

Milan Houška, Ivana Šetinová^{*)}, and Petr Kučera^{)}**

^{*)} Immunia spol. s r. o.

^{)} Fakultní nemocnice Královské Vinohrady**

Metody odstraňování alergenů z potravin



Přednáška vychází z poznatků práce:

Houska M., Setinova I., Kucera P., Food allergens and processing – A review of recent results, 291-337, chapter 16 in book Yanniotis S. et al. (eds.) Advances in Food Process Engineering Research and Applications, Food Engineering Series, DOI 10.1007/978-1-4614-7906-2, © Springer Science + Business Media New York 2013, 677 p., ISBN 978-1-4614-7906-2, ISSN 1571-0297

a dále z kapitoly 9, studie vypracované pro Ministerstvo zemědělství o názvu „Současné trendy výzkumu a vývoje potravin pro skupiny obyvatel se zvláštními požadavky na výživu“, Praha 2017



OBSAH

1. Úvod
2. Přehled metod a potravin
3. Závěry
4. Výhled do budoucnosti
5. Diskuse

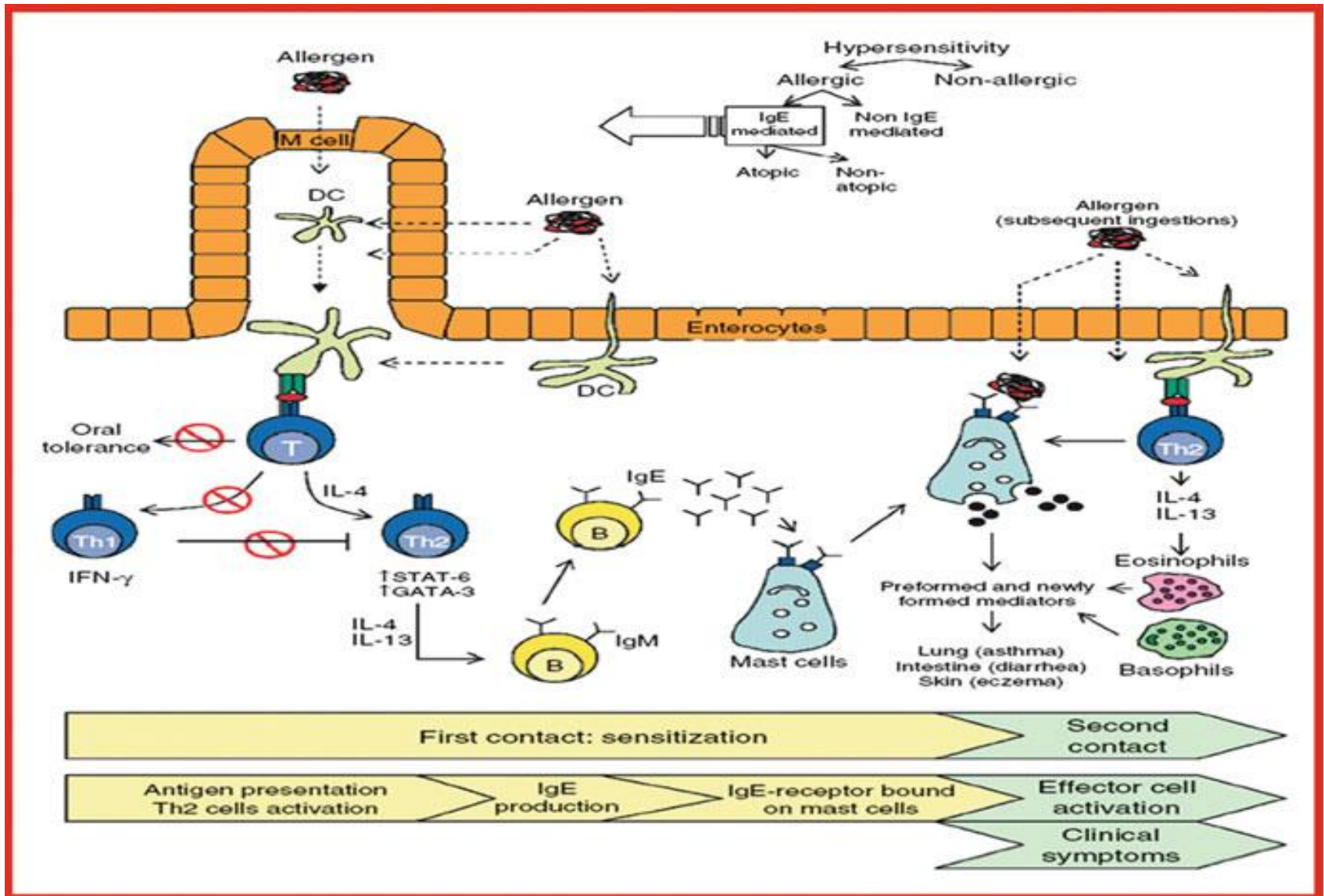


1. Úvod

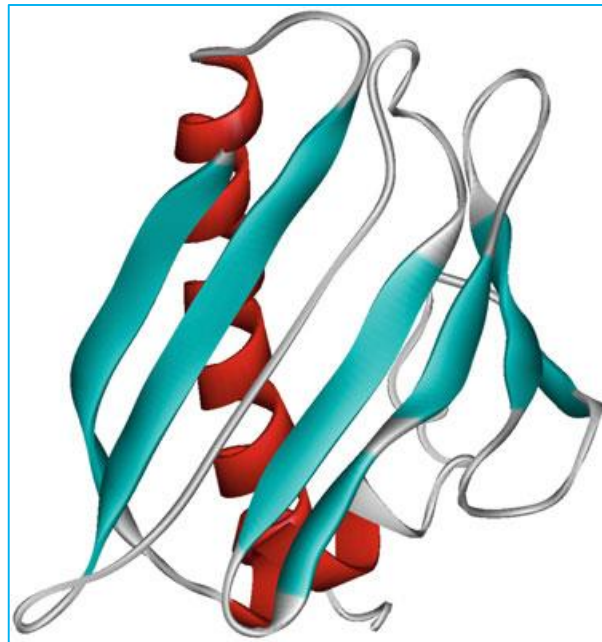
- **Alergenicita není klasickou vlastností potravin. Je založena na interakcích mezi potravinovou složkou nebo složkou a specifickým imunitním systémem spotřebitele.**
- **Základní princip potravinové alergenicity je vyjádřen na následujícím obrázku.**
- **Budeme se zabývat skutečnými alergickými syndromy a ignorovat takové problémy, jako je laktóza a její nesnášenlivost (intolerance).**



Imunitní systém a vývoj alergenicity



- **Pravé alergeny (zdroje epitopu) jsou molekuly proteinů**
- Tyto proteiny jsou v potravinách, jako je mléko [syrovátkové bílkoviny (např. beta-laktoglobulin a alfa-laktalbumin),
- vaječný bílek (ovalbumin),
- pyl břízy (Bet v1) a jeho homology v jablcích (Mal d 1), v mrkvi (Dau c 1), celeru (Api g 1) a arašidech (Ara h 8).
- Základní struktura typického alergenního proteinu z jablek zvaného Mal d1, je zřejmá z obrázku (alfa šroubovice 21%, beta listy 39%, 7 beta-řetězce, 3 alfa-šroubovice, 6 smyček)



- Lidský imunitní systém, jako "testovací nástroj", není homogenní: odlišné reakce lze nalézt pomocí kožní zkoušky, krevních buněk (test aktivace bazofilů), krevního séra (kvantifikace specifického IgE, demonstrace antigenní protilátky reakcí s elektroforézou pomocí SDS - polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE), test western blot (WB) nebo test ústní sliznice (dvojitě zaslepený placebem kontrolovaný potravinový test (DBPCFC)).
- Proto je potřeba provést baterii testů a studií (např. studovat strukturu bílkovin, stabilitu při enzymovém štěpení pepsin *in-vitro*, obsahu bílkovin ve výrobku), specifické studie vazby na IgE nebo kožní test, abychom přesvědčivě prokázali vliv účinku zpracování.
- Hlavním cílem této prezentace je poskytnout přehled nedávných úspěchů v dealergizaci potravin s využitím různých způsobů zpracování.

