusíka sme zistili v jačmeni (v priemere 1,28 %). Vyšší obsah vykázali amarant (v priemere 1,92 %) a pšenica (v priemere 1,78 %).
- Z hľadiska obsahu bielkovín najnižšiu hodnotu sme zmerali v jačmeni (v priemere 7,61 %), stredné hodnoty v ciroku, pohánke a ovsí (v priemere od 8,39 % do 9,89 %). V pšenici bol zistený obsah bielkovín v priemere 10,15 % a v amarante v priemere 11 %.
- Z hľadiska zastúpenia bielkovinových frakcií, najvyšší obsah albumínov a globulínov sme zistili v amarante (priemer 52,64 %) a pohánke (priemer 47,75 %), čo poukazuje na ich dobrú výživnú hodnotu. Najvyšší obsah prolaminov sme stanovili v pšenici (priemer 41 %) a ciroku (priemer 33,75 %), nižšie hodnoty v jačmeni (priemer 27,69 %) a v ovsí (priemer 16,79 %). Najnižšie hodnoty sme zistili v amarante (priemer 2,86 %) a pohánke (priemer 4 %). Zastúpenie glutelínov sa pohybovalo v rozmedzí hodnôt od 12,63 % do 52,48 %.
- Na základe obsahu zásobných bielkovín prolaminov a glutelínov zaraďujeme pšenicu, jačmeň a ovos medzi plodiny, ktoré sa vyznačujú dobrou technologickou kvalitou. Amarant a pohánka patria k plodinám s nižším obsahom zásobných bielkovín, a teda aj s nižšou technologickou kvalitou.
- Aktivita alfa – amylázy, kyslých, neutrálnych a zásaditých proteáz bola nízka, čo svedčí o dobrej skladovateľnosti analyzovaných plodín.
- Zastúpenie vysokomolekulárnych HMW-GS sa pohybovalo od nedetekovateľnej hodnoty až po 28,405 %. Najväčšie zastúpenie sme zistili v pšenici Livia a naopak najnižšie hodnoty sme pozorovali u oboch odrôd ciroku a amarantu.
- Zastúpenie nízkomolekulárnych LMW-GS variovalo od 2,48 % po 60,99 %. Medzi plodiny s ich vysokým obsahom môžeme z našich vzoriek zaradiť pšenicu (v priemere 57,75 %), pohánku (v priemere 52,87 %) a amarant (v priemere 49,28 %).

-
- ELISA test sme využili na dôkaz celiakálne aktívnych lepkových bielkovín. Vo vzorkách oboch genotypov pšenice, jačmeňa a ovsá presiahol obsah gluténu limitnú hodnotu 0,02%. Týmto sa tieto cereálie stávajú rizikovými pre ľudí s celiakiou.
 - Na základe uvedeného možno povedať, že pohánku, amarant a cirok môžeme zaradiť do zoznamu “gluten-free” plodín, a teda používať ich ako surovinu pre potreby bezlepkovej diéty.

7 Použitá literatúra

1. BAJČI, P. – BOJŇANSKÁ T. – FRANČÁKOVÁ, H. – MUCHOVÁ, Z.. 1993. *Hodnotenie surovín rastlinného pôvodu*. Nitra: VŠP, 1993. 243 s. ISBN 80-7137-127-0.
2. BEŽO, M. 1998. Metódy molekulevej biológie, genetiky a biotechnológií v šľachtení pšenice na kvalitu. In *Kvalita zrna pšenice: zborník referátov z prvej vedeckej konferencie*. Nitra: SPU, 1998. s. 53 – 58. ISBN 80-7137-505-5.
3. BURÁKOVÁ, E. – KRKOŠKOVÁ, B. – MACOVÁ, E. – SVETLÍKOVÁ, D. 2005. Vplyv enzýmovej hydrolýzy na zmeny prolaminovej frakcie pšenice. In *Agriculture*, roč. 51, 2005, č. 11, s. 561 – 567. ISSN 0551-3677.
4. CAGLAR, E. – UGURLU, S. – OZENOGU, A. – CAN, G. – KADIOGLU, P. – DOBRUCALI, A. 2009. Autoantibody frequency in celiac disease. In *Clinics (Sao Paulo)* [online], roč. 64, 2009, č. 12, s. 1195-1200 [cit. 2009-9-18]. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2797588/?tool=pubmed>.
5. CICLITIRA, P. J. 2001. Technical review on coeliac sprue. In *Gastroenterology*, roč. 120, 2001, č.6, s. 1526 – 1540.
6. CORDAIN, L.- SIMOPOULOS, A.P. 1999. Evolutionary aspects of nutrition and health. In *Karger*, roč. 84, 1999, s.19-73.
7. CHŇAPEK, M. – VIVODÍK, M. – GÁLOVÁ, Z. – GREGÁŇOVÁ, Ž. 2006. Detekcia technologickej kvality pšenice molekulárnymi markermi. In *Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín* [Zborník na CD ROM]. Nitra : SPU, 2006, s. 174-179. ISBN 80-8069-767-1.
8. ČERNÝ, J. – ŠAŠEK, A. 1996. *Bílkovinové signální gény pšenice obecné*. Praha : ÚZPI, 1996. 62 s. ISBN 80-85120-55-0.
9. ČERNÝ, J. – ŠAŠEK, A. 1998. *Stanovení odrůdové pravosti pšenice a ječmene elektroforézou bílkovinných genetických markerů*. Praha: ÚZPI, 1998. 60 s. ISBN 80-86153-83-5.
10. DODOK, L. 1997. Využitie amarantu v cereálnych technológiách. In *HÚSKA, J. et al.: Adaptabilita pestovania a využitia láskavca (Amaranthus L.) na Slovensku : Záverečná správa*. Nitra : Agroinštitút pre SPU, 1997. s. 74 – 77.
11. ĎURIŠ, I. – HULÍN, I. – BERNADIČ, M. 2001. *Princípy internej medicíny – Gastroenterológia*. 2.časť. Bratislava : SAP, 2001. 2951 s. ISBN 80-88908-69-8.

-
12. FASANO, A. 2001. Coeliac disease: The past, the present, the future. In *Pediatrics*, roč. 107, 2001, č. 4 s. 768 – 770.
 13. FAULKNER-HOGG, K. – HODGE, L. – SWAIN, A. 2009. Celiac Disease. In *Australian family physician*, roč. 38, 2009, č. 10, s. 785-786.
 14. FERENČÍK, M. - ŠKÁRKA, B. - NOVÁK, M. - TURECKÝ, L. 2000. *Biochémia*. Bratislava: SLOVAK ACADEMIC PRESS, 2000. 924 s. ISBN 80-88909-58-2.
 15. FRANČÁKOVÁ, H. – ČUBOŇ, J. – MICHALCOVÁ, A. 2005. *Hodnotenie poľnohospodárskych produktov*. Nitra: SPU, 2005. 178 s. ISBN 80-8069-471-0.
 16. GÁLOVÁ, Z. – SMOLKOVÁ, M. – MICHALÍK, I. 1997. Testovanie bezpečkových výrobkov biochemickými metódami. In KOVÁČ, K. – PROCHÁZKA, B. *Obilniny – šľachtenie, pestovanie, ekonomika, marketing, využitie a poradenstvo*. Piešťany : VÚRV, 1997. s. 85 – 90. ISBN 80-88790-05-0.
 17. GÁLOVÁ, Z. 1997. Dynamika biosyntézy bielkovín v zrne pšenice (*Triticum aestivum* L.): habilitačná práca. Nitra: SPU, 1997. 66 s.
 18. GÁLOVÁ, Z. – SMOLKOVÁ, H. – GREGOVÁ, E. 1998. Biosyntéza individuálnych HMW glutenínových podjednotiek vo formujúcom sa zrne pšenice. In *Kvalita zrna pšenice: zborník referátov z I. vedeckej konferencie*. Nitra: SPU, 1998. s. 54 – 57. ISBN 80-7137-505-5.
 19. GÁLOVÁ, Z. 2001. Molekulárna identifikácia, diferenciacia a charakteristika zrna pšenice a jačmeňa. In *Biotechnologické metódy v šľachtení rastlín: Zborník referátov zo VII. Vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou*. Nitra: SPU, 2001. s. 84 – 87. ISBN 80-7137-915-8.
 20. GÁLOVÁ, Z. – KNOBLOCHOVÁ, H. – GREGÁŇOVÁ, Ž. – STAROVIČOVÁ, M. 2003. Hodnotenie kolekcie zrna novošľachtencov pšenice letnej, z hľadiska biochemických ukazovateľov. In *Hodnotenie genetických zdrojov rastlín: zborník z 3. odborného seminára*. Piešťany: VÚRV, 2003. s.36 – 38.
 21. GÁLOVÁ, Z.- GREGÁŇOVÁ, Ž.- LIBANTOVÁ, J.- MATUŠÍKOVÁ, I.- MORAVČÍKOVÁ, J.- SALAJ, J. 2005. *Návody na cvičenia z molekulárnej biológie*. Nitra : SPU, 2005. 64 s. ISBN 80-8069-605-5.
 22. GÁLOVÁ, Z. – GREGÁŇOVÁ, Ž. - MICHALÍK, I. – LIBANTOVÁ, J. – MORAVČÍKOVÁ, J. – PREŤOVÁ, A. – MATUŠÍKOVÁ, I. 2006. *Biotechnológie v rastlinnej produkcii*, Nitra: Vydavateľstvo SPU v Nitre, 2006, s. 147, ISBN 80-8069-803-1
-

