

## Augalinių ekstraktų panaudojimas glitimo imunogeniškumui sumažinti

Vijolė Bradauskienė<sup>\*1,2</sup>, Giedrius Šilas<sup>1</sup>, Lina Vaičiulytė-Funk<sup>2</sup>, Edita Mažonienė<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Klaipėdos valstybinės kolegijos Maisto technologijų ir mitybos katedra,  
Bijūnų g. 10, Klaipėda. Tel. 8 655 38385*

<sup>2</sup>*Kauno technologijos universitetas, Maisto institutas  
Radvilėnų pl. 19, Kaunas*

<sup>3</sup>*Kauno technologijos universitetas, Polimerų chemijos ir technologijos katedra  
Radvilėnų pl. 19, Kaunas*

(Gauta 2020 m. sausio mėn.; atiduota spaudai 2020 m. balandžio mėn.; prieiga internete nuo 2020 m. gegužės 11 d.)

### Anotacija

Didėjanti beglitiminių duonos gaminių paklausa verčia ieškoti naujų gamybos būdų. Norint ją išspręsti, ieškoma naujų strategijų, kaip pašalinti kenksmingą glitimą iš kviečių, rugių bei miežių ir pagaminti subalansuotus produktus, turinčius geras juslines savybes. Šiame straipsnyje įvertintas tam tikrų augalų sulčių ir ekstraktų efektyvumas, naudojant jas kaip glitimo imunogeniškumo sumažinimo priemones. Tirtas glitimo kiekis kviečių sėlenose ir kviečių krakmole, prieš ir po fermentacijos su natūraliais augalų ekstraktais. Glitimo kiekis kviečių krakmole po fermentacijos su kivių, papajų ir ananasų sultimis gautas 15–18 mg/kg, po apdorojimo juodgrūdės ekstraktu – 28 mg/kg. Šios priemonės glitimo kiekį sėlenose sumažino iki 530–3500 mg/kg. Taigi augalų ekstraktai pašalina kviečių krakmolo imunogeniškumą ir sumažino imunoreaktyvių peptidų kiekį kviečių perdirbimo šalutinėse frakcijose, kuriose pradinis glitimo kiekis yra didesnis, tačiau nepasiekė saugios ribos, leistinos beglitiminių produktų gamyboje.

**Reikšminiai žodžiai:** celiakija, kviečiai, glitimas, imunogeniškumas, hidrolizė.

### Abstract

The increasing demand for gluten free bread makes it necessary to look for new ways of producing. To address this, new strategies are being sought to eliminate harmful gluten from wheat, rye and barley, and to produce balanced products with good organoleptic properties. This article evaluates the efficacy of certain plant juices and extracts as a measures of reducing the immunogenicity of gluten. The gluten content of wheat bran and wheat starch before and after treatment with natural plant enzymes was investigated. The gluten content established in wheat starch after fermentation with kiwi, papaya and pineapple juice was 15-18 mg/kg, after treatment with *Nigella sativa* extract - 28 mg/kg. These measures reduced the gluten content in bran to 530-3500 mg/kg. Thus, plant extracts eliminated the immunogenicity of wheat starch and reduced the amount of immunoreactive peptides in wheat processing byproducts with a higher initial gluten content but remaining above the safe limit allowed for production of gluten-free products.