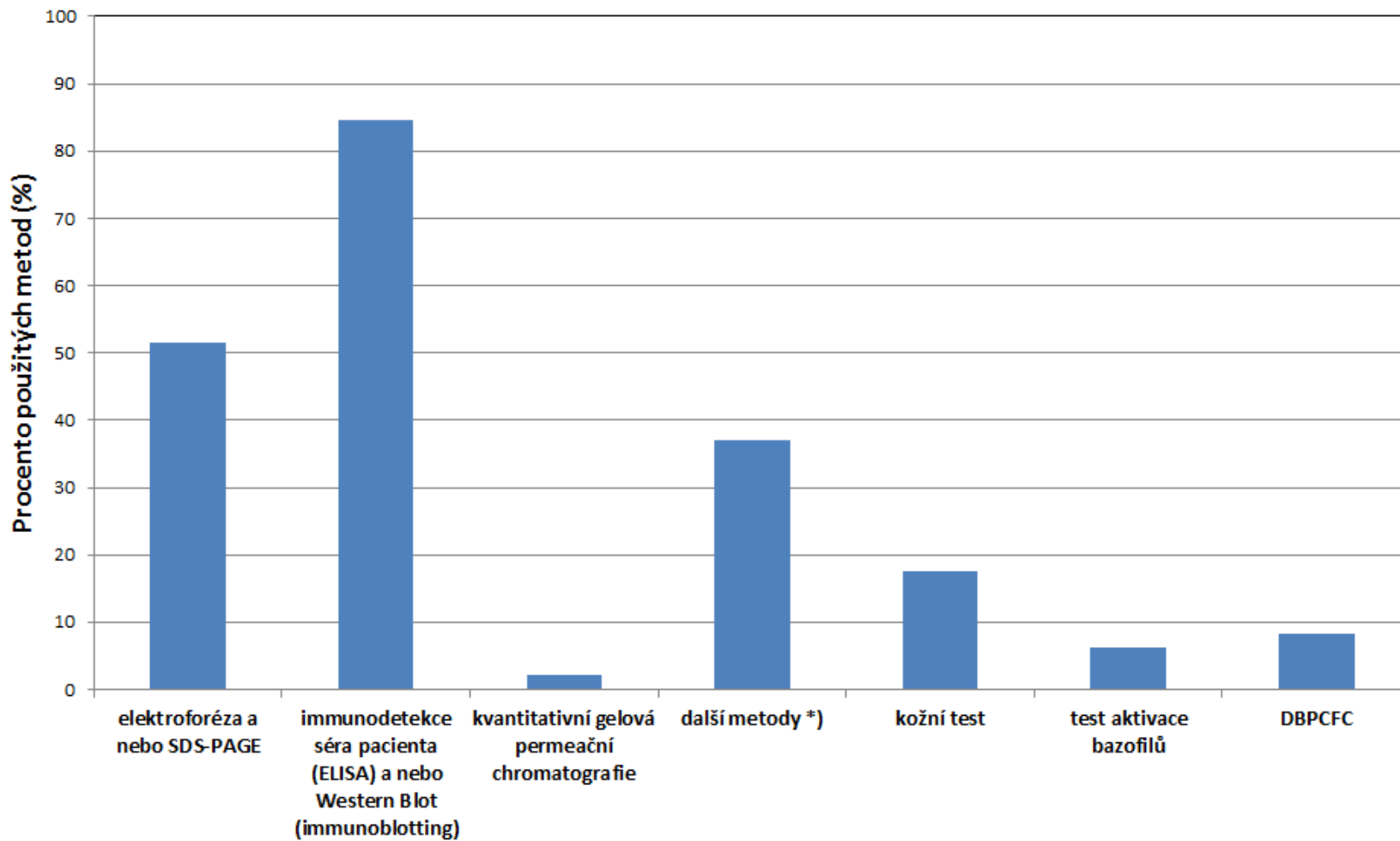
2. Přehled metod a potravin

Byla provedena literární rešerše v databázi Scopus s klíčovými slovy „food allergenicity a „process“.

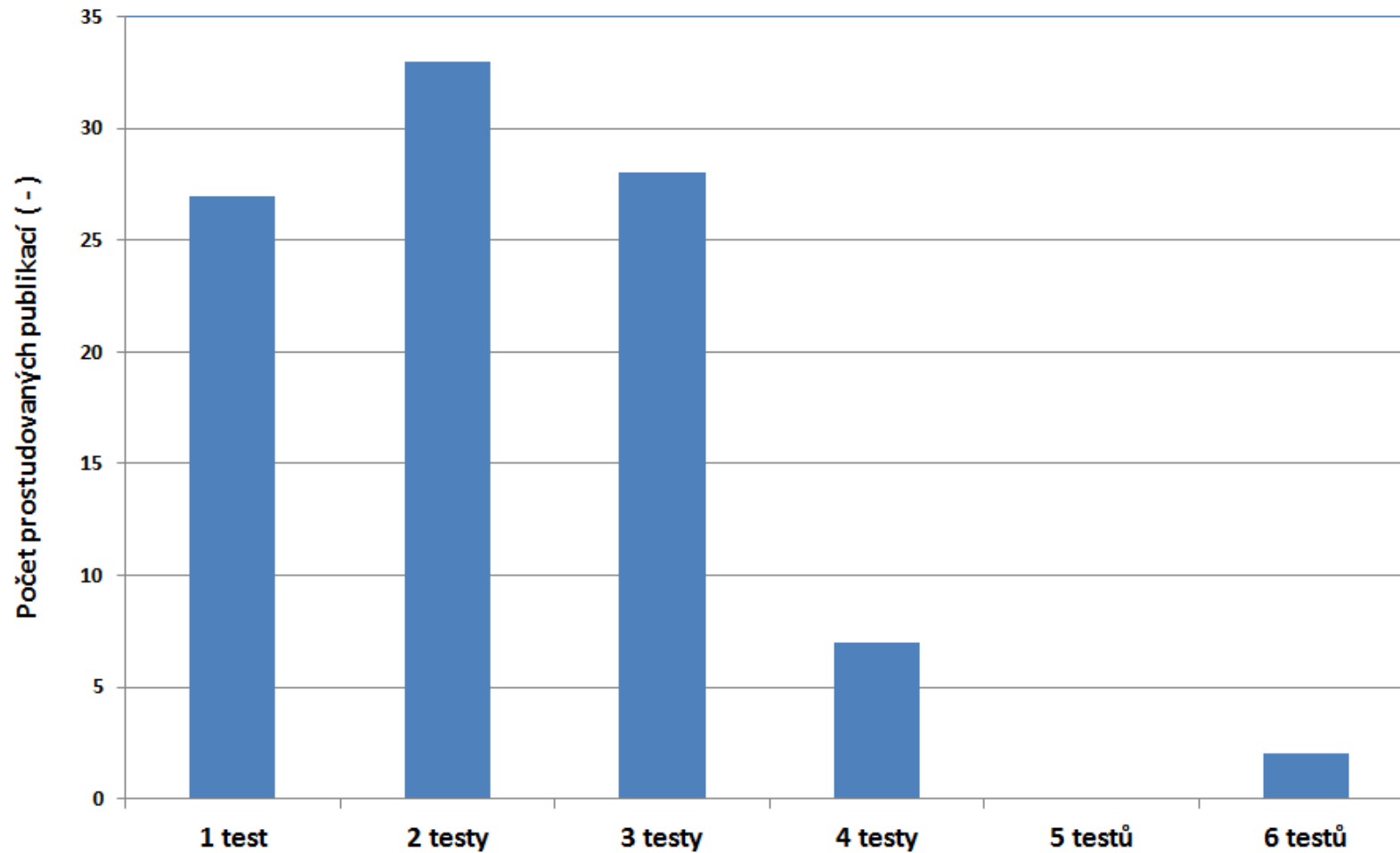
Byly nalezeny následující zpracovatelské metody:

- tepelné zpracování,
- enzymová hydrolýza a in-vitro trávení,
- gama záření, fermentace,
- čišění (u olejů),
- mikropartikulace,
- genetická modifikace,
- pulzní ultrafialové záření (PUV),
- polymerizace alergenních bílkovin,
- ošetření vysokým tlakem (HPT)
- pulzní elektrické pole (PUF).
- ultrafiltrace ve spojitosti s předchozí koagulací.