-
23. GÁLOVÁ, Z. et al. 2006. Výživná kvalita pseudocereálií . In *Sborník mezinárodní konference Výživa zvířat 2006- Proteiny*. Brno: MZLU, 2006. s.76-79. ISBN 80-7157-954-8.
24. GIANIBELLI, M. C. – LARROQUE, O. R. – MacRITCHIE, F. – WRIGLEY, C. W. 2001. *Biochemical, genetic and molecular characterization of wheat endosperm protein* [online review]. Dostupné na internetovej stránke: <http://www.aaccnet.org/cerealchemistry/freearticle/gianibelli.pdf>.
25. GOLIAN, J. 1998. *Ochorenia z potravín*. Nitra: SPU, 1998.108 s. ISBN 80-7137-519-5.
26. GREGÁŇOVÁ, Ž. – CHŇAPEK, M – GÁLOVÁ, Z. 2005. Porovnanie bielkovinových a DNA markerov pri štúdiu technologickej kvality pšenice. In *Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín: I. vedecká konferencia s medzinárodnou účasťou*. Nitra: SPU, 2005. s. 1 – 5.
27. GRONES, J. 1998. *Molekulárna biológia*. Bratislava: UK, 1998. 265 s. ISBN 80-223-1209-6.
28. HISCENHUBER,C. – CREVEL, R. – JARRY, B. – MAKKIS, M. – MONERET-VAUTRIN, D.A. – ROMANO, A. – TRONCONE, R. – WARD, R. 2006. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or celiac disease. In *Alimentary pharmacology and therapeutics* [online], roč.23, 2006, č.5, s.559-575. Dostupné na: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118572211/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>
29. HODGE, L. – SWAIN, A. – FAULKNER-HOGG, K. 2009. Food allergy and intolerance. In *Australian family physician* [online], roč. 38, 2009, č. 9, s. 705-707. Dostupné na: <http://www.racgp.org.au/afp/200909/33950>.
30. HOLEČKOVÁ, H. – MICHALÍK, I. 1993. Elektroforetická analýza gluténových bielkovín zrna pšenice. In *Polnohospodárstvo*, roč. 39, 1993, č.11, s. 866 – 877.
31. HRAŠKA, Š. 1993. *Anatomicko – morfológické predpoklady zvýšenia obsahu bielkovín v zrne pšenice*. Piešťany: VÚRV, 1993. s. 36.
32. HUBÍK, K. – TICHÝ, F. 1998. Hodnocení technologické jakosti zrna pšenice. In *Kvalita zrna pšenice: zborník referátov z prvej vedeckej konferencie*. Nitra: SPU, 1998. s. 44 – 50.
33. JODL, J. 1988. *Dieta bezlepková pri celiakii u detí*. Praha : Avicenum, 1988. 103 s. ISBN 08-023-89.
-

-
34. KADLEC, O. 1993. *Encyklopédia medicíny* 2. 1.vyd. Bratislava : Asklepios, 1993. 411 s. ISBN 80-7467-008-1.
35. KARABÍNOVÁ, M. – ADAMOVSÝ, F. – GROMOVÁ, Z. – HÚSKA, J. – ILLÉŠ, L. – MOLNÁROVÁ, J. 1997. *Špeciálna rastlinná výroba – obilniny*. Nitra: SPU, 1997. 204 s. ISBN 80-7137-344-3.
36. KARABÍNOVÁ, M. – KULÍK, D. – PROCHÁZKOVÁ, M. 1999. *Obilniny I*. Nitra: ÚVTIP-NOI, 1999.110 s. ISBN 80-85330-63-6.
37. KARABÍNOVÁ, M. – MOLNÁROVÁ, J. – ŽEMBERY, J. 2001. *Obilniny III. Pestovanie kukurice, ciroku, prosa a pohánky*. Nitra : KURIÉR plus REKLAMA, 2001. 91 s. ISBN 80-88843-23-5.
38. KEZUKA, Y. – TAKASHI, I. – SATOH, R. – TESHIMA, R. – NONAKA, T. 2009. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a deletion mutant of a major buckwheat allergen. In *Acta crystallographyca* [online], roč. 65, 2009, č. 12, s. 1297-1270 [cit. 2009-12-1]. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2802877/?tool=pubmed>. ISSN 1744-3091.
39. KOHOUT, P. – PAVLÍČKOVÁ, J. 1994. *Celiakie – dieta bezlepková*. Čestlice: Pavla Momčilová, 1994. 120 s. ISBN 80-90-11-37-6-1.
40. KOHOUT, P. 1999. Celiakie a bezlepková dieta. In *Výživa a potraviny*, roč. 54, 1999, č.1, s. 77 – 78.
41. KOHOUT, P. 2005. Celiakie. In *Výživa a potraviny*, roč. 60, 2005, č.5, s. 113.
42. KOLSTER, P. . EEUWIJK, F.A. – GELDER, W. M. J. 1991. Additive and epistatic effects of allelic variation at the high molecular weight glutenin subunit loci in determining the bread – making quality of breeding lines of wheat. In *Euphytica*, roč. 55, 1991, č. 3, s. 277 – 285.
43. KOLSTER, P. – KRECHTING, C.F. – VANGELDER, W.M.J. 1992. Quantification of individual high molecular weight glutenin subunits of wheat using SDS-PAGE and scanning densitometry. In *J. Cereal*, roč. 15, 1992, č.1 s.49 – 61.
44. KOPÁLOVÁ, Z. 2008. Biochemická charakteristika niektorých cereálií a pseudocereálií a možnosti ich využitia v bezlepkovej diéte: bakalárska práca. Nitra : SPU, 2008. 64 s.
45. KOVÁČOVÁ, M. - PEKÁRKOVÁ, B. 1996. *Celiakia u detí*. Bratislava. Ústav zdravotnej výchovy, 1996. 42 s. ISBN 80-7159-067-3.
-

-
46. KRAIC, J – GREGOVÁ, E. 1998. Hodnotenie kvality a homogenity pšenice elektroforetickými technikami. In *Kvalita zrna pšenice: zborník referátov z I. vedeckej konferencie*. Nitra: SPU, 1998. s.53 – 58. ISBN 80-7137-505-5.
 47. KRAIC, J. 2004. *Genetické markery rastlín*. Nitra: SPU, 2004. 67 s. ISBN 80-8069-391-
 48. KŮNZEL, D. 1990. *Lidský organizmus ve zdraví a nemoci*. Praha :Avicenum, 1990. 370 s. ISBN 80-201-0000-8.
 49. LOUSTARINEN, L. 2003. Neurological manifestation in coeliac disease : dizertačná práca. Tampere : UOT, 2003. 81 s.
 50. LU, H. – ZHANG, J. – LIU, K. – WU, N. – LI, Y. – ZHOU, K. – YE, M. – ZHANG, T. – ZHANG, H. – YANG, X. – SHEN, L. – XU, D. – LI, Q. 2009. Earliest domestication of common millet (*Panicum miliaceum*) in East Asia extended to 10,000 years ago. In *Pnas* [online], roč. 106, 2009, č. 18, s. 7367-7372. Dostupné na: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0900158106.
 51. MAJEROVÁ, E. 2005. Celiakia. In *Život s bezlepkovou diétou*, 1.vyd. Bratislava : VEDA, 2005. 168 s..
 52. MAŘATKA, Z. 1988. *Klinická gastroenterologie*. Praha : Avicenum, 1988. 656s.
 53. MAŘATKA, Z. 1999. *Gastroenterologie*. Praha: Karolinum, 1999. 490 s. ISBN 80-7184-561-2.
 54. McIMOWAT, A. 2003. Coeliac disease – a meeting point for genetics, immunology and protein chemistry. In *The Lancet*, roč. 361, 2003, č.9365, s.1290 – 1292.
 55. MICHALÍK, I. 1990. *Biochémia rastlín*. Nitra: ES VŠP, 1990, 250 s. ISBN
 56. MICHALÍK, I. 1994. Charakteristika cereálnych bielkovín, ich výživná kvalita a vplyv na zdravotný stav. In *Výživa a zdravie*, roč. 39, 1994, č.8, s. 159-161, 185-186.
 57. MICHALÍK, I. 1998. Komponentná charakteristika a biosyntéza zásobných bielkovín zrna obilnín. In *Kvalita zrna pšenice: zborník referátov z I. vedeckej konferencie*. Nitra: SPU, 1998. s. 7 – 17. ISBN 80-7137-505-5.
 58. MICHALÍK, I. – BAUEROVÁ, M. 2001. Celiakálne ochorenie známe i neznáme. In *Výživa a zdravie*, roč. 46, 2001, č. 1, s. 10-12.
 59. MICHALÍK, I. 2002. Unifikovaná metóda diskontinuálnej frakcionácie bielkovinového komplexu zrna obilnín. In *Pol'nohospodárstvo*, roč. 48, 2002, č. 7, s. 333-341.
-