**Key words:** Celiac, wheat, gluten, immunogenicity, hydrolysis

### Įvadas

Kviečiai – viena iš labiausiai paplitusių grūdinių kultūrų pasaulyje, kai kuriose šalyse iš jų gaunama iki pusės visos dienos energijos, tačiau didėjant kviečių suvartojimui, pasaulyje plinta su glitimo netoleravimu susiję susirgimai: alergija kviečiams ir celiakija (Navarro ir kt., 2017). Asmenims, sergantiems šiomis ligomis, paskiriama visą gyvenimą trunkanti dieta be glitimo, kuri populiarė ir tarp sveikų asmenų, kurie siekia bendros naudos sveikatai. Tyrimais įrodyta, kad beglitiminė mityba yra nesubalansuota, joje didesnę procentinę dalį sudaro kalorijos iš riebalų ir mažesnę – iš angliavandenių, kadangi nevartojamos grūdinės kultūros, dietoje nustatytas mažas ne krakmolo polisacharidų kiekis (Vici ir kt., 2016; Wild ir kt., 2010). Šie polisacharidai, kurių didžiausią dalį sudaro arabinoksilanai, yra svarbūs mažinant lėtinių ligų, tokių kaip širdies ir kraujagyslių ligų ir tam tikrų vėžio rūšių (Lovegrove ir kt., 2017) rizikos veiksnius, pagerina žarnyno mikrobiotos būklę (Makki ir kt., 2018; Mendis ir kt., 2016). Duonos gaminiai, pagaminti iš natūraliai glitimo neturinčių žaliavų: grikių, ryžių, kukurūzų, sorgo, burnočių miltų arba iš krakmolų ir hidrokoloidų, dažnai pasižymi prastesnėmis tekstūros ir juslinėmis savybėmis, palyginti su atitinkamais glitimo turinčiais produktais (Hager ir kt., 2012; Miranda ir kt., 2014; Naqash ir kt., 2017). Naudojant kepiniams be glitimo išvalytą kviečių krakmolą, gamyboje nenaudojami išoriniai

grūdo sluoksniai (sėlenos), nors šie turi didelį mitybos potencialą: juose yra daug mikroelementų, fitocheminių medžiagų, skaidulų ir pan. (Hemery ir kt., 2011), tačiau yra ir santykinai daug glitimo.

Didėjanti aukštos kokybės beglitiminių duonos gaminių paklausa verčia ieškoti naujų beglitiminės duonos gamybos būdų. Norint ją išspręsti, ieškoma naujų strategijų, kaip pašalinti kenksmingą glitimą iš kviečių, rugių ir miežių ir pagaminti subalansuotus produktus, turinčius geras juslines savybes. Dieta turi būti ne tik be glitimo, bet ir sveika, kad būtų išvengta maistinių medžiagų, vitaminų ir mineralinių medžiagų trūkumo ar pertekliaus. Dėl šios priežasties labai svarbu ištirti kviečių imunogeniškumo pašalinimo ar sumažinimo priemones.

Glitimas turi didelį kiekį amino rūgščių glutamino ir prolino, todėl jis yra labai atsparus žmogaus virškinimo trakto fermentams (pepsinui, chimotripsinui, tripsinui). Dėl šios priežasties baltymų fragmentai (peptidai), kurių ilgis yra devynios ar daugiau aminorūgščių, lieka nesuskaidyti. Jie prasiskverbia per plonosios žarnos gleivinę ir kartu su audinių transglutaminazės receptoriais ir HLA-DQ2 ir HLA-DQ8 antigenais inicijuoja jungiamojo audinio, esančio po epiteliumi (*Lamina Propria*) antigeninių ląstelių imuninį atsaką (Cinova ir kt., 2007; Arentz–Hansen ir kt., 2002). Jei glitimas suskaidomas taip, kad susidaro peptidai iš mažiau nei devynių aminorūgščių liekanų, jie nesijungia prie receptorių ir imuninis atsakas nevyksta. Todėl bet kuris fermentas, galintis suskaidyti glitimą į tokius mažus peptidus, teoriškai yra tinkamas glitimui pašalinti iš grūdinių kultūrų (Gallagher E., 2009). Tam gali būti naudojami įvairūs fermentai: endogeniniai grūdų fermentai, bakteriniai, mikroskopinių grybų, augalinės ir gyvūninės kilmės. Vieni iš jų hidrolizuoja glitimą, kiti blokuoja toksinių baltymų fragmentų poveikį.