Procento aplikovaných metod v revidovaných publikacích



Počet prostudovaných publikací s použitím daného počtu testů



Přehled metod a potravin

TEPELNÉ ZPRACOVÁNÍ

VEJCE

LUŠTĚNINY

RYBY A MOŘSKÉ PLODY

MASO A MASOVÉ VÝROBKY

ARAŠÍDY A DALŠÍ OŘECHY

OVOCE A ZELENINA

TĚSTOVINY, OBILOVINY A PEČIVO

MLÉKO A MLÉČNÉ BÍLKOVINY

ENZYMOVÁ HYDROLÝZA A IN-VITRO TRÁVENÍ

MLÉKO

ARAŠÍDY A ARAŠÍDOVÉ ALERGENY

OVOCE A ZELENINA

PŠENIČNÁ MOUKA

LUŠTĚNINY

RÝŽE

GAMA ZÁŘENÍ

SEBASTIANIA JACOBINENSIS KŮROVÝ LEKTIN

MLÉČNÉ BÍLKOVINY

PROTEINY VAJEC

GLIADIN

KREVETY

Přehled metod a potravin

FERMENTACE

SYROVÁTKOVÉ BÍLKOVINY

LUŠTĚNINY

KREVETY

PŘEČIŠTĚNÍ

ARAŠÍDOVÝ OLEJ

SLUNEČNICOVÝ OLEJ

SÓJOVÝ LECITIN A SÓJOVÝ OLEJ

MICROPARTIKULACE

TUKOVÉ NÁHRADY

GENETICKÉ MODIFIKACE

LUŠTĚNINY

TRANSGENNÍ RÝŽE

ARAŠÍDY

HLAVNÍ ALERGEN VAJEČNÉHO BILKU OVOMUKOID (GAL D1)

PULZNÍ ULTRAFIALOVÉ ZÁŘENÍ (PUV)

ARAŠÍDY

SÓJA

Přehled metod a potravin

POLYMERIZACE ALERGENNÍCH BÍLKOVIN

ARAŠÍDY

OVOCE A ZELENINA, ŠŤÁVY

OŠETŘENÍ VYSOKÝM TLAKEM A PULZNÍM ELEKTRICKÝM POLEM

RÝŽE

INHIBITOR ALFA-AMYLÁZY

OVOCE A ZELENINA, ŠŤÁVY A ALERGENY

BÍLKOVINY KRAVSKÉHO MLÉKA

ARAŠÍDY A JABLEČNÉ ALERGENY

Ukázka obsahu tabulek v původní přehledové práci

Proces/druh potravin	Potravina nebo složka potravin/podrobnosti zpracování	Test alergie (nebo použitá analytická metoda)							Odkazy
		Elektroforéza nebo SDS-PAGE	Imunodetekce (ELISA) nebo western blot (immunoblotting)	Kvantitativní gelová permeační chromatografie	Ostatní metody	Kožní alergický test	Test aktivace bazofilů (BAT)	DBPC FC	
TEPELNÉ ZPRACOVÁNÍ									
Vejce									
Vaření	Složky bílku: ovalbumin, ovomukoid a konalbumin				Radioimunoelktroforéza (RIEP) a RAST				Hoffman (1983)
Přídavek octa během vaření	Vejce, kuře, čočka		x			7 pacientů		1 pacient	Armentia a kol. (2010)
Luštěniny									
Vaření	Čočka	x	x						Ibáñez Sañdín a kol. (1999)
Tepelné zpracování při 80, 100 a 120 °C po dobu 30 minut	Sójové proteiny 11 S-, 7S- a 2S-globuliny				RAST (Radioallergosorbent test) a inhibiční testy pomocí RAST				Shibasaki a kol. (1980)

TEPELNÉ ZPRACOVÁNÍ

Nejběžnějším procesem bylo použití tepla k transformaci suroviny na konzumovatelnou potravinu. Pasterace, sterilace, vaření a pražení byly často používané metody.

VEJCE

Vejce, po varu, stále vykazovaly detekovatelnou alergenicitu; nicméně vaření s různými složkami jako je ocet, podstatně snížilo velikost pupenů v kožních testech na u senzibilizovaných osob

LUŠTĚNINY

Bylo zjištěno, že vařený čočkový extrakt udržel alergenicitu, zatímco sojový globulin ztratil část své alergie při zahřátí .

RYBY A MOŘSKÉ PLODY

Při vaření ryb došlo k denaturaci a konglomeraci bílkovin, ale některé bílkovinné pruhy prezentující vazbu na IgE (WB) zůstaly. Po tepelné konzervaci se redukovala vazba na IgE. Vliv uzení, solení/slazení, tepelné konzervace, máčení a fermentace na pokles alergenicity více závisel na procesu než na druhu ryby. Chemické zpracování ryb vedlo ke ztrátě vazby na IgE, ale určité IgE vazby zůstaly jako odezva na modifikované nebo degradované peptidy. Sterilace makrel vedla k podstatné redukci alergenicity.

MASO A MASOVÉ VÝROBKY

Alergenicita vepřové klobásy ošetřené pepsinem a trypsinem se značně snížila po ošetření v autoklávu díky enzymovému zpracování. U těchto typů potravin se jeví zpracování v autoklávu jako slibná technologie pro snížení alergenicity. Vaření v páře, homogenizace nebo lyofilizace spolu s *in-vitro* multienzymovým štěpením vykázaly podstatné snížení alergenicity dětské výživy na bázi masa.

ARAŠÍDY A DALŠÍ OŘECHY

Počáteční studie o pražení arašídů ukázaly, že suchým tepelným zpracováním vznikají Maillardovy reakční produkty, které mají mnohem vyšší IgE vazebné vlastnosti než neošetřené kontrolní vzorky. Metody, jako je smažení nebo var arašíd, jak se praktikuje v Číně, zřejmě snižují alergenicitu arašíd ve srovnání se suchým pražením, což je v USA velmi rozšířené. Hlavní alergen z arašídů Ara h 2, získaný ze surových a pražených arašíd, je homologní a funguje jako inhibitor trypsinu. Zjistilo se, že pražení způsobuje 3,6 násobné zvýšení inhibiční aktivity trypsinu. Tepelná úprava rekombinantního Ara h 2 vedla k podstatnému zvýšení vazebné reakce IgE, neboť reaktivní sacharidy nebo jejich produkty rozkladu byly stále přítomny.

OVOCE A ZELENINA

Byly testovány tepelná sterilace broskví (121 °C po dobu 10 a 30 min), chemické loupání ovoce a ultrafiltrace šťávy přes membrány s vhodnými molekulárními filtry. Sterilace nebyla schopna snížit alergenicitu proteinu Pru p1. Kromě toho byl proteinový pás ještě přítomen i po 60 minutách reakce s dvěma různými kyselými proteázami.

Chemické louhování ovoce a ultrafiltrace šťávy membránami s molekulárními filtry dokázala snížit množství hlavního alergenu v broskvové šťávě

Chemické loupání, tepelné zpracování a procesy přípravy sirupu byly aplikovány na různé druhy třešní. Chemické loupání úspěšně odstranilo Pru av 3, LTP zodpovědný za alergické reakce u pacientů bez polinózy. Sirupovací proces odstranil téměř všechny alergenní proteiny.

Různé typy tepelného zpracování brambor pouze mírně snížily alergenní aktivitu. Mikrovlnné vývary z kořene celeru vykazují vysokou tepelnou labilitu pro Api g 1, ale profilinové a sacharidové epitopy se zdají být odolnější vůči teple ve srovnání s neošetřenými kontrolami .

Extrakty syrového, vařeného celeru a celerového listí byly testovány na čtyřech pacientech s pozitivním DBPCFC na celer. Zjištěna reakce i po uvaření celeru (76 minut při 100 °C). Bylo zjištěno, že celerové listí je alergenní u pacientů s alergií na syrový celer. V jiné studii byla zjištěna tolerance vařené mrkve u senzibilizovaných pacientů.

TĚSTOVINY, OBILOVINY A PEČIVO

Modelové vzorky těstovin (pšenice tvrdé) byly sušeny při teplotách 20, 60, 85, 110 a 180 °C a pak se vařily ve vroucí vodě. Proces trávení spolu s předchozí tepelnou úpravou, nebyl schopen úplně deaktivovat IgE-reaktivní peptidy.

Téměř všechny rýžové proteiny byly v procesu varu vyloučeny nebo oslabeny, avšak aktivita vazby IgE zůstala i v hypoalergenní rýži. Pšeničné těsto a chlebové drobký a kůrka před a po *in-vitro* trávení byly testovány na přítomnost alergenů. Během *in-vitro* trávení složky IgE vázající protein z nevyhřátého těsta zmizely, avšak pečivo z chleba a bílkoviny izolované z kůrky si udržely vazbu IgE.

Proteinové alergeny extrahované z pšenice, žita, ječmene a ovesné mouky byly tepelně ošetřeny s cílem napodobit standardní metody přípravy pokrmů. Přesto žádné procesní podmínky nezrušily vazbu IgE.

MLÉKO A MLÉČNÉ BÍLKOVINY

Syrové, pasterizované a homogenizované / pasterované kravské mléko a hypoalergenní kojenecká výživa jako kontrola byly testovány komerční firmou Host a Samuelsson (1988). Byl podán důkaz, že tepelné ošetření zvýšilo schopnost pasterizovaného a homogenizovaného / pasterizovaného mléka vyvolat alergické reakce u pacientů alergických na mléko.

Celý kasein, gama-globulin, sérový albumin, beta-laktoglobulin, alfa-laktalbumin a čerstvé kravské mléko byly testovány na alergenicitu po varu. Vroucí mléko po dobu 10 minut, ale nikoliv 2 min., vyloučilo kožní odezvu u subjektů citlivých na tepelně labilní sérový albumin nebo betalaktoglobulin, zatímco subjekty citlivé na tepelně stabilní kasein reagovaly stejně jako na čerstvé a vařené kravské mléko.