-
60. MICHALÍK, I. 2005. *Biochémiá*. 5.vyd. Nitra: SPU, 2005. 226 s. ISBN 80-8069-613-6.
61. MICHALÍK, I.- GÁLOVÁ, Z.- URMINSKÁ, D.- KNOBLOCHOVÁ, H. 2006. Bielkovinový komplex zrna obilnín a pseudoobilnín. In *Výživná a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie*. Monografia. Nitra : SPU, 2006. s.68 - 101. ISBN 80-8069-780-9.
62. MICHALÍK, I.- GÁLOVÁ, Z.- SZABOVÁ, E. 2008. *Návody na cvičenia z biochémié*. Nitra : SPU, 2008.100 s. ISBN 978-80-552-0096-5.
63. MICHALOVÁ, A. 1996. Štúdium a hodnotenie genofondu láskavca v ČR In *HÚSKA, J. et al.: Láskavec a biomasa*. Nitra: VŠP, 1996. s. 124 – 127.
64. MICHALOVÁ, A. 1999. Láskavec. In *Výživa a potraviny*, roč. 54, 1999, č.1, s.13 – 14.
65. MOUDRÝ, J. – DVOŘÁČEK, V.- MICHALOVÁ, A. 1998. Kvalita maloobjemových cereálií. In *Zamyšlení nad rostlinnou výrobou : Sborník referátů z 8. konference katedry rostlinné výroby České zemědělské univerzity v Praze*. Praha :ČZU, 1998. s. 102 – 105.
66. MUCHOVÁ, Z. 1991. Pšenica ako potravinárska surovina: habilitačná práca. Nitra: VŠP, 1991. 114 s.
67. MUCHOVÁ, Z. 1998. Aktuálne otázky technologickej kvality zrna potravinárskej pšenice. In *Kvalita zrna pšenice: zborník referátov z prvej vedeckej konferencie*. Nitra: SPU, 1998. s. 53-58. ISBN 80-7137-505-5.
68. MUCHOVÁ, Z. 2001. *Faktory ovplyvňujúce technologickú kvalitu pšenice a jej potravinárske využitie*. Nitra : SPU, 2001. 112 s. ISBN 80-7137-923-9.
69. MUCHOVÁ, Z. – FRANČÁKOVÁ, H. – BOJŇANSKÁ, T. – BAJČL, P. 2001. *Hodnotenie surovín a potravín rastlinného pôvodu*. Nitra : SPU, 2001. 215 s. ISBN 80-7137-886-0.
70. MURRAY, J. A. 1999. The widening spectrum of coeliac disease. In *Am J Clin Nutr*, roč. 69, 1999, č.3, s.354 – 365.
71. MURRAY, R. K. – FIALOVÁ, L. 2002. *Harperova biochemie*. Jinočany: NAKLADATELSTVÍ H & H, 2002. 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
72. NELSEN, D.A. 2002. Gluten- sensitive enteropathy (Celiac disease): More common than you think. In *American family physician* [online], roč. 66, 2002, č. 12, s.2259-2266 [cit.2002-12-15]. Dostupné na: < <http://www.aafp.org/afp/2002/1215/p2259.html>.
-

-
73. NÉMETH, K. 2004. Čo je to potravinová alergia. In *Výživa a zdravie*, roč.48, 2004, č. 1, s. 9.
 74. PALENČÁROVÁ, E. – GÁLOVÁ, Z. 2010. Detekcia celiakálne aktívnych bielkovín elektroforeticko- a imunochemickou metódou. In *Potravinárstvo*, roč. 4, 2010, č.2, s. 485-490.
 75. PAYNE, P. I. – LAWRENCE, G. J. 1983. Catalogue of alleles for the complex loci Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. In *Cereal Research Communications*, roč. 11, 1983, č. 6, s. 29 – 35.
 76. PAYNE, P. I. – NIGHTINGALE, M. A. – KRATTIGER, A. F. 1987. The relationship between the HMW glutenin subunit composition and the breadmaking quality of British – grown wheat varieties. In *Science Food Agriculture*, roč. 40, 1987, č.8, s. 51-65.
 77. PEŤOVSKÝ, P. 1986. Dynamika biosyntézy gluténových bielkovín v zrne ozimnej pšenice: kandidátska dizertačná práca. Nitra: VŠP, 1986. s. 35 – 38.
 78. 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*, roč.21, 2003, č.2, s. 59 – 70.
 79. PRÍKAZSKÁ, M. – DVORSKÁ, S. 1998. *Diéta pri celiakii dospelých*. 1. vyd. Bratislava: Výskumný ústav výživy, 1998. 24 s. ISBN 80-85323-61-3.
 80. PRUGAR, J. – HRAŠKA, Š. 1986. *Kvalita pšenice*. Bratislava: PRÍRODA, 1986. 220 s. ISBN 64-133-86.
 81. REPKA, J. – MICHALÍK, I. 1988. *Biochemicko – fyziologické základy šľachtenia rastlín*. Nitra: VŠP, 1988. 195 s.
 82. ROBINSON, F. 2002. *Potravinová alergia*. Bratislava: Výskumný ústav potravinársky, 2002. 23 s. ISBN 80- 89088-08-2.
 83. SETTY, M. – HORMAZA, L. – GUANDALINI, S. 2008. Celiac disease: risk assessment, diagnosis and monitoring. In *Mol Diagn Ther* [online], roč. 12, 2008, č. 5, s. 289-298. Dostupné na: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18803427>.
 84. SHEWRY, P. R. 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. In *J. Cereal Sci.*, roč. 4, 1986, č. 2, s. 97-106.
 85. SHEWRY, P. R. – MIFLIN, B. J. 1988. *Seeds proteins, biochemistry, genetica, nutritive value*, 2 ed., New York : Publisher Hague, 1988, 352 p.
-

-
86. SHEWRY, P.R. – HALFORD, N. G. – TATHAM, A. S. 1992. High-molecular-weight subunits of wheat glutenin. In *J. Cereal Sci.*, roč. 15, 1992, č. 2, s. 105 – 120.
 87. STAROVIČOVÁ, M. 2003. Využitie genetického polymorfizmu zásobných bielkovín pri identifikácii a charakteristike genotypov pšenice : dizertačná práca. Nitra : SPU, 2003. 64 s.
 88. ŠAŠINKA, M – KUČHTA, M. 1998. Celiakia najčastejšia príčina chronickej poruchy výživy u detí. In *Lekársky obzor*, roč. 47, 1998, č.1, s. 35 – 38.
 89. ŠEDIVÁ, R. 1995. Bezlepková (bezgluténová) diéta. In *Revue profesionálnej sestry*, roč. 2, 1995, č. 4, s. 12.
 90. TRAKOVICKÁ, A. 1999. Genetické polymorfne znaky a ich využitie pri hodnotení populácií hospodárskych zvierat: habilitačná práca. Nitra: SPU, 1999. 113 s.
 91. URMINSKÁ, D. – MICHALÍK, I. 1996. Analýzy štartovacích enzýmov klíčenia zrna pšenica. In *Rostlinná výroba*, roč. 42, 1996, č. 3, s 97-100.
 92. VAN HERPEN, T. – RILEY, M. – SPARKS, C. – JONES, H. D. - GRITSCH, C. – DEKKING, E. H. – HAMER, R. J. – BOSCH, D. – SALENTINJ, E. M. J. – SMULDERS, M. J. M. – SHEWRY, P. R. – GILISSEN, L. J. 2008. Detailed Analysis of the Expression of an Alpha-gliadin Promoter and the Deposition of Alpha-gliadin Protein During Wheat Grain Development. In *Annals of botany* [online], roč. 102, 2008, č.3, s.331-342 [cit. 2008-7-11]. Dostupné na :<
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2701793/?tool=pubmed>.
 93. WIESER, H.- KOEHLER, P. 2008. The biochemical basis of celiac disease. In *Cereal Chemistry*, roč.85, 2008, č. 1, s. 1-13.
 94. WILLS, A. J. 2000. The neurology and neuropathology of coeliac disease. In *Neuropathology and Applied Neurobiology*, roč. 26, 2000, č. 6, s. 493 – 496.
 95. WRIGLEY, C. W. 1992. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. In Linskens, H. F. - Jackson, J. F.: seed analysis, Verlin, Heidelberg, Springer –Verlag, 1992, s. 17 – 41.
 96. ŽAJOVÁ, A. 2006. Amaranthus L. – Láskevce ako netradičná potravina. In *Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín: Zborník referátov z II. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou*. Nitra : SPU, 2006. s. 106. ISBN 80-8069-766-3.