Augalų fermentai jau daug metų naudojami kai kurių maisto produktų: sirupų, alkoholinių gėrimų, pieno produktų, kepinų ir kt. gamyboje (Meshram ir kt., 2019). Ankstesni tyrimai (Sun ir kt., 2016) parodė, kad augalai turi didelį neišnaudotą potencialą kaip augalinės kilmės proteazių gamybos žaliava. Proteazių daugiausia randama vaisiuose, tokiuose kaip papajos, ananasai, figos ir kiviai. Be to, aukštas proteazių aktyvumas aptiktas brokoliuose, imbieruose, poruose ir raudonuosiuose pipiruose. Papaino fermentinė hidrolizė buvo naudota hidrolizatams gaminti iš kviečių glitimo ir nustatyta, kad po apdoravimo papainu baltymų molekulinė masė buvo mažesnė (Wang ir kt., 2007). Bromelinas buvo naudojamas kviečių miltų alergiskumui sumažinti (Watanabe ir kt., 2000). Tyrimai *in vitro* su žaliųjų kivių vaisių aktinidinu, kuris yra žinomiausias kivių fermentas (Larocca ir kt., 2010; Kaur ir kt., 2010), įvairius maisto baltymus, taip pat ir grūdų glitimą inkubuojant su kivių ekstraktu arba be jo ir imituojant žmogaus virškinimo traktą, parodė, kad kivių ekstraktas turėjo įtakos glitimo virškinimui. Aktinidinas pagerino glitimo suviršinimą ir atliekant bandymus su žiurkėmis (Rutherford ir kt., 2011). Li ir kt. (2016) įrodė proteolitinį papaino poveikį, o Taga ir kt. (2017) nustatė, kad imbiero proteazės gali efektyviai hidrolizuoti glitimą. Ypač stiprus glitimo detoksikacijos pajėgumas nustatytas *Nepenthes pitcher*, egzotiško mėsingo augalo syvuose, kurie turi virškinimo fermentų, taip pat proteazės nepentesino (Ravee ir kt., 2018; Schröder ir kt., 2016).

Glitimą skaidančių peptidazių gali turėti ir augalų sėklos. Bell ir kt. (2014) tyrimo duomenys parodė, kad *Nigella sativa* (dar žinomos kaip juodgrūdės sėklos arba juodieji kmynai) taip pat turi proteazių, kurios gali būti naudojamos maisto pramonėje (Osman ir kt., 2010). Panaudoti kmynai (*Cuminum cyminum L.*), jų tirpalai ar karšto vandens ekstraktai pasižymi aktyvia proteazių veikla ir vaidina svarbų vaidmenį virškinimo fermentų aktyvumo didinimo procese (Milan ir kt., 2008). Tyrimo rezultatai parodė, kad kumynų peptidai gali padidinti baltymų virškinamumą iki 400 %. Kumyno sėklų ekstraktas padidino pepsino proteolitinį aktyvumą (Siow ir kt., 2016), tačiau eksperimentai su glitimu nebuvo atlikti.

Taigi yra nemažai tyrimų, kurie parodo, kad augaliniai fermentai turi stiprų proteolitinį poveikį, tačiau nėra ištirta, ar jie gali visiškai suskaidyti glitimą kviečių perdirbimo produktuose (krakmole ir sėlenose) iki saugios ribos, tai leistų juos panaudoti beglitiminės visavertės duonos gamybai.

**Tyrimo tikslas** – ištirti augalų sulčių ir ekstraktų efektyvumą naudojant juos kaip glitimo imunogeniškumo pašalinimo ar sumažinimo priemones.

### Tyrimo metodika

Tyrimai buvo atlikti Klaipėdos valstybinės kolegijos Mikrobiologijos ir chemijos laboratorijose. Kviečių šalutinių frakcijų mėginiai, gauti po sauso ir šlapio frakcionavimo: sėlenos ir krakmolos, buvo gauti iš AB „Roquette Amilina“.

#### Kviečių šalutinių produktų sudėties fizikinė ir cheminė analizė

drėgmės kiekis nustatytas drėgmės matavimo prietaisu Kern MLS 50-3HA 160N;

pH buvo matuojamas pH matuokliu ORION 3STAR;

baltymų kiekis nustatytas Kjeldalio metodu (LST EN ISO 20483).