ENZYMOVÁ HYDROLÝZA A *IN-VITRO* TRÁVENÍ

Enzymová hydrolýza je v současné době nejúspěšnější metodou pro přípravu hypoalergenních a nealergenních potravin a používá se hlavně pro kojeneckou výživu. Metoda je založena na dělení proteinů na peptidy nebo dokonce na jednotlivé aminokyseliny s cílem zničit epitop(y) způsobující vazbu IgE u senzitivizovaných jedinců. Účinnost potravinové matrice a počet různých alergenů komplikují tento typ zpracování.

MLÉKO

Pouze rozsáhlý enzymový hydrolyzát by měl být považován za hypoalergenní mléko pro kojeneckou výživu. V současnosti je k dispozici několik komerčních přípravků s různými úrovněmi proteinové hydrolýzy .

ARAŠÍDY A ARAŠÍDOVÉ ALERGENY

Gastroduodenální digestivní fragmenty alergenu Arah1 si zachovávají stimulační vlastnosti T-buněk a IgE vazebné a zesíťovací vlastnosti nalezené v intaktním proteinu. Arašídový proteinový izolát trávený spolu s polysacharidy (tj. arabská guma, nízko metylovaný pektin a xylan) byl pouze částečně hydrolyzován. To bylo pravděpodobně způsobeno nespecifickými interakcemi mezi polysacharidy a peptidy. V retentátech se vazba IgE snížila trávením a přítomností xylanu. U dialyzátů byla vazba IgE snížena o všechny polysacharidy.

OVOCE A ZELENINA

Byl testován vliv enzymového rozkladu, mechanické desintegrace mechanických tkání a zahřívání během loupání, zpracování kaše a pasterace výrobků z manga s cílem stanovit vliv procesů na alergenicitu. Žádný podstatný pokles alergenicity nebyl pozorován u extraktů a nektarů z mangového pyré. Navíc konvenční způsoby úplně neodstranily alergenicitu produktů obsahujících mango-dužinu. Act d1 byl nevratně destabilizován v kyselých roztocích, ale tepelně indukovaná denaturace alergenu Act d2 (pH 2) byla plně reverzibilní. IgE vázaný na Act d2, ale nikoliv Act d1, byl zjištěn ve zpracovaných potravinářských výrobcích.

PŠENIČNÁ MOUKA

Pšeničná mouka byla enzymově hydrolyzována bromelainem a bylo zjištěno, že je tato metoda účinná při rozkladu struktury epitopu. Celuláza (50 °C, 1 h) a aktináza (40 °C, 1 h) byly použity pro enzymový rozklad alergenů na bázi celulózy a bílkovin v pšeničné mouce; mouka byla potom použita k přípravě těsta s využitím želatinizace škrobových složek. Výsledky testu ELISA ukázaly negativní alergenicitu ve většině případů.

LUŠTĚNINY

Bylo prokázáno, že ošetření sójových bobů proteázou výrazně snížilo antigenicitu na monoklonální protilátky a alergenicitu na séra od pacientů citlivých na sóju. Tyto výsledky dokazují, že existuje příležitost k rozvoji hypoalergenních výrobků.

RÝŽE

Rýžová zrna byla ošetřena aktinázou. Zkoušky alergenicity ukázaly negativní výsledky při klinickém podání přípravku sedmi pacientům trpících atopickou dermatitidou. Nedošlo k vyvolání alergické reakce u šesti ze sedmi pacientů.

GAMA ZÁŘENÍ

Princip účinku lze prokázat u ovalbuminu a bovinním sérovém albuminu v roztoku (0,2 % v 0,01 M fosfátovém pufru, pH 7,4); bílkoviny byly ozářeny vysokými dávkami (8 kGy). Tento proces způsobil vznik proteinových agregátů a degradovaných fragmentů s reaktivitou na specifické protilátky. Hlavní část reaktivity závislé na konformaci, tj. prostorové antigenní struktura (konformační epitop) byla odstraněna, ale určitá antigenicita přetrvala.

SEBASTIANIA JACOBINENSIS KŮROVÝ LEKTIN

Vysoké dávky záření gama (nad 1 kGy) způsobily významnou ztrátu aktivity kůrového lektinu z rostliny *Sebastiania jacobinensis* způsobenou zjevnými změnami v hydrofobním povrchu. Gamma ozáření také ukázalo, že způsobuje narušení struktury a agregaci bílkovin.

MLÉČNÉ BÍLKOVINY

Po ozáření bovinního alfa-kaseinu a beta-laktoglobulinu došlo ke změně jejich účinku alergenicity a antigenicity. Změna byla pravděpodobně způsobena aglomerací proteinů.

PROTEINY VAJEC

Koláče obsahující vaječný bílek byly ozařovány gama zářením o intenzitě 10 nebo 20 kGy. Po ozařování a zpracování bylo zjištěno, že alergenita ovalbuminu klesá. Vaječný bílek, ozářený s cílem snížení alergií na vejce, by mohl být použit k výrobě bezpečnějších koláčů. Ovumukoid ze slepičího vejce, při bazickém pH, byl ozářen při 10 kGy nebo zahřát při teplotě 100 °C po dobu 15 minut. Byla nalezena kombinace ozařování a ohřevu, která byla velmi účinná při snižování množství alergenního (neporušeného) ovomucoidu bez ohledu na pH.

GLIADIN

Komerční gliadinový prášek a pšeničná mouka byly ozařovány dávkami mezi 2,2 a 12,8 kGy. Překvapivé bylo, že ozařovaný gliadin zvýšil alergenitu. Gliadin extrahovaný z ozařované pšeničné mouky vykázal vyšší imunoreaktivitu než čistý gliadin ozářený stejnou dávkou.

KREVETY

Tepelně stabilní protein v krevetě byl izolován a ozařován gama zářením při 0, 1, 3, 5, 7 nebo 10 kGy v roztoku (1 mg / ml). Byly ozářeny i čerstvé krevety. Rychlost vazby na IgE byla snížena se zvyšujícími se dávkami záření. Hlavní pás zmizel a stopy indukované koagulací se objevily ve vyšší molekulárně-hmotnostní zóně, což bylo prokázáno pomocí SDS-PAGE.

FERMENTACE

Tento proces je podobný v mnoha ohledech enzymové hydrolýze, protože mikroorganismy působí svými enzymovými systémy na součásti potravinové matrice včetně bílkovin. Fermentace je složitý proces a to bylo důvodem věnovat pozornost tomuto tématu samostatně.

SYROVÁTKOVÉ BÍLKOVINY

Alfa-laktalbumin a beta-laktoglobulin syrovátky ze sterilizovaného fermentovaného mléka byly testovány na antigenicitu a alergenicitu. Vzhledem k tomu, že antigenicita byla podstatně nižší, alergenicita syrovátkové bílkoviny se pouze mírně snížila. Imunoreaktivita syrového a pasterovaného mléka „přirozeně“ fermentovaného se jen mírně snížila. Průmyslově vyrobené kysané mléko a acidofilní mléko mělo mnohem nižší úroveň imunoreaktivity.

LUŠTĚNINY

Sójové produkty jako výhonky, tempeh, tofu, miso, plísňemi hydrolyzovaná sojová omáčka, kyselinou hydrolyzovaná sojová omáčka, a hydrolyzované rostlinné bílkoviny byly testovány na alergenicitu s využitím kompetitivního inhibičního testu. Výsledky ukázaly, že fermentace může změnit nebo odstranit alergenní epitopy.

Hrachová mouka, fermentovaná třemi mléčnými bakteriemi a plísňovými R mikrosporami snížila zbytkovou antigenicitu proti antipea protilátkám, ale reakce na antipea profilin a anti-Bet v1 byly stále detekovatelné i po fermentaci.

Gliadin byl fermentován s použitím koncentrovaných surových enzymů mikroorganismu *Bacillus subtilis*. Zdrojem enzymů byl kmen *B. subtilis*, izolovaný z fermentovaných sójových potravin. Tento proces snižuje alergenicitu gliadinu hydrolyzou alergenních gliadinových fragmentů detekovaných imunoblotinkem.

KREVETY

Syrové krevety (*Acetes japonicus*) a saeujeot (solené a kvašené krevety) v zelí kimchi byly testovány na alergenicitu. Alergenicitata jak polotovarů krevet tak saeujeot v kimchi, se prokazatelně snižuje během fermentace, ale snížení alergenicity je větší u saeujeot než u surových krevet.

PŘEČIŠTĚNÍ

Tento proces zahrnuje zejména rostlinné oleje se stopami proteinů pocházejících ze semen v průběhu lisování oleje.

ARAŠÍDOVÝ OLEJ

Bylo prokázáno, že rafinovaný arašídový olej je bezpečný pro převážnou většinu lidí s alergií na arašíd, ale nerafinovaný arašídový olej může vyvolat reakce u některých z těchto osob.