[http 1: celiacdisease.about.com/.../ ss/MarshScore_5.htm](http://celiacdisease.about.com/.../ss/MarshScore_5.htm)

[http 2 : www.amaranth.cz/stranky/amaranth/](http://www.amaranth.cz/stranky/amaranth/)

http 3: www.orion.chemi.muni.cz/virtuallab/navody/SDSpage.pdf

http 4 : [www.finagro.sk/ produkc4.jpg](http://www.finagro.sk/produkc4.jpg)

http 5: [www.maggi.sk/.../ Zdraviu-prospesna-pohanka.aspx](http://www.maggi.sk/.../Zdraviu-prospesna-pohanka.aspx)

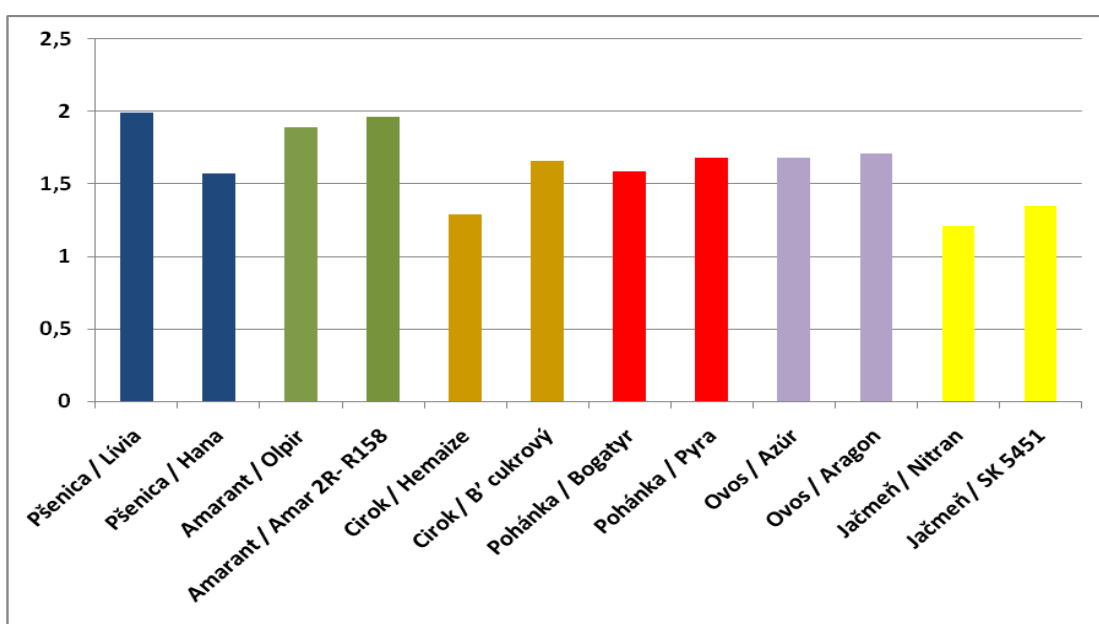
http 6: [jacmen www.selekt.sk/ images/sebastian.jpg](http://jacmen.selekt.sk/images/sebastian.jpg)

http 7: [ovos photo.vivo.sk/jpeg/ 1841/64343/_o/8e2d2e/ovos](http://ovosphoto.vivo.sk/jpeg/1841/64343/_o/8e2d2e/ovos)

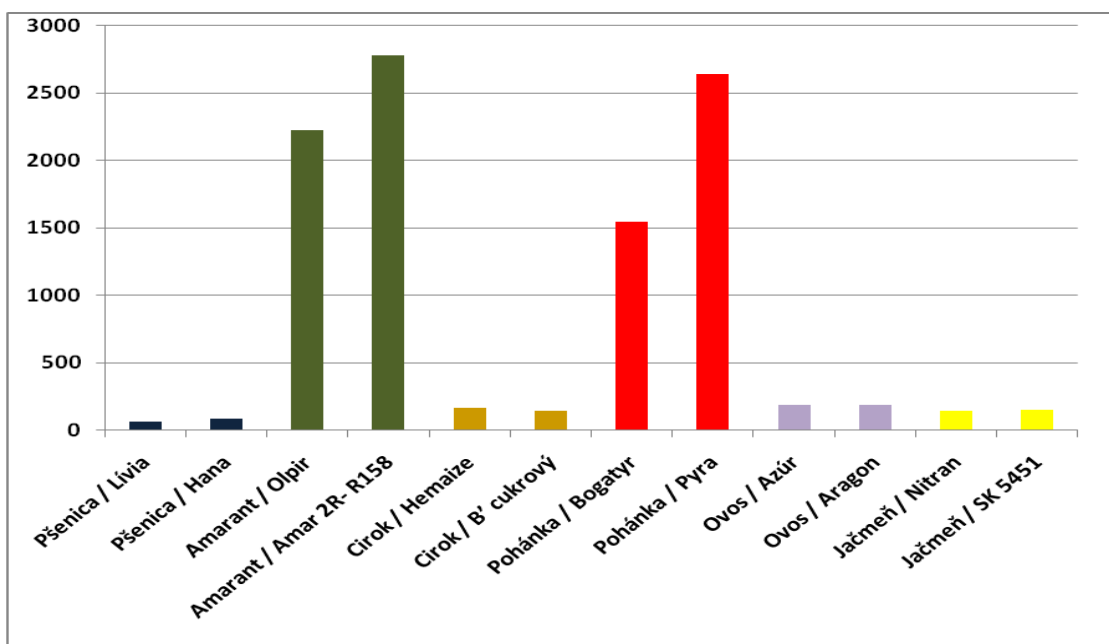
http 8: [amarant www.biorecepty.sk/.../ thumb_1190895296.jpg](http://amarant.biorecepty.sk/.../thumb_1190895296.jpg)

http 9: [www.equiweb.cz/vyziva/ kytky/_cirok.jpg](http://www.equiweb.cz/vyziva/kytky/_cirok.jpg)

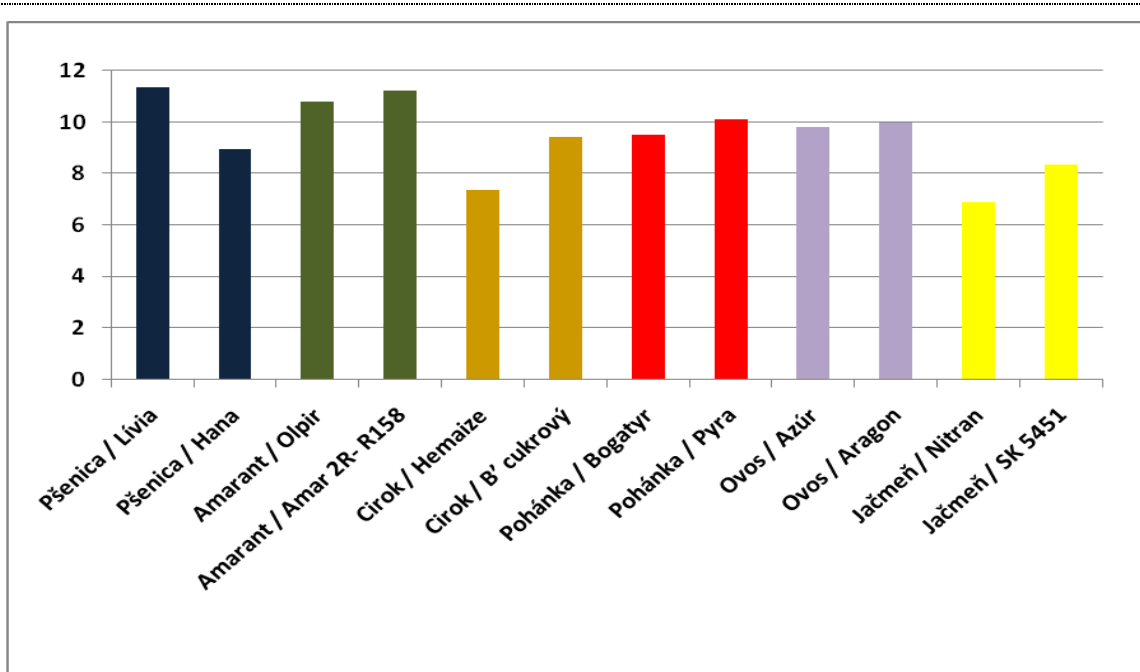
PRÍLOHY



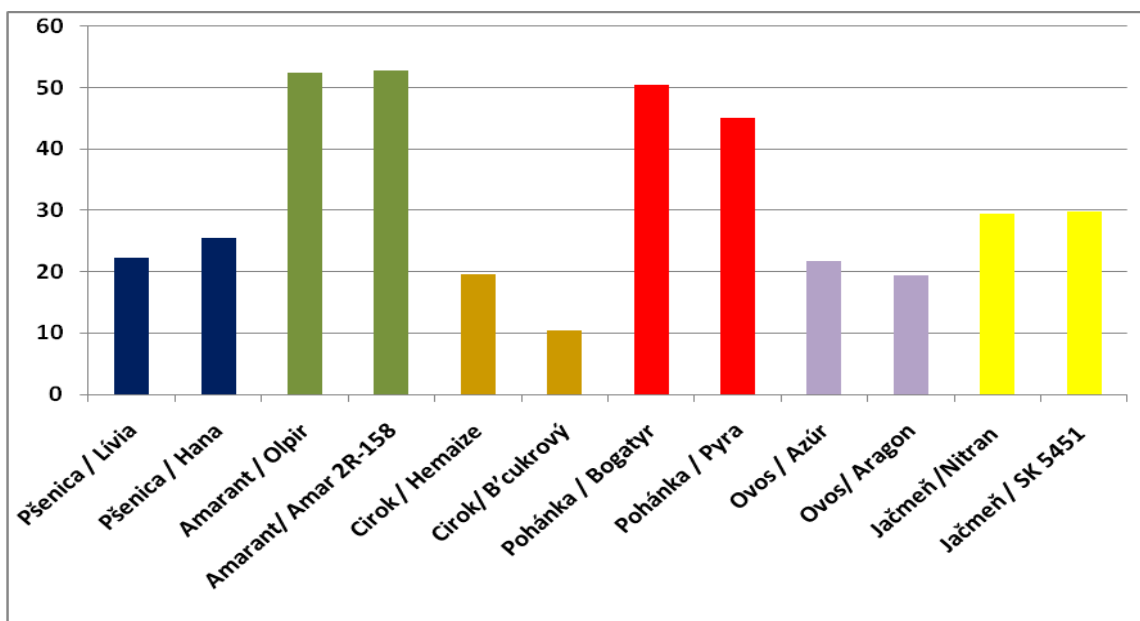
Obrázok 6: Obsah celkového dusíka v analyzovaných vzorkách v %