#### Mėginių paruošimas

Tyrimui naudotos kivių vaisių, ananasų ir papajų sultys bei juodgrūdės ekstraktas. Švieži vaisiai sutrinti strypiniu maišytuvu, išspausintos sultys. Juodgrūdės ekstraktui paruošti juodgrūdės sėklos sumaltos buitiniu kavos malūnėliu, užpiltos 40 °C temperatūros distiliuotu vandeniu (imant 5 g juodgrūdės ir 45 g distiliuoto vandens), palaikius 0,5 val. masė papildomai homogenizuota ir išfiltruota.

Tyrimui atlikti po 1 g tiriamos medžiagos (krakmolo arba sėlenų) perkelta į 15 ml mėgintuvėlius, įpilta po 5 ml augalinių ekstraktų ir 5 ml distiliuoto vandens. Mėgintuvėlių turinys gerai išmaišytas naudojant purtyklę (30 min.) ir stovas su mėgintuvėliais patalpintas į inkubatorių.

Mėginiai buvo inkubuoti 37 °C temperatūroje. Po 12 ir 24 valandų buvo išmatuotas pH ir glitimo imunoreaktyvių likučių kiekis substratuose.

#### Glitimo kiekio nustatymas ELISA G12 metodu

Glitimo likučiai kviečių produktuose nustatyti ELISA metodu (AACCI metodas 38-52.01), naudojant AgraQuant® Gluten G12 imunosorbentų plokšteles (prekės ženklas: RomerLabs) pagal gamintojo instrukcijas. Glitimo koncentracijos buvo nustatytos remiantis kalibravimo kreive, pateikta „Romer Labs“ ir patikslinta pagal standartinių tirpalų optinius tankius. Mikroplokštelių optiniams tankiams nuskaityti naudotas Multiscan EX mikroplokštelių skaitytuvas su 450 nm absorbcijos filtru.

### Tyrimo rezultatai ir jų aptarimas

Kviečių krakmolo ir sėlenų frakcijos turėjo skirtingą drėgmės kiekį ir skirtingą bendrą baltymų kiekį bei pradinę glitimo koncentraciją (žr. 1 lentelę).

**1 lentelė.** Kviečių perdirbimo šalutinių produktų charakteristikos  
*Table 1. Characteristics of samples of wheat processing by-products*

Kviečių produktai	Drėgmės kiekis, %	Bendras baltymų kiekis, %	Glitimo kiekis, mg/kg
Sėlenos	13,43±0,20	16,90±0,02	33750,00±945,00*
Krakmolos	10,78±0,20	0,32±0,02	85,00±2,00

\* Glitimo kiekis Elisa G12 metodu nustatytas tik atlikus keturis 1:10 skiedimus.