SLUNEČNICOVÝ OLEJ

Slunečnicový olej byl odebrán v různých fázích procesu rafinace: surový lisovaný

olej, okyselený a neutralizovaný, předodslizení centrifugací, mytí, bělení, odslizení filtrací a deodorizací. Test SDS-PAGE identifikoval pět pásů od 67 do 145 kDa, přičemž nejpozoruhodnější byl pás 67 kDa, který představuje hlavní alergen. Množství tohoto proteinu klesá se stupněm rafinace, ale přesto byly jeho stopy i v rafinovaném stavu oleje. Proto rafinovaný slunečnicový olej může představovat riziko pro osoby s vysokou citlivostí k slunečnicovým semenům.

SÓJOVÝ LECITIN A SÓJOVÝ OLEJ

U rafinovaného sojového oleje nebyla nalezena aktivita IgE vazbu ačkoli nerafinované oleje a sojový lecitin vykazovaly zbytkovou IgE vazebnou aktivitu. Extrakty lecitinu vykázaly IgE-vazbu na protein s molekulovou hmotností přibližně 16 kDa . Bylo podrobno testu šest komerčních sojových lecitinů s extrakty ze syrových a tepelně zpracovaných sojových bobů. Lecitiny, které obsahovaly zbytkové proteiny, způsobily uvolnění specifického mediátoru. Tyto produkty mohou vyvolat alergické symptomy. Výsledky ukázaly, že sójové lecitiny byly schopné vnášet skryté alergeny do zpracovaných potravin a potenciál vazby IgE byl úměrný celkovému obsahu bílkovin.

MIKROPARTIKULACE

Evropská legislativa vyžaduje, aby nové potraviny a nové technologie byly před použitím v potravinářském průmyslu testovány na nepříznivé účinky na strukturu a složení ošetřených potravin, včetně výroby neoalergenů. Již v roce 1992 ukázali vědci výsledky takového testu technologie mikročástic.

TUKOVÉ NÁHRADY

Mikropartikulované bílkoviny z vaječného bílku nebo bílkoviny kravského mléka používané jako náhražka tuku byly testovány na alergenicitu. Stejně alergeny jako ty, které byly nalezeny v původních produktech, byly identifikovány v mikropartikulovaných produktech. V zpracovaných testovacích materiálech nebyly nalezeny žádné nové proteinové frakce.

GENETICKÉ MODIFIKACE

Nejde sice o proces ve smyslu potravinářského inženýrství, ale naše studie tento proces zahrnula, kvůli jeho velkému potenciálu. Tato modifikace totiž může ovlivnit generování alergenních proteinů v počátečních fázích šlechtění rostlin. Geneticky modifikovaný organismus (GMO) je široce testován na přítomnost neoalergenů. Šlechtitelské organizace GMO rostlin jsou proto motivovány k financování výzkumu stávajících alergenů v rostlinách a jejich srovnání s nově navrženými rostlinami s nižším obsahem alergenů.

LUŠTĚNINY

Byly vyvinuty transgenní sójové boby s 2S albuminem bohatým na metionin z Brazilských ořechů (*Bertholletia excelsa*). 2S albumin je pravděpodobně hlavním alergenem Brazilského ořechu. Je zajímavé, že transgenní sójové boby analyzované v této studii obsahují tuto bílkovinu. Prokázalo se, že alergeny z potravin, o kterých je známo, že jsou alergenní, mohou být přeneseny do jiné potraviny pomocí genetického inženýrství. Autoři substituovali aminokyselinu s jedním místem v 5 imuno-dominantních epitopech Gly m Bd 30 K alaninem a způsobili redukci nebo eliminaci IgE vazeb epitopů 6 a 16, jak bylo ukázáno sérovými testy šesti pacientů citlivých na sóju.

TRANSGENNÍ RÝŽE

Alergenní bílkoviny o velikosti 14-16 kDa a jejich transkripty semen z několika transgenních linií vykazaly mnohem nižší koncentrace než proteiny izolované z rodičovských semen divoké rýže. Toto snížení bylo stabilní ve třech generacích rostlin. Kromě toho bylo prokázáno, že obsah alergenů velikosti 16 kDa ze semen několika transgenních rostlin rýže je mnohem nižší než obsah alergenů 16 kDa pocházející z rodičovské rýže divokého typu.

ARAŠÍDY

Byla indentifikována jedna arašídová linie GT-C9, postrádající několik proteinů semen, která byla indentifikována jako Ara h3 izoforma peptidovým sekvenováním a nazvali ji iso-Ara h3. Byla získána sekvence úplné délky iso-Ara h3 (GenBank číslo DQ855115). Odvozená aminokyselinová sekvence iso-Ara h3 (ABI17154) měla první tři ze čtyř IgE-vazebných epitopů Ara h3. Anti-Ara h3 protilátky reagovaly se dvěma skupinami proteinových peptidů. Jeden měl silnou reakci a druhý měl jen slabou reakci. Peptidové pásy se slabou reakcí na protilátky anti-Ara h3 byly podjednotky nebo izoalergeny tohoto potenciálního alergenu arašínu iso-Ara 3. 3. Nedávná studie ukázala, že základní podjednotky Ara h3 mohou být významnějšími alergeny než kyselé podjednotky.

HLAVNÍ ALERGEN VAJEČNÉHO BÍLKU OVOMUKOID (GAL D1)

Substitucí dvou aminokyselin v šesti peptidech ve třetí doméně ovomukoidu [nahrazení fenylalaninu v poloze 37 (F37) methioninem] dojde k významné ztrátě vazby IgG a IgE, stejně jako narušení struktury α -helixu. Nahrazení glycinu ve 32. poloze společně s F37 ukázalo synergický účinek při snižování antigenicity.

PULZNÍ ULTRAFIALOVÉ ZÁŘENÍ (PUV)

Tato metoda má velký potenciál pro použití v průmyslovém měřítku díky své jednoduchosti a účinnosti.

ARAŠÍDY

Extrakt arašídů a arašídového másla byl ošetřen pulzním ultrafialovým zářením xenonovou lampou RS-3000C při frekvenci tři záblesky za sekundu umístěné 146 mm od osy lampy. Ošetření trvalo 4 minuty (extrakt) nebo 3 minuty (kapalné arašídové máslo). Převaření bylo použito jako kontrolní metoda. PUV metoda snížila rozpustnost arašídového alergenu 63-kDa, ale rozpustnost alergenů velikosti 18-20 kDa nebyla ovlivněna. Nerozpustnost agregátů přispěla ke snížení hladiny alergenů v PUV ošetřených vzorcích. PUV ošetření mělo vliv na snížení IgE vazby arašídového extraktu nebo arašídového másla, ale snížení alergenicity je nutno ověřit klinickými studiemi.

SÓJA

Sójové extrakty byly ošetřeny PUV po dobu 2, 4 a 6 minut. Ukázalo se, že tento proces snížil hladiny sojových alergenů (tj. glycininu a beta-konglycininu). Ošetření PUV snížilo alergenní potenciál sojových extraktů. Optimální čas ošetření byl stanoven na 4 minuty. Tato technologie má potenciál průmyslového využití pro výrobu méně alergenních sojových nápojů a výrobků, ale dosavadní výsledky je třeba potvrdit klinicky.

POLYMERIZACE ALERGENNÍCH BÍLKOVIN

Tato metoda je založena na oxidaci fenolických látek, které jsou přirozenou složkou dané potraviny nebo jsou do ní záměrně přidány. Oxidační produkty polymerují s bílkoviny a vznikají komplexy s mnohem větší molekulovou hmotností než původní alergen. Takto jsou vytvořeny epitopy, které nejsou schopny IgE vazby.

ARAŠÍDY

Bílkovinové extrakty ze syrových a pražených arašídů a odtučněné arašídové hmoty (pH 8) byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 60 minut s anebo bez peroxidázy v přítomnosti peroxidu vodíku. Zpracování peroxidázou nemělo vliv na zesíťování bílkoviny (izolované ze syrových arašídů). Byl zjištěn pokles obsahu hlavních alergenů, Ara h1 a Ara h2 v pražených arašídech po zpracování peroxidázou, způsobený vytvořením polymerů a snížením vazby IgE.

Arašídové extrakty byly ošetřeny za přítomnosti polyfenoloxidázy (PPO) a kyseliny kávové (pH 8, 37°C, působení 1 hodina) a jen kyseliny kávové (pH 10,5 přes noc). Byla detekována polymerace a pokles obsahu hlavních alergenů arašídů Ara h 1 a Ara h 2. Zpracování kombinací PPO/kyseliny kávové způsobilo snížení alergenicity těchto alergenů díky jejich polymeraci.