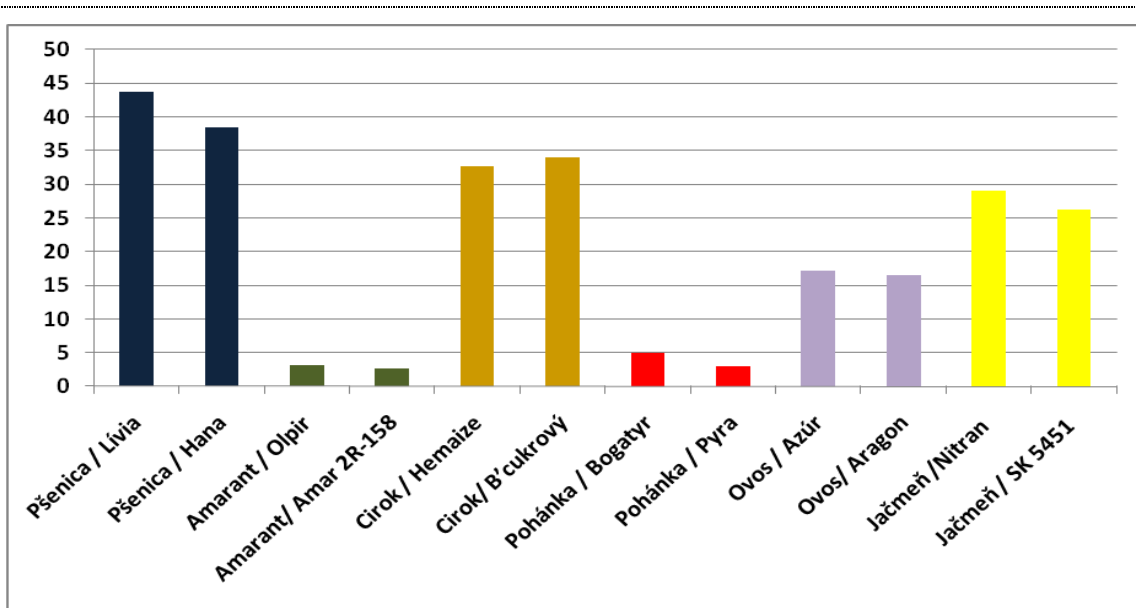
Obrázok 7: Koeficient nutričnej kvality analyzovaných vzoriek v %



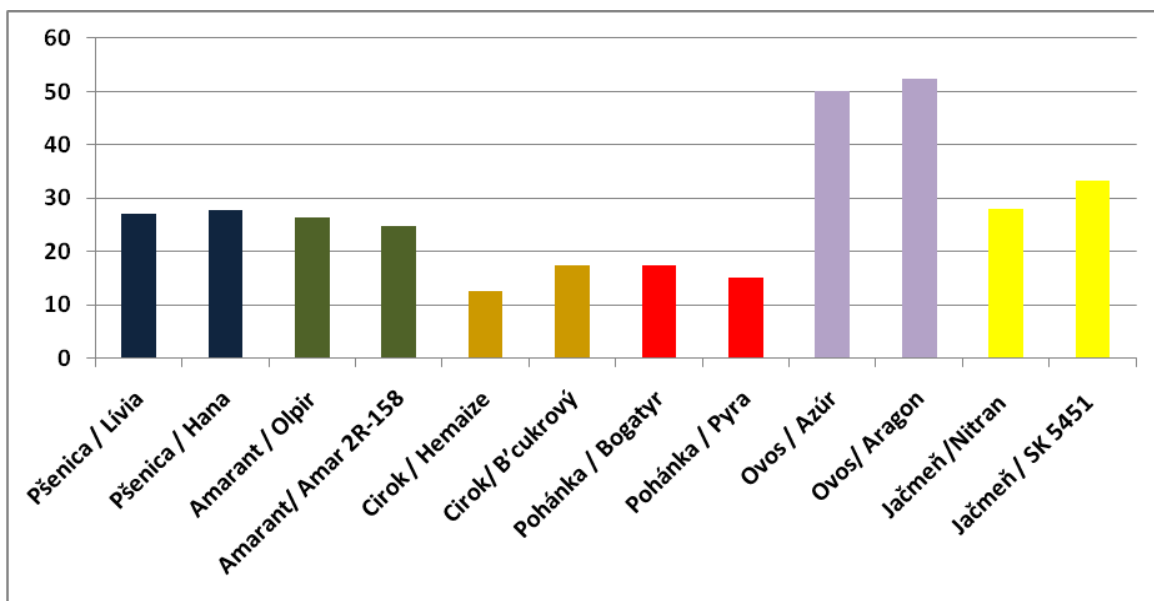
Obrázok 8: Obsah bielkovín v analyzovaných vzorkách v %



Obrázok 9: Obsah albumínov a globulínov v analyzovaných vzorkách v %



Obrázok 10: Obsah prolamínov v analyzovaných vzorkách v %



Obrázok 11: Obsah glutelínov v analyzovaných vzorkách v %



pšenica ([http 4](#))



pohánka ([http 5](#))



jačmeň ([http 6](#))



ovos ([http 7](#))

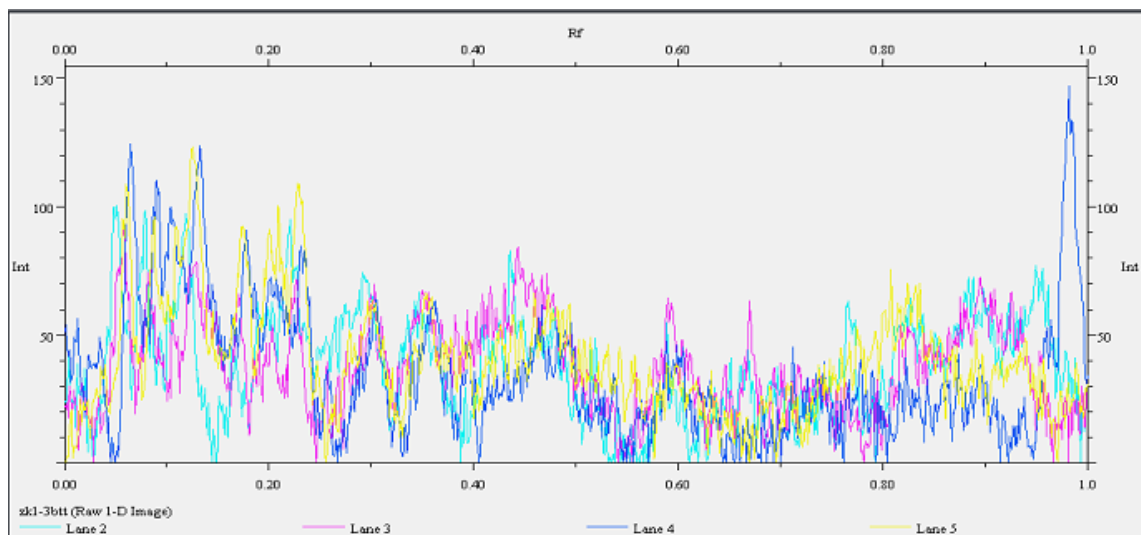


amarant ([http 8](#))

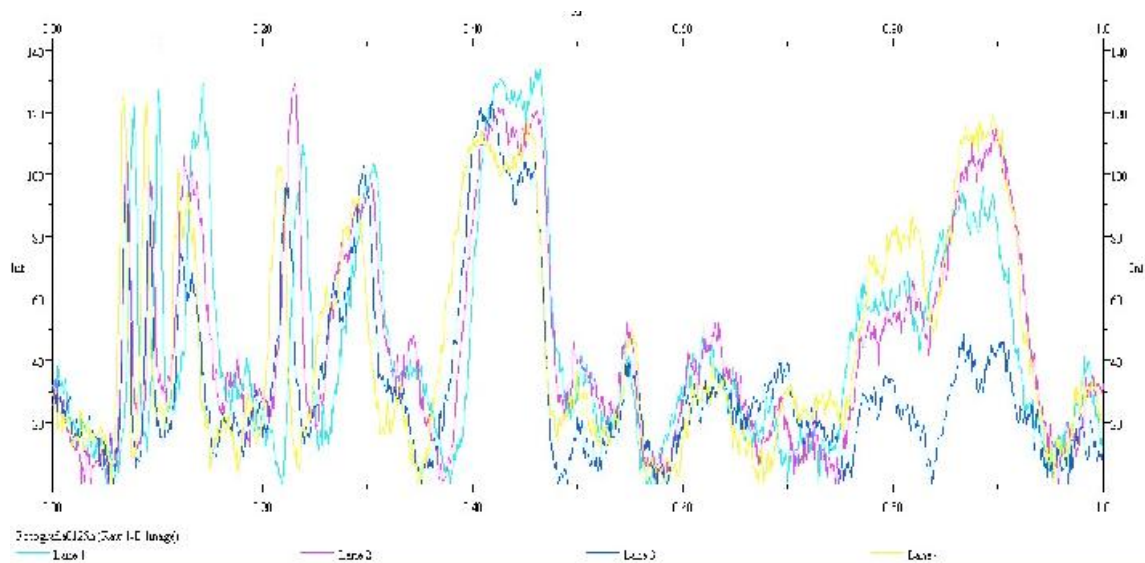


cirok ([http 9](#))