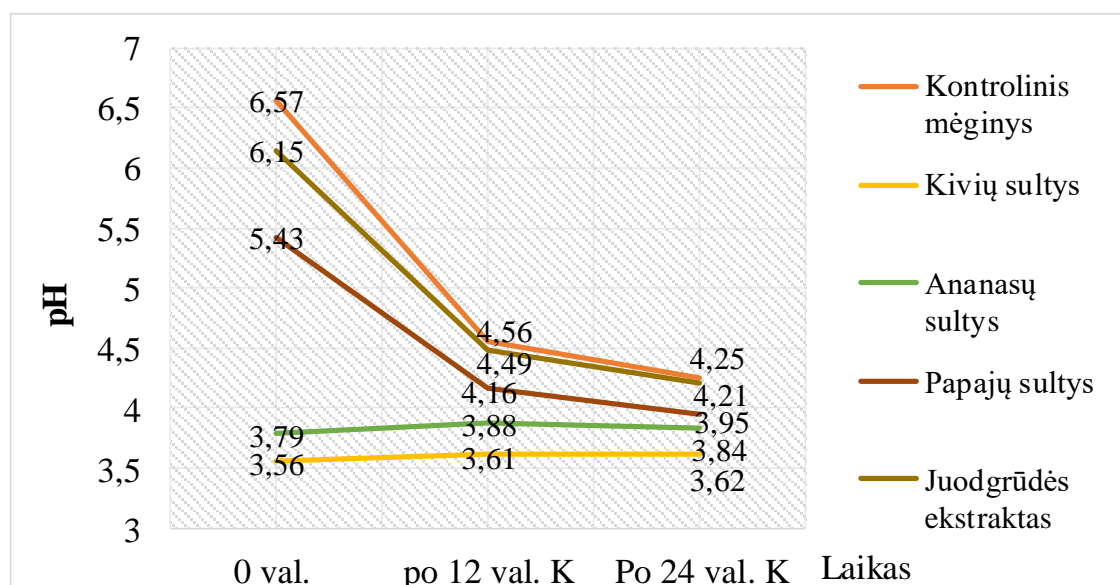
Drėgmės kiekis tiek sėlenose, tiek krakmole nustatytas nedidelis. Po glitimo atskyrimo kviečių krakmolo frakcijoje lieka labai nedaug baltymų, taip pat ir glitimo, o kviečių sėlenose baltymai sudaro net 16,9 procento. Didžiausia dalis iš jų tenka albuminams ir globulinams, tačiau kaip parodė Elisa antikūnių tyrimai, jose yra ir santykinai didelis glitimo kiekis – net 33750,00 mg/kg, kai beglitiminiuose produktuose jo gali būti tik iki 20 mg/kg (Standartas Nr. 118–1979). Todėl gaminant produktus, skirtus dietai be glitimo, būtina imtis priemonių, kurios suardytų likutinius glitimo peptidus ir pašalintų glitimo imunoreaktyvumą.

Augaliniai ekstraktai (žr. 1 pav.) buvo paruošti pagal anksčiau pateiktą metodiką. Fermentavimui pasirinkta 37 °C temperatūra, kadangi ši temperatūra yra optimali daugumos fermentų aktyvumui (Li ir kt., 2016; Kaur ir kt., 2010).



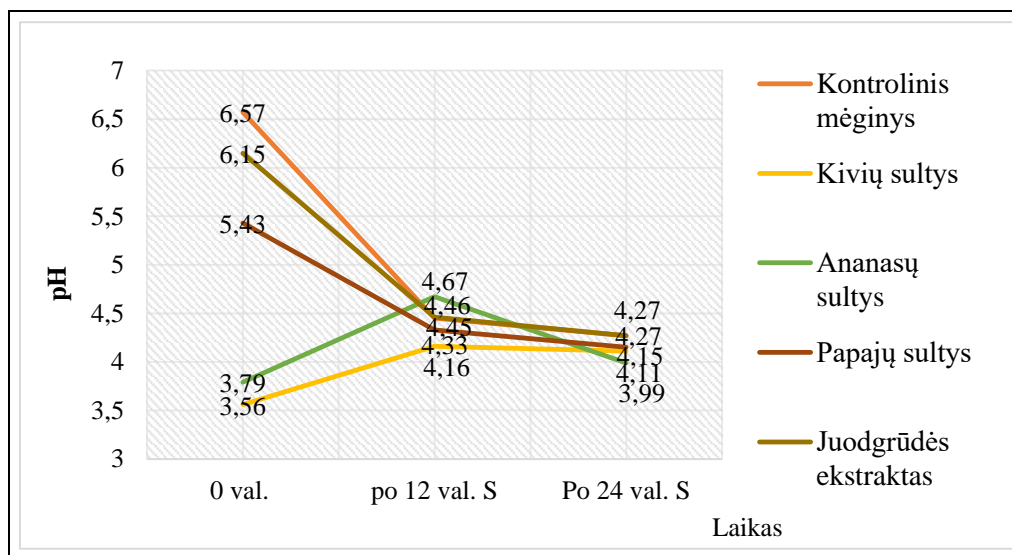
**1 pav.** Augalinių ekstraktų paruošimas  
*Fig. 1. Preparation of plant extracts*