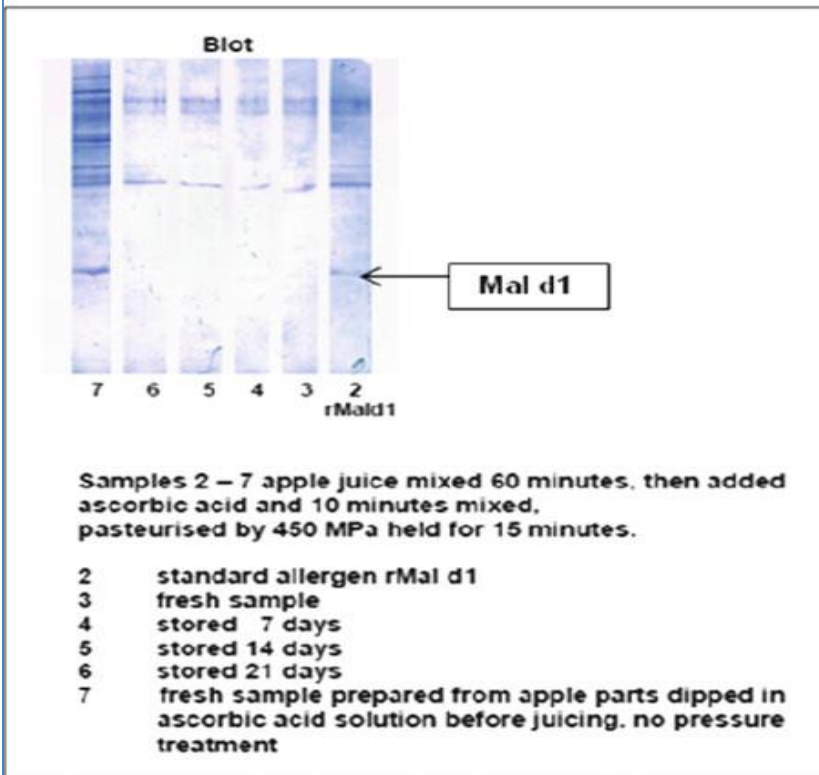
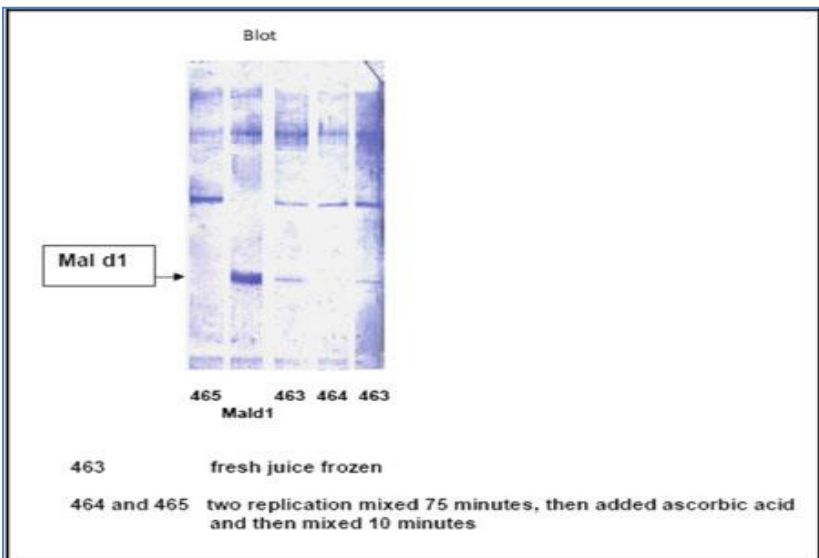
Extrakty ze syrových a pražených arašídů byly ošetřeny kyselinou fytovou při různých hodnotách pH (kontrolní vzorek neošetřen). Kyselina fytová formovala komplexy s hlavními alergeny arašídů, které tím ztratily schopnost IgE vazby (komplexy byly nerozpustné při kyselých a neutrálních podmínkách), což vedlo ke ztrátě alergenicity a arašídové máslo se chovalo podobně.

Vmíchání fenolických látek do extraktu arašídů a kapalného arašídového másla vedlo k precipitaci hlavních arašídových alergenů Ara h 1 a Ara h 2 a vazba na IgE klesla přibližně 10 až 16 krát.

OVOCE A ZELENINA, ŠŤÁVY

Aktivita vazby na IgE rekombinantního alergenu třešňí Pru av 1 byla studována po reakci s oxidačními produkty různých fenolických kyselin za přítomnosti polyfenoloxidázy. Kyselina kávová v kombinaci epikatechinem byla mezi nejsilnějšími inhibitory vazby alergenu rPru av1 na IgE.

Jablečný džus připravený z odrůdy Golden delicious byl ošetřen oxidací a následně pasterací vysokým tlakem za studena. Tento proces dealergizoval hlavní alergen Mal d1. V průběhu skladování po dobu 3 týdnů oxidovaná, tlakem ošetřená jablečná šťáva neobnovila svou alergenicitu, jak bylo ověřeno WB testem na skupině osob alergenních na Mal d1. Detaily výsledků WB testu pro dealergizovanou jablečnou šťávu jsou uvedeny v následujících obrázcích. Oxidační metoda je založena na teorii práce Chung a kol. (2005), viz obrázek dále. Všechny nezbytné složky jsou často přítomné ve šťávách, které jsou k mání na trhu. Je zřejmé, že tato metoda může být široce použita.



Výsledky se týkají šťávy připravené v průmyslových podmínkách, test byl proveden na 19 pacientech, z nichž 18 nevykázalo žádnou reakci, přičemž ošetření tlakem nemá vliv na pozorované změny v alergenicitě.

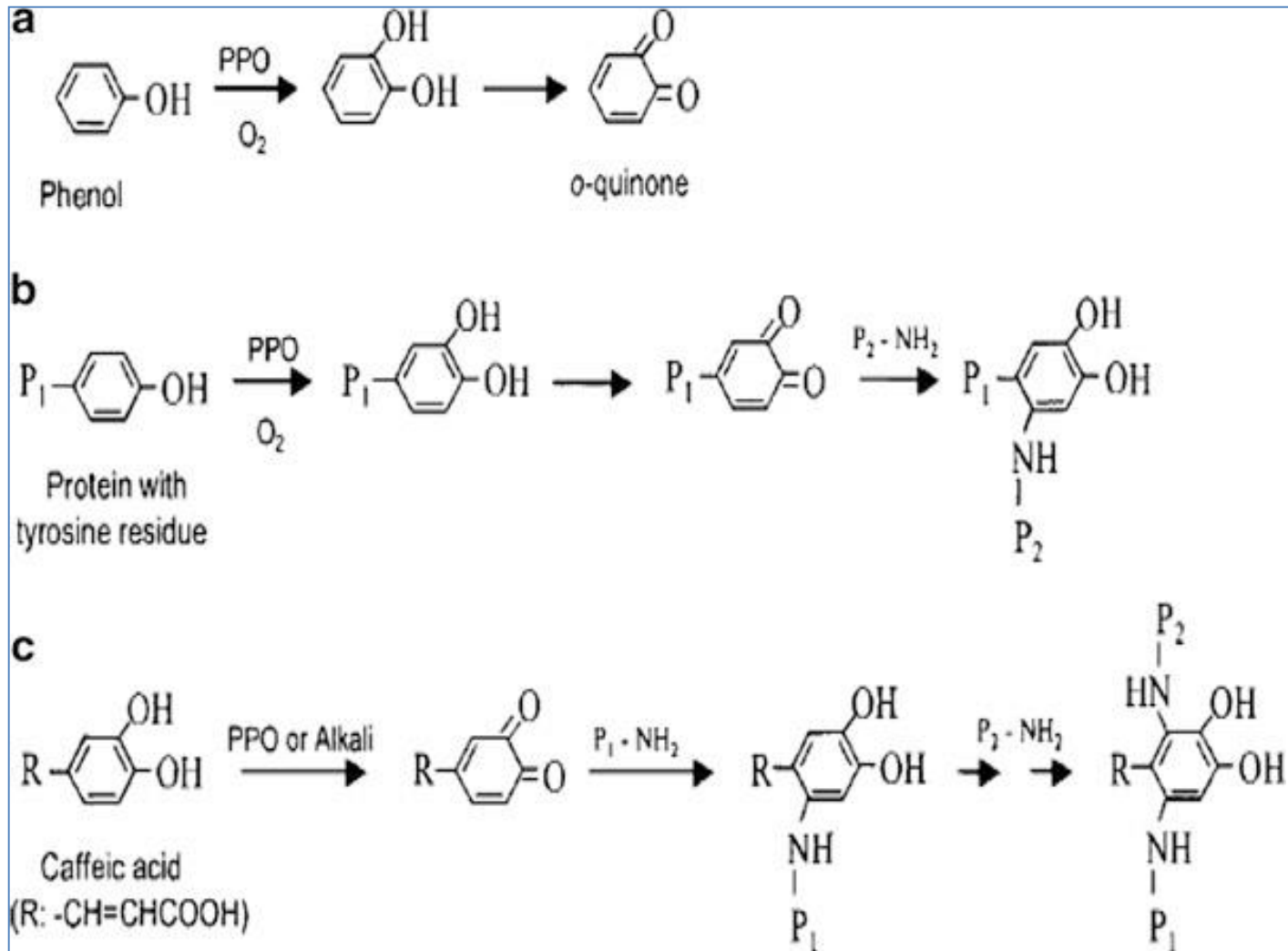
Legenda k hornímu obrázku

463 čerstvá mražená jablečná šťáva,
464 a 465 dvě opakování vzorků šťávy míchané 75 minut, poté přidána kyselina askorbová a šťáva míchána 10 minut,
Mal d1 čistý jablečný alergen