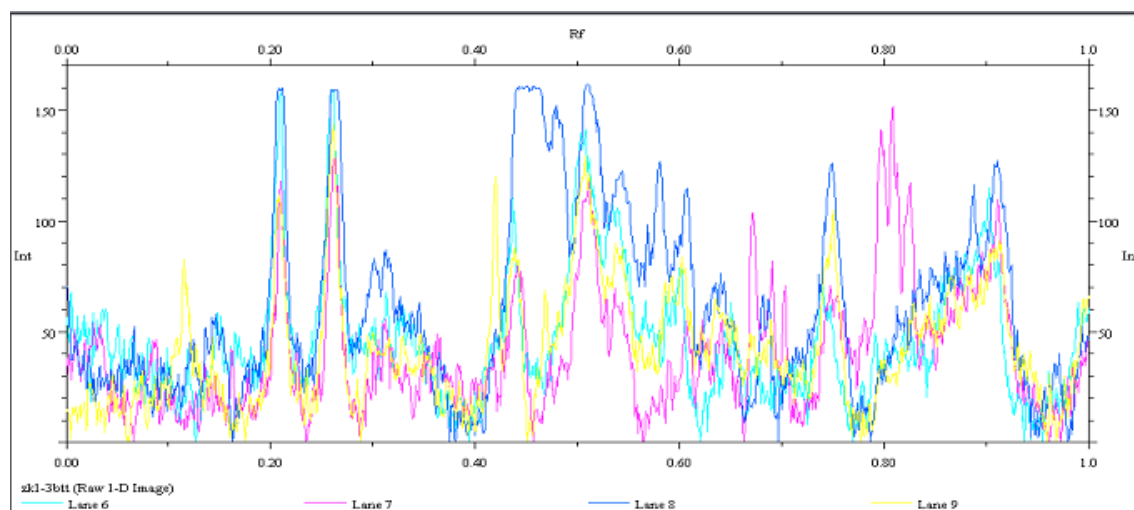
Obrázok 12: Analyzované druhy plodín



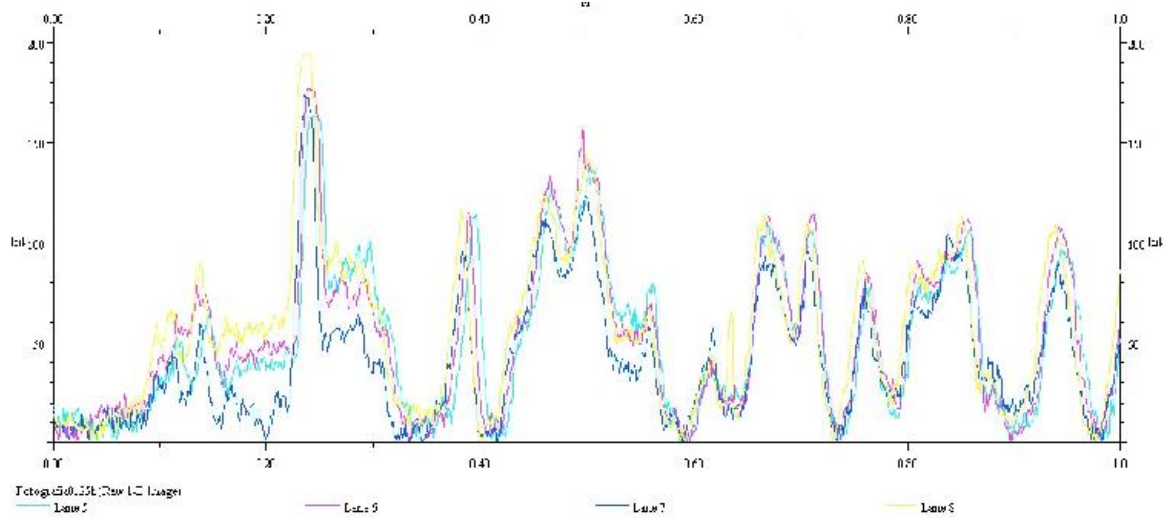
Obrázok 13: Densitometrický záznam elektroforetického profilu pšenica Hana



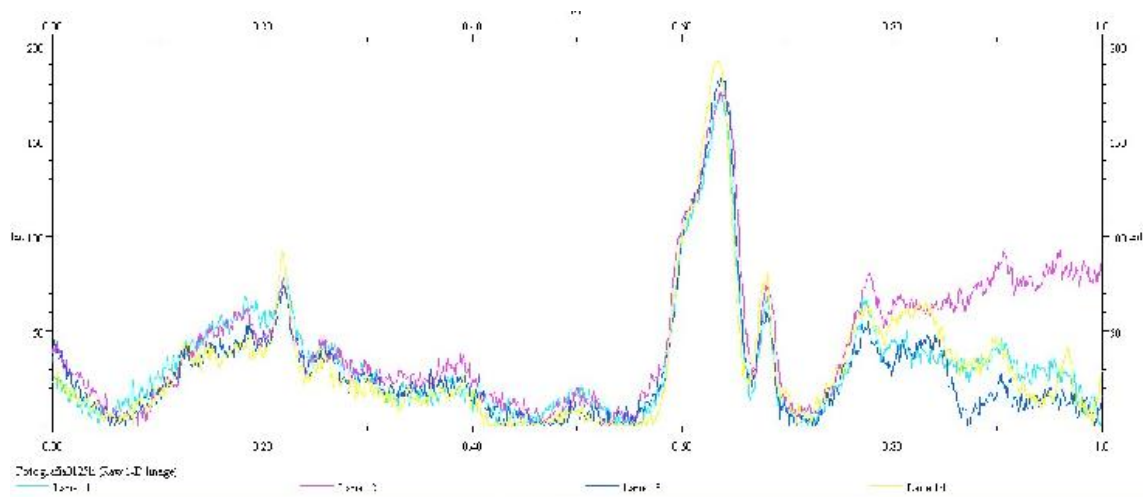
Obrázok 14: Densitometrický záznam elektroforetického profilu pšenica Livia



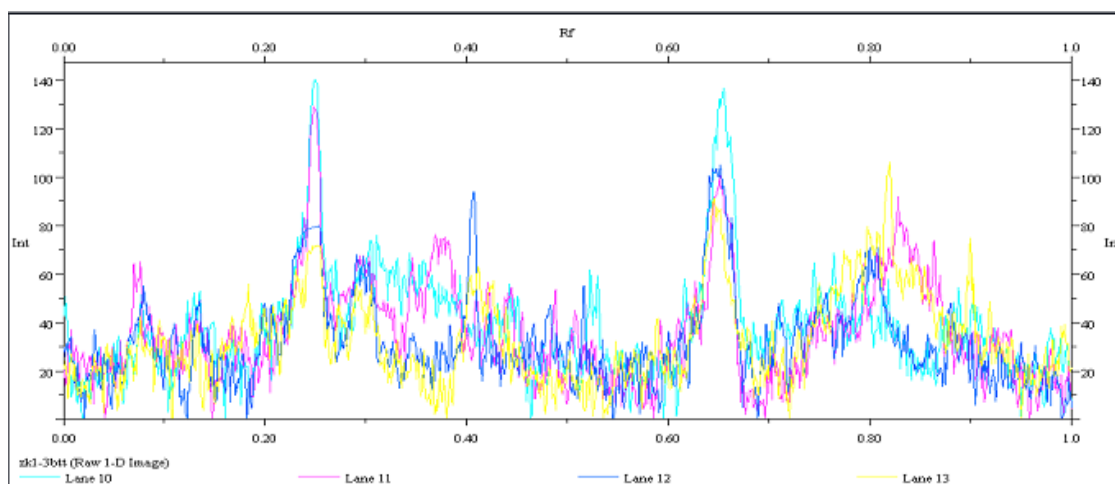
Obrázok 15: Densitometrický záznam elektroforetického profilu amarant Amar-2R-R158