Pamatavus pH ekstraktuose prieš fermentaciją mažiausiai rūgštinis pH ( $6,15 \pm 0,02$ ) nustatytas juodgrūdės ekstrakte, labiausiai rūgštinė aplinka – kivių sultyse ( $3,56 \pm 0,02$ ) ir ananasų sultyse ( $3,79 \pm 0,02$ ) (žr. 2 pav.). Fermentuojant kviečių krakmolą įvairiuose mėginiuose pH kito skirtingai. Tų mėginių, kur pradinis pH buvo arti neutralaus (kontroliniame mėginyje su distiliuotu vandeniu, su juodgrūdės ekstraktu ir papajų sultimis) po 24 val. fermentacijos krakmolo mėginių terpė parūgštėjo iki pH  $4,16$ – $4,45 \pm 0,02$ , po 48 val. iki  $3,95$ – $4,25 \pm 0,02$ , o bandiniuose su kivių ir ananasų sultimis pH beveik nepasikeitė.



**2 pav.** Terpės pH kviečių krakmolo substratuose po 12 ir 24 val. fermentacijos  
*Fig. 2. pH in samples of wheat starch after fermentation of 12 and 24 h*

Šiek tiek kitaip kito kviečių sėlenų mėginių su augaliniais ekstraktais pH fermentacijos metu (žr. 3 pav.). Mėginiuose su pradiniu pH, artimu neutraliam (kontroliniame mėginyje, mėginiuose su juodgrūdės ekstraktu ir papajų sultimis), po 12 val. fermentacijos krakmolo mėginių terpė parūgštėjo iki pH  $4,33$ – $4,46 \pm 0,02$ , po 24 val. iki  $4,15$ – $4,27 \pm 0,02$ , o bandiniuose su kivių ir ananasų sultimis pH po 12 val. padidėjo, po 24 val. sumažėjo, tačiau liko aukštesni nei pradiniai mėginių pH. Tai galima paaiškinti tuo, kad fermentacijos metu išsilaisvina metalų jonai, turintys teigiamą krūvį (Hemdane ir kt., 2016, ) bei susidaro azoto turintys baltymų skilimo produktai, kas nulemia terpės pasikeitimą į šarminę pusę.



3 pav. Terpės pH kviečių sėlenų substratuose po 12 ir 24 val. fermentacijos

Fig. 3. pH in samples of wheat bran after fermentation of 12 and 24 h

Glitimo kiekis kviečių šalutinių produktų mėginiuose po fermentacijos su augaliniais ekstraktais nustatytas labai skirtingas. Po 12 val. fermentacijos kviečių krakmole mažiausias imunoreaktyvių glitimo peptidų kiekis nustatytas substratuose su ananasų sultimis ( $20,00 \pm 0,56$  mg/kg) (žr. 2 lentelę), šiek tiek didesnis – substrate su kivių sultimis ( $22,00 \pm 0,62$  mg/kg) bei papajų sultimis. Po 24 val. fermentacijos glitimo kiekis šiuose mėginiuose dar sumažėjo ir pasiekė ribą, kuri saugi beglitiminiams gaminiams, tik substrate su juodgrūdės ekstraktu jis išliko toks pat ( $28,00 \pm 0,78$  mg/kg). Nustatytas panašus poveikis kaip ir ankstesniuose tyrimuose su kviečių miltais (Watanabe ir kt., 2000) arba išgrynintu glitimu (Wang ir kt., 2007). Nustatyta tiesioginė priklausomybė tarp terpės pH reikšmės pažemėjimo ir ekstraktų proteolitinio aktyvumo. Ši tendencija buvo pastebėta ir ankstesniuose moksliniuose tyrimuose, kai glitimo hidrolizei buvo naudojama fermentacija atrinktomis pieno rūgšties bakterijomis (Bradauskienė ir kt., 2019), nes dauguma cisteino proteazių yra aktyvesnės rūgštesnėje terpėje (Rollan ir kt., 2016).