Legenda k dolnímu obrázku

vzorky 2-7 byly míchány 60 minut, poté přidána kyselina askorbová a šťáva míchána 10 minut, následovala pasterace vysokým tlakem 450 MPa s výdrží na tlaku 15 minut
2 standard alergenu rMal d1
3 čerstvý vzorek šťávy,
4 ošetřený vzorek skladovaný 7 dní
5 dtto skladovaný 14 dní
6 dtto skladovaný 21 dní
7 vzorek šťávy připravený z plátků máčených v roztoku kyseliny askorbové před vylisováním šťávy – bez tlakování)

Mechanismus polymerace publikovaný autory Chung et al (2005) vyžaduje přítomnost fenolických kyselin, polyfenoloxidázy, nízký obsah antioxidantů, zavedení kyslíku (vzduchu) a dostatek času na reakci. Všechny složky jsou přítomny v jablečné dřevě.



Dealergizovaná jablečná šťáva obohacená kyselinou askorbovou a pasterovaná vysokým tlakem



OŠETŘENÍ VYSOKÝM TLAKEM A PULZNÍM ELEKTRICKÝM POLEM

Existovala velká očekávání, že ošetření vysokým tlakem bude mít vliv na alergenicitu ovocných a zeleninových šťáv. Rigorózní testy s čistými homology alergenů břízy, jablka, mrkve a celeru ukázaly, že ošetření vysokým tlakem samotné nemá příčinný charakter pozorovaných změn alergenicity. Podmínky ošetření tlakem pravděpodobně zvýšily účinnost reakcí (oxidace, polymerace), které vedly k pozorovanému snížení alergenicity ošetřených potravin.

Nedávné výsledky ukázaly, že ošetření vysokým tlakem může snížit alergenicitu (test IgE) inhibitoru pšeničné alfa-amylázy a bovinního gama globulinu. Tři dřívější práce prezentovaly aplikace vysokého tlaku jako nástroj na urychlení reakce a prohloubení enzymové hydrolýzy hlavních alergenů v rýži a mléce. Sterilizace asistovaná vysokým tlakem je přicházející nadějnou technologií, která se zdá být efektivním nástrojem k inaktivaci hlavních jablečných alergenů Mal d1 a Mal d3 a alergenu celeru Api g1.

RÝŽE

Zrnka rýže umístěná v destilované vodě a tlakovaná v rozsahu 100-400 MPa uvolnila podstatnou část bílkovin, které se v zrnkách nacházely. SDS-PAGE test identifikoval hlavní bílkovinné alergeny 16 kDa albumin, alfa-globulin a 33 kDa globulin. Jestliže byly aplikovány proteolytické enzymy, došlo ke kompletnímu odstranění alergenů ze zrnok rýže.

INHIBITOR ALFA-AMYLÁZY

Struktura inhibitoru alfa-amylázy byla studována z hlediska vlivu ošetření vysokým tlakem. Byly aplikovány metody spektrum cirkulárního dichroismu (CD), fluorescence a UV spektroskopie. Rovněž byl použit test IgE specifických aktivit, aby se stanovil vliv tlaku 300 MPa s cílem změnit její terciální strukturu. Tlakem ošetřená bílkovina vykázala sníženou vazbu na IgE. Lze předpokládat, že konformační změny v terciální struktuře byly důvodem snížené alergenicity tlakem ošetřené bílkoviny.

OVOCE A ZELENINA, ŠTÁVY A ALERGENY

- Scheibenzuber prezentoval v roce 2003 výsledky, které se týkaly vlivu vysokého tlaku na alergenicitu a změny struktury alergenů jablka (hlavní jablečný alergen Mal d1), lískového oříšku, mrkve, třešně, broskve a celeru. Devatenáct alergických pacientů tolerovalo tlakem ošetřené jablko (600 MPa, 5 minut) bez symptomů orálního alergického syndromu. Kožní testy ukázaly korelaci mezi inaktivací alergenu a aplikovaným tlakem. Ošetření tlakem způsobilo evidentní změny struktury alergenů, což bylo dokázáno CD a Fourierovou transformací infračervených spekter (FTIR). Vzorky alergenu Mal d1 ošetřené tlakem a teplem vykázaly vyšší stupeň degranulace v testu bazofilů.

- Pufrované roztoky rekombinantního Bet v1 (r Bet v 1) a extraktu pylu břízy byly ošetřeny vysokým tlakem (450–550 MPa po dobu 10 minut při teplotě 30-50 °C). Největší změny struktury rBet v1 byly stanoveny ve vzorcích ošetřených tlakem 450 MPa při teplotě 30 °C. Vzorky ošetřené tlakem 500 a 550 MPa při 30 °C po dobu 10 minut nevykázaly změnu struktury. Ošetření tlakem 450-550 MPa po dobu 10 minut při teplotách 30, 40 a 50 °C nezměnilo alergenicitu (WB test) alergenu rBet v1 nebo extraktu pylu břízy v porovnání s neošetřenými vzorky.

-Pufrované roztoky rekombinantního Api g 1 (rApi g1), což je hlavní alergen celeru, byly ošetřeny tlakem 500 MPa s dobou výdrže 10 a 20 minut při teplotě 30, 40 a 50 °C. Největší změny struktury byly nalezeny u vzorku ošetřeného tlakem 500 MPa při teplotě 50 °C. U vzorků ošetřených při teplotě 50 °C a tlacích 400, 450 a 500 MPa po dobu 10 a 20 minut došlo k pozitivní změně struktury s rostoucím tlakem. WB analýzy ukázaly, že ošetření tlakem nezměnilo alergenicitu rApi g1 bílkoviny v porovnání s neošetřenými vzorky.

-Rekombinantní hlavní alergen mrkve (rDau c1 a mrkvová šťáva byly ošetřeny vysokým tlakem v 500 MPa s výdrží na tlaku 10 minut při rozdílných teplotách 30, 40 a 50 °C. Mrkvová šťáva byla ošetřena tlakem v rozsahu 400-550 MPa po dobu 3 a 10 minut. Na základě *in-vitro* a *in-vivo* testů bylo prokázáno, že ošetření tlakem nemělo žádný vliv na alergenicitu rDau c1 a mrkvové šťávy. Byly pozorovány pouze změny struktury.

-Extrakt z jablka odrůdy Golden delicious byly ošetřeny různými tlaky až do 800 MPa a skladovány 10 měsíců. RAST inhibiční test za použití sér španělských pacientů neukázal žádný vliv ošetření tlakem na antigenicitu nebo IgE vazbu. Antigenicita tlakovaných extraktů zůstala zachována i v průběhu skladování po dobu 10 měsíců ve zmraženém stavu. Immunoblot test prokázal, že ohřev je mnohem důležitější než tlakování, protože indukuje nevratné změny v klíčových epitopech.

-Hlavní alergeny jablka a mrkve rMal d1 a rDau c1 byly ošetřeny tlaky 400, 450, 500 a 550 MPa po dobu 3 a 10 minut při teplotě 25 °C a rovněž 500 MPa po dobu 10 minut při teplotách 30, 40 a 50 °C. Test *in-vitro* neprokázal žádné změny alergenicity obou alergenů díky ošetření vysokým tlakem. U tlaku 500 MPa byla prokázána změna spektra bílkoviny rMal d1 bez snížení její *in-vitro* reaktivity.

-U alergenu jablka rMal d 1 ošetřeného tlakem (500 MPa, 10 minut, 30 °C) došlo k největším změnám CD spektra v porovnání s neošetřeným vzorkem. Ošetření tlakem v rozsahu aplikovaných parametrů nebylo schopno změnit alergenicitu rMal d1v čistých roztocích pro zkoumanou skupinu pacientů. Experimenty prokázaly, že alergenicitu jablečné šťávy a jablečných homogenátů ošetřených touto technologií není možno podstatně snížit.

-Kombinovaný vliv vysokého tlaku a záhřevu na alergeny Mal d1, Mal d3 a Api g1 (hlavní alergen celeru) byl testován na originálních matricích. Mal d1 se ukázal jako labilní zatímco Mal d3 a Api g1 odolávaly vlivu zpracování. Přidání pektinu mělo ochranný vliv vzhledem k poklesu imunoreaktivity jak bylo prokázáno testy SDS-PAGE a WB. Vysoký tlak 700 MPa kombinovaný s vysokými teplotami 115 nebo 118 °C prezentoval slibné výsledky ve snížení alergenicity jablek a celeru.