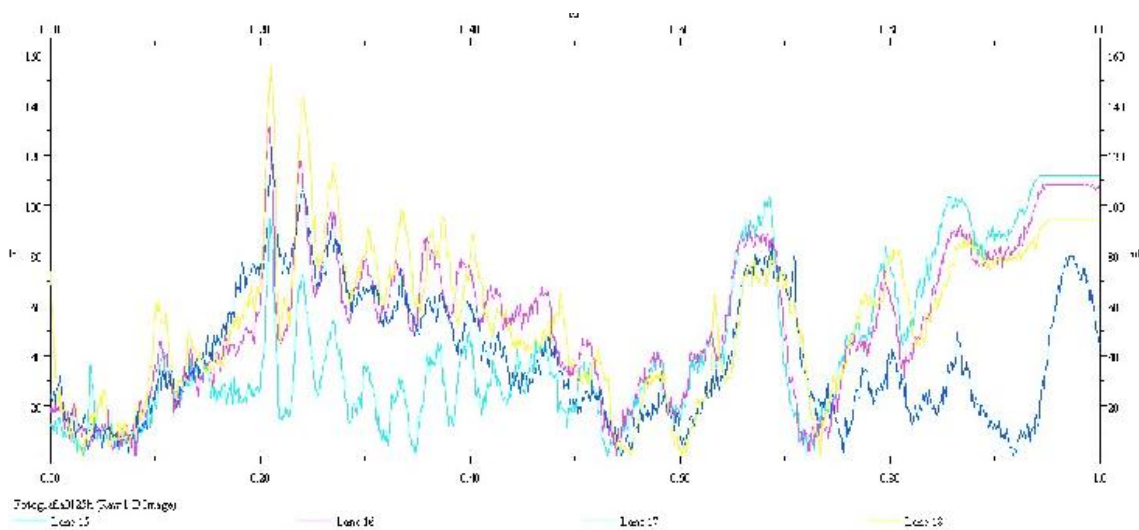
Obrázok 16: Denzitometrický záznam elektroforetického profilu amarant Olpir



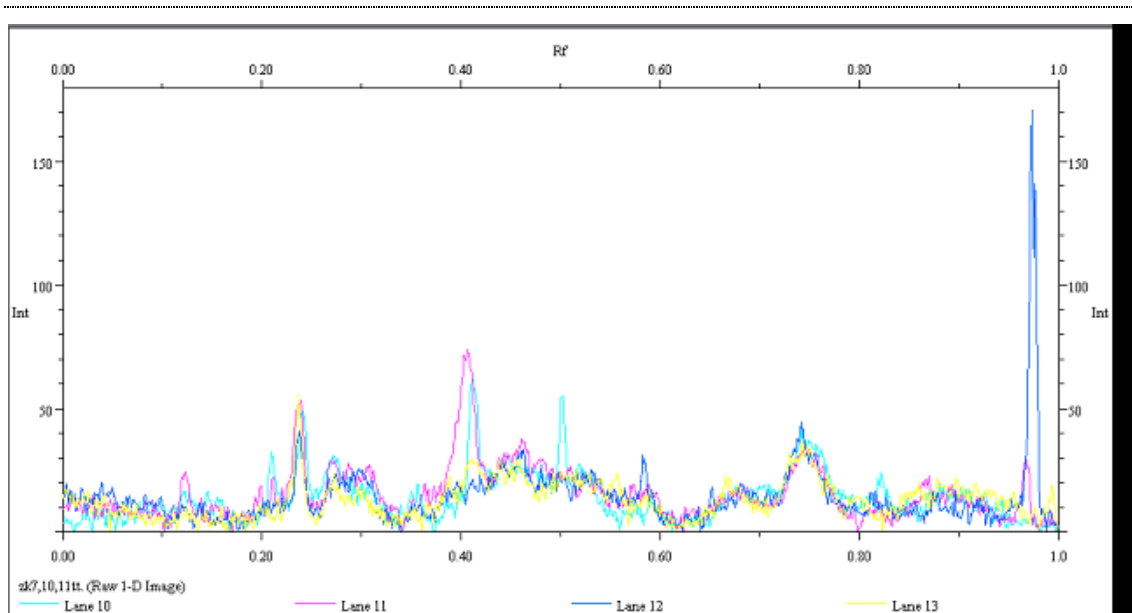
Obrázok 17: Denzitometrický záznam elektroforetického profilu ciprofloxacin Hemaize



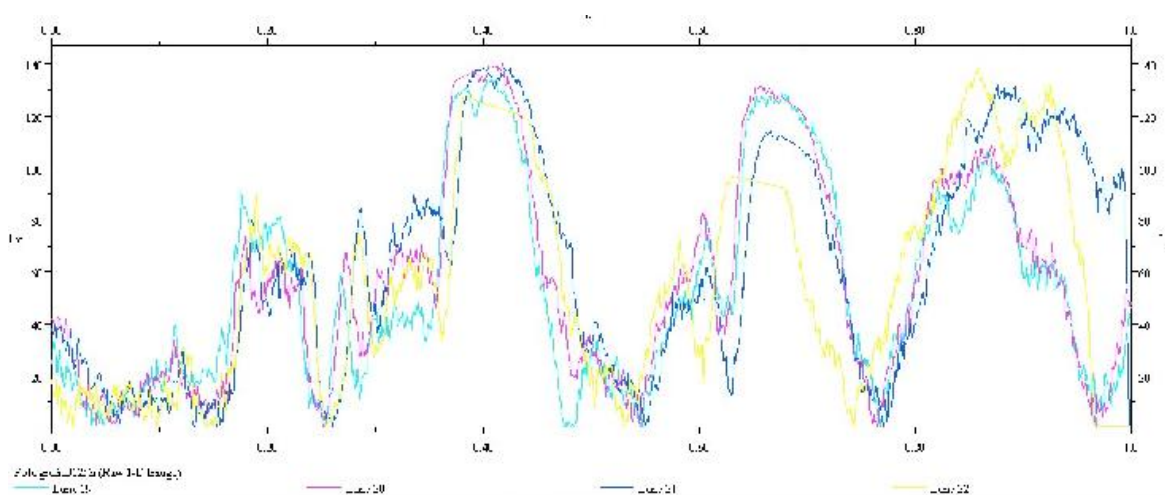
Obrázok 18: Densitometrický záznam elektroforetického profilu cirok B'cukrový



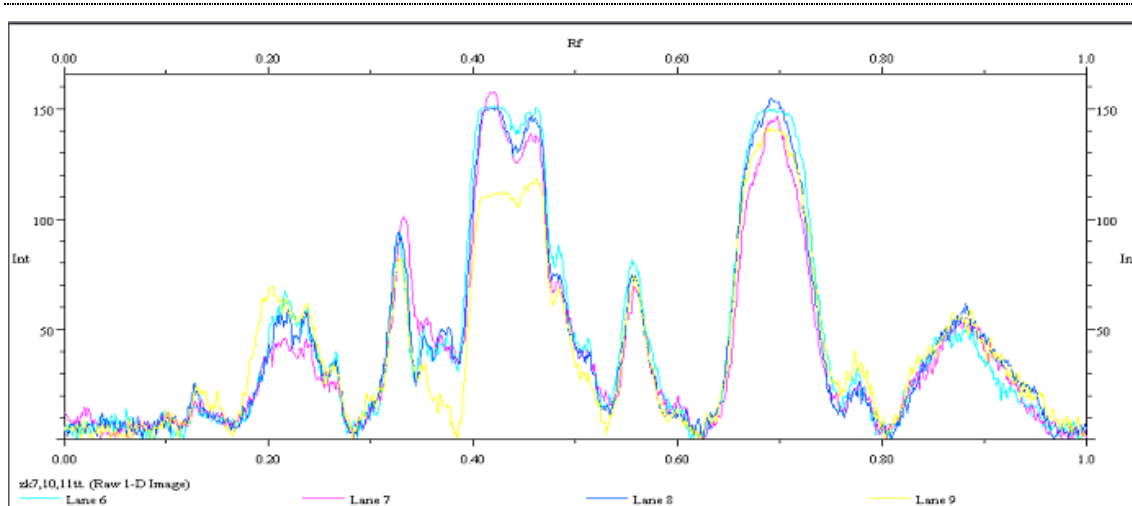
Obrázok 19: Densitometrický záznam elektroforetického profilu pohánka Bogatyr



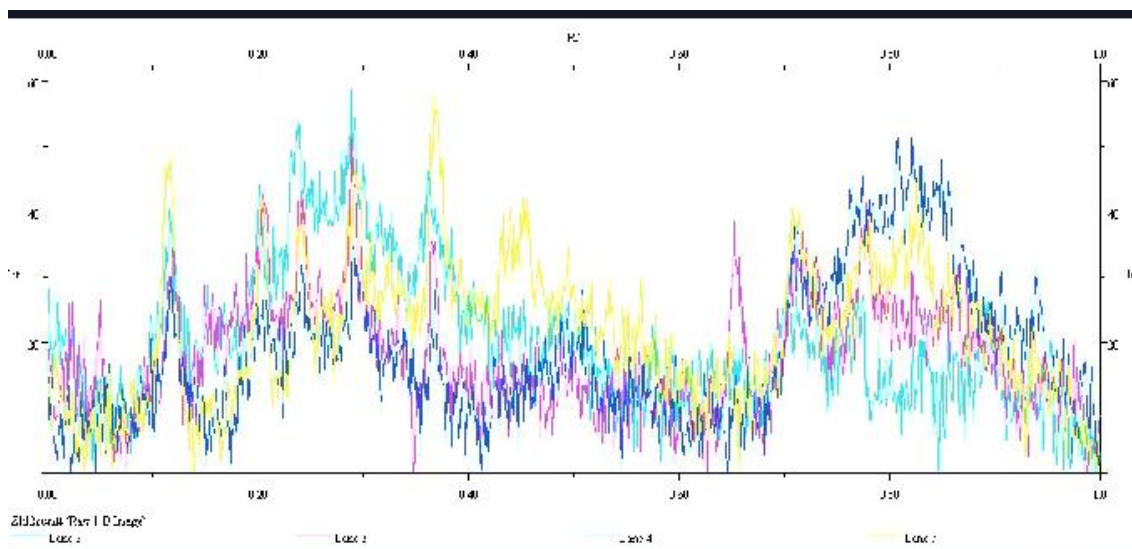
Obrázok 20: Densitometrický záznam elektroforetického profilu pohánka Pyra