2 lentelė. Glitimo kiekis kviečių šalutiniuose produktuose po fermentacijos

Table 2. Gluten content in wheat by-products after fermentation

Bandiniai	Po 12 val.		Po 24 val.	
	Kviečių krakmolas	Kviečių sėlenos	Kviečių krakmolas	Kviečių sėlenos
Kontrolinis mėginys	$89,00 \pm 2,50$	$33700,00 \pm 944,00$	$82,00 \pm 2,30$	$30860,00 \pm 864,08$
Kivių sultys	$22,00 \pm 0,62$	$1750,00 \pm 49,00$	$16,00 \pm 0,45$	$690,00 \pm 19,32$
Ananasų sultys	$20,00 \pm 0,56$	$980,00 \pm 27,44$	$15,00 \pm 0,42$	$530,00 \pm 14,84$
Papajų sultys	$25,00 \pm 0,70$	$1100,00 \pm 30,80$	$18,00 \pm 0,50$	$530,00 \pm 14,84$
Juodgrūdės ekstraktas	$28,00 \pm 0,78$	$3500,00 \pm 98,00$	$28,00 \pm 0,78$	$780,00 \pm 21,84$

Kadangi kviečių sėlenose pradinis glitimo kiekis gana didelis, po fermentacijos jis reikšmingai sumažėjo visuose mėginiuose, mažiausi kiekiai nustatyti po poveikio ananasų ir kivių sultimis, bet glitimo kiekis sėlenose nebuvo sumažintas iki ribos, kuri saugi beglitiminiams gaminiams, t. y. tokia sėlenų frakcija tiesiogiai negali būti naudojama duonos ar kitų gaminių, skirtų dietai be glitimo, gamybai. Apibendrinant, galima teigti, kad augaliniai ekstraktai gali pašalinti tik mažus glitimo kiekius arba gali sumažinti alergiskumą kviečių šalutinių produktų, kuriuose pradinis glitimo kiekis didesnis.

### Apibendrinimas

Augalinės kilmės fermentai pasižymi ryškiu proteolitinu poveikiu, kuris gali sumažinti glitimo kiekį šalutiniuose kviečių perdirbimo produktuose. Kviečių šalutinių produktų fermentacijai buvo naudota kivių vaisių, ananasų ir papajų sultys bei juodgrūdės ekstraktas. Po fermentacijos

glitimo kiekis kviečių krakmole sumažėjo nuo 85 mg/kg iki 15–28 mg/kg, o sėlenose – nuo 30860 iki 530–3500 mg/kg. Naudojant kivių, papajų ir ananasų sultis pavyko pašalinti glitimo likučius iš kviečių krakmolo, tačiau tose kviečių perdirbimo šalutinėse frakcijose, kuriose pradinis glitimo kiekis yra didesnis, apdorojant augaliniiais ekstraktais, jį pavyko sumažinti, tačiau nebuvo pasiekta saugi riba, leidžiama beglitiminiams produktams. Tikslinga tęsti eksperimentus derinant augalinių ekstraktų poveikį su kitomis biotechnologinėmis priemonėmis bei naudojant išgrynintus augalinius fermentus – bromelainą ir papainą, bakterinės ir grybinės kilmės fermentus.