BÍLKOVINY KRAVSKÉHO MLÉKA

Enzymy chymotrypsin a trypsin byly použity k hydrolýze beta-laktoglobulinu za podmínek vysokého tlaku. Zpracování beta-laktoglobulinu rozpuštěného v pufru s chymotrypsinem a trypsinem proběhlo při vysokém tlaku po dobu 20 minut a vedlo k akceleraci proteolýzy vedoucí k rychlému odstranění bílkoviny. Výsledky však nepodpořily očekávání, že by enzymová hydrolýza trypsinem a chymotrypsinem při vysokém tlaku selektivně odstranila alergenní oblasti beta-laktoglobulinu. Určité zbytkové IgE vazební vlastnosti zůstaly. Je však možné vybrat takové podmínky, které vedou k rychlé produkci hydrolyzátů s redukovanou alergenicitou, které mohou být použity ve výrobě hypoalergenních potravin.

- Tryptická a chymotryptická enzymová hydrolýza alfa a beta kaseinu, albuminu hovězího séra, beta-laktoglobulinu a alfa-laktalbuminu probíhala za izostatických podmínek při tlaku 500 MPa. Byly nalezeny významné změny v profilu peptidů a progresivní snížení zbytkových intaktních bílkovin v látkách, které prošly kryptickou proteolýzou za vysokého tlaku: šlo o beta-laktoglobulin, albumin z hovězího séra; u tlakem asistované chymotryptické proteolýzy šlo o beta-laktoglobulin, alfa-laktalbumin a albumin hovězího séra.

- Byl nalezen statisticky významný pokles reziduální imunochemické reaktivity beta-laktoglobulinu kryptického a alfa-laktalbuminu a chymotryptického hydrolyzátu připraveného za izostatických podmínek vysokého tlaku v porovnání s kontrolními vzorky hydrolyzovanými za atmosférického tlaku.

- Byly studovány strukturní změny bovinního gamaglobulinu a IgE vazební aktivity. Zatímco sekundární struktura bílkoviny se nezměnila díky ošetření vysokým tlakem, terciální struktura se změnila a IgE vazební aktivita klesla.

ARAŠÍDY A JABLEČNÉ ALERGENY

Přírodní přečištěné arašídové alergeny Ara h2 a 6 a jablečné alergeny Mal d3 a Mal d1b byly ošetřeny vysokým tlakem a pulzním elektrickým polem (PEF). Struktura alergenů studovaná CD spektroskopii nedoznala žádných změn po ošetření metodou PEF. Struktura Ara h2, 6 a Mal d3 se nezměnila po ošetření vysokým tlakem při teplotě 20 °C a pouze malé změny byly pozorovány ve struktuře Mal d1b. Alergeny Ara h2,6 byly stabilní při ošetření tlakem při teplotě 80 °C, ale struktury alergenů Mal d1b a Mal d3 se změnilly díky mnohem drsnějším podmínkám. ELISA test tepelně ošetřených vzorků alergenu Mal d3 ukázala, že reaktivita protilátky dobře korelovala se ztrátou struktury. Ošetření vysokým tlakem a PEF prezentovalo malý vliv na strukturu přečištěných alergenů.

Somkuti a její kolektiv použili vysokotlakou FTIR spektroskopii k určení tlakové a teplotní stability rekombinantního Mal d1. Bílkovina se rozvinula při teplotě 55 °C, přičemž zahřátí proběhlo při normálním atmosférickém tlaku. Tlakové rozložení bylo měřeno za různých pD podmínek a byl sledován vliv přidání směsi cukrů, podobných složením jablku a zkoumal se i účinek iontové síly. Ve všech případech bylo dokázáno, že alergen se rozkládá v rozmezí 150-250 MPa. Rozvíjení probíhalo nezvratně a následovala agregace rozvinuté bílkoviny.

3. Závěry

- Existuje několik úspěšných zpracovatelských metod pro dealergizaci potravin v průmyslových podmínkách. Hypoalergenní nebo nealergické výrobky v tržní síti jsou zpravidla připraveny enzymovou hydrolýzou (kojenecká výživa) nebo cíleným složením nealergenních složek (například bezlepkové pečivo, bezlepkové pivo).

- Dealergizace je výzvou pro potravinářské inženýry a vývojáře technologií výroby potravin nového typu.

- Vysokotlaká technologie nebo aplikace pulzního UV záření mohou být použity v blízké budoucnosti k prohloubení nebo urychlení enzymových reakcí nebo urychlení oxidace a polymerizace fenolických látek a alergenních složek, které se přirozeně vyskytují v potravinách nebo jsou do nich záměrně přidány (například jablečná šťáva nebo arašídové máslo).

- Přehled ukazuje, že závěry různých studií jsou zřídka připraveny na základě více než dvou testů alergenicity.

- Existují příklady, kdy *in-vitro* testy poskytly uspokojivé výsledky, ale *in-vivo* testy přinesly výsledky opačné.
- Velkou pozornost je třeba věnovat testování před tím, než budou potraviny uváděny na trh a označeny jako hypoalergenní.
- Potravinářský průmysl by měl pracovat na vývoji hypoalergenních potravin pomocí zde popsaných metod; nové produkty však budou vyžadovat důkladné studie používající zlatý standard DBPCFC, kožní test, test aktivace basofilů a testy založené na imunodetekčních metodách IgE a musí prokázat snížené nebo vymizelé alergické reakce.
- Je zde ještě jedna metoda, která nabízí skvělou příležitost k pěstování rostlin s omezeným obsahem alergenů a tou je genetická manipulace. Tato metoda by mohla vyvinout odlišné bílkoviny, ke kterým by se lidé stali citlivějšími až po dlouhodobé denní konzumaci.
- Proto by ale měly být současně hledány i další metody. Například takové, které nedopustí, aby byly lidé alergenní, kterým je tzv. imunologické okno věku u kojenců a batolat.

4. Výhled do budoucnosti

- Existují možnosti navrhnout hypoalergenní nebo nealergenní potraviny z alternativních složek. Dobrým příkladem je bezlepkový chléb.
- Značné množství vědeckých prací a ještě více patentových přihlášek existuje pro výroby bez lepku.
- Existuje několik desítek náhrad lepku, přičemž kukuřice je dobrým příkladem.
- Dalším směrem pro kontrolu alergie je zaměření se na pacienta. Nedávno byla aplikována metoda vakcinace profilin-alergických pacientů (Westritschnig a kol., 2007). Rekonstruovaná rekombinantní vakcína byla vyvinuta pro léčbu pomocí strategie opačného sestavování hypoalergenních fragmentů alergenu v jedné molekule. Tato strategie je obecně použitelná pro výrobu alergické vakcíny.
- Nedávno byla zveřejněna metoda tzv. imunologického okna ve věku kojence mezi 4 až 6 měsícem věku, která spočívá v nepřerušném kojení avšak kombinovaném s opatrným seznamováním s různými malými dávkami příkrmů, které obsahují dítěti dosud neznámé antigeny (viz <https://www.maminka.cz/clanek/imunologicke-okno-dulezite-obdobi-mezi-4-a-6-mesicem>).

- Další strategie, která se zaměřila na senzibilizované lidi využívá plátek ošetřených vysokým tlakem. Tyto plátky konzumovali tři pacienti, kteří měli silnou alergii na jablka po dobu několika týdnů. Následující imunoterapie prokázala, že byli hyposenzitivováni na jablka.

- Podobný princip byl využit k při přípravě hypoalergenních koláčů, které byly spotřebovány pacienty po dlouhou dobu. Překvapivě se více než polovina pacientů dobrala k orální toleranci a nakonec byli schopni jíst normální pšeničné produkty.

- Průlomovou metodu představil tým Lodinové–Žádníkové v roce 2004. Probiotický kmen *Escherichia coli* byl orálně podáván po narození s cílem kolonizace střev, změnu markerů alergie a ovlivnění klinického projevu alergií u vysoce rizikových kojenců alergických matek. Tato metoda nabízí šanci snížit uzavřený okruh přenosu alergií z rodičů na děti. Výrobek na trhu má název COLINFANT.

- Korelace mezi permeabilitou střev a potravinovými alergiemi je uvedena nedávno autory Perrier a Corthésy (2011). Můžeme spekulovat, že brzy kolonizovaná střeva, pravděpodobně trénovaná kmeny *E. coli* mohou přispět k regulačnímu účinku imunitního systému. Taková střeva by lépe zvládla příchozí proteinové antigeny bez urychlení střevní propustnosti rychlým přechodem zánětlivé reakce.
- Všechny tyto metody nabízejí šanci zastavit stále rostoucí počet alergií pacientů a stabilizují souběžné náklady na léčbu.

5. Diskuse

- Dotaz na aplikaci enzymů na rozklad pšeničných bílkovin.



Děkuji za pozornost