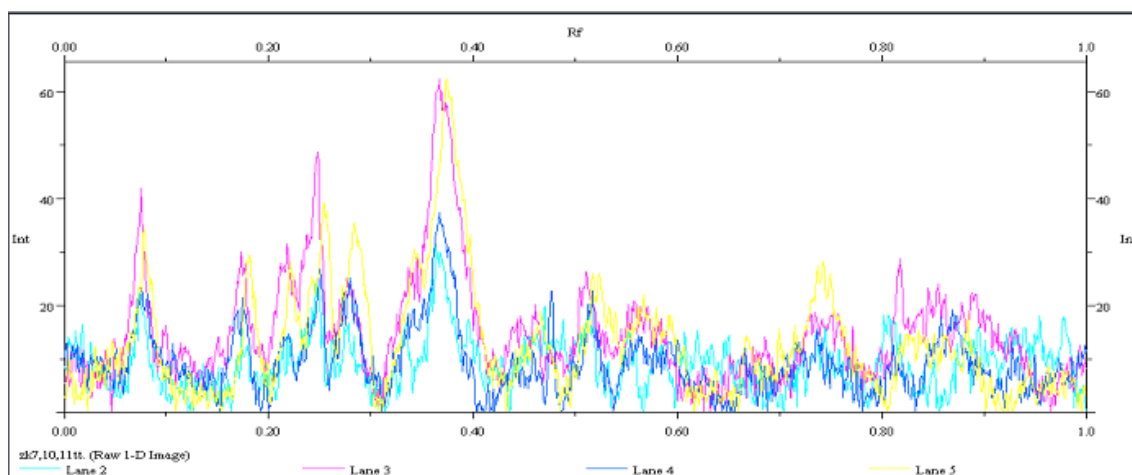
Obrázok 21: Densitometrický záznam elektroforetického profilu ovos Azúr



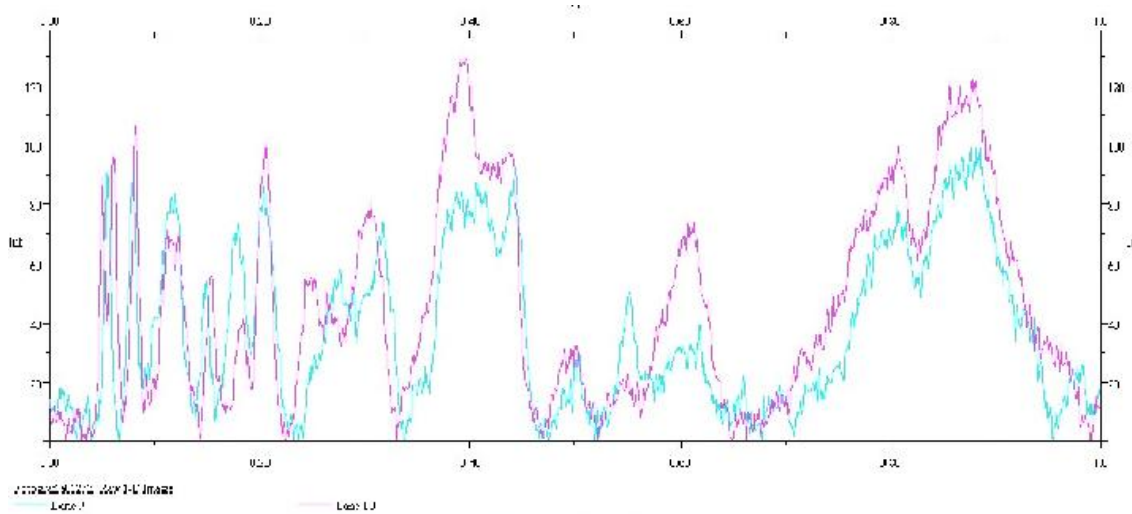
Obrázok 22: Densitometrický záznam elektroforetického profilu ovos Aragon



Obrázok 23: Densitometrický záznam elektroforetického profilu jačmeň Nitran

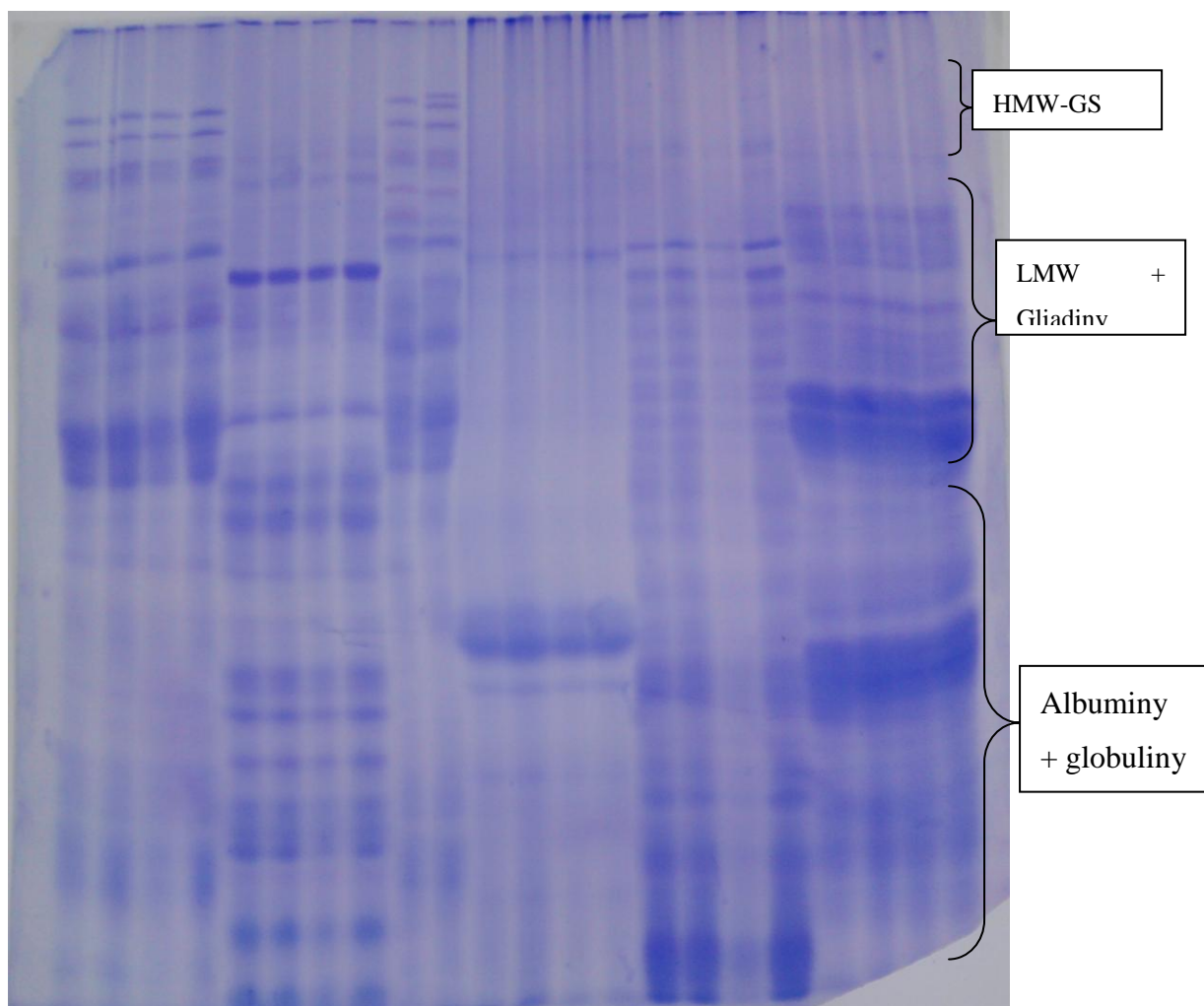


Obrázok 24 : Densitometrický záznam elektroforetického profilu jačmeň SK 5451



Obrázok 25 : Densitometrický záznam elektroforetického profilu Chinese Spring, Marquis

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22



Obrázok 26 : Elektroforetický záznam delenia zásobných bielkovín analyzovaných vzoriek

- 1. – 4. pšenica Livia
- 5. – 8. amarant Olpir
- 9. štandard Chinese Spring
- 10. štandard Marquis
- 11. – 14. cirok Hemaize
- 15. – 18. pohánka Bogatyr
- 19. – 22. ovos Azúr