### Literatūra

1. Arentz–Hansen, H., Mcadam, S. N., Molberg, Ø., Fleckenstein, B., Lundin, K. E., Jørgensen, T. J., ... & Sollid, L. M. (2002). Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*, 123(3), 803–809.
2. Bradauskienė, V., Vaičiulytė-Funk, L., Mazonienė, E., & Cernauskas, D. (2019). Fermentation with *Lactobacillus* strains for elimination of gluten in wheat (*Triticum aestivum*) by-products. In Baltic Conference on Food Science and Technology: conference proceedings. LLU.
3. Bellir, N., Bellir, M. N., Rouabah, L. (2014). Enzymatic Degradation of Gliadin by *Nigella sativa* Seeds Protease: Implications for New Treatment of Celiac Disease. *World Journal of Pharmacy Sciences*, 3(12), 1555–1571.
4. Cinova, J., Palova-Jelinkova, L., Smythies, L. E., Cerna, M., Pecharova B., Dvorak M., Fruhauf P., Tlaskalova-Hogenova H., Smith P. D., Tuckova L. (2007). Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *Journal of clinical immunology*, 27, 201–209.
5. Gallagher, E. (2009). Improving gluten-free bread quality through the application of enzymes. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 20(1), 34–37.
6. Hager, A. S., Wolter, A., Czerny, M., Bez, J., Zannini, E., Arendt E. K., Czerny M. (2012). Investigation of product quality, sensory profile and ultrastructure of breads made from a range of commercial gluten-free flours compared to their wheat counterparts. *European Food Research and Technology*, 235(2), 333–344.
7. Hemdane, S., Jacobs, P. J., Dornez, E., Verspreet, J., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2016). Wheat (*Triticum aestivum* L.) bran in bread making: A critical review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15(1), 28-42.
8. Hemery, Y., Holopainen, U., Lampi, A. M., Lehtinen, P., Nurmi, T., Piironen, V., ... & Rouau, X. (2011). Potential of dry fractionation of wheat bran for the development of food ingredients, part II: Electrostatic separation of particles. *Journal of Cereal Science*, 53(1), 9-18
9. Kaur, L., Rutherford, S. M., Moughan, P. J., Drummond, L., Boland, M. J. (2010). Actinidin enhances protein digestion in the small intestine as assessed using an in vitro digestion model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(8), 5074–5080.
10. Larocca, M., Rossano, R., Riccio P. (2010). Analysis of green kiwi fruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) proteinases by two-dimensional zymography and direct identification of zymographic spots by mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(14), 2411–2418.
11. Li, Y., Yu, J., Goktepe, I., Ahmedna, M. (2016). The potential of papain and alcalase enzymes and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour. *Food Chem*, 196, 1338–45.
12. Lovegrove, A., Edwards, C. H., De Noni, I., Patel, H., El, S. N., Grassby, T., ... Ellis, P. R. (2017). Role of polysaccharides in food, digestion, and health. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(2), 237–253.
13. Makki, K., Deehan, E. C., Walter, J., & Bäckhed, F. (2018). The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell host & microbe*, 23(6), 705-715.
14. Mendis, M., Leclerc, E., & Simsek, S. (2016). Arabinoxylans, gut microbiota and immunity. *Carbohydrate polymers*, 139, 159-166.
15. Meshram, A., Singhal, G., Bhagyawant, S. S., Srivastava, N. (2019). Plant-Derived Enzymes: A Treasure for Food Biotechnology. *Enzymes in Food Biotechnology*, Academic Press, 483–502.
16. Milan, K. M., Dholakia, H., Tikku, P. K., Vishveshwaraiah, P. (2008). Enhancement of digestive enzymatic activity by cumin (*Cuminum cyminum* L.) and role of spent cumin as a bionutrient. *Food Chemistry*, 110(3), 678–683.
17. Miranda, J., Lasa, A., Bustamante, M. A., Churruga, I., Simon, E. (2014). Nutritional differences between a gluten-free diet and a diet containing equivalent products with gluten. *Plant foods for human nutrition*, 69(2), 182–187.

18. Naqash, F., Gani, A., Gani, A., Masoodi, F. A. (2017). Gluten-free baking: Combating the challenges-A review. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 98–107.
19. Navarro, V., Del Pilar Fernández-Gil, M., Simón, E., Bustamante, M.Á. (2017). Gluten: General Aspects and International Regulations for Products for Celiac People. *Nutritional and Analytical Approaches of Gluten-Free Diet in Celiac Disease*, Springer, Cham, 15–27.
20. Osman, M. T., Al-Duboni, G., Taha, B. I., Muhamed, L. A. (2012). Refractory Coeliac Disease; Role of *Nigella sativa* as Immunomodulator. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 2(4), 527–535.
21. Ravee, R., Salleh, F. I. M., Goh, H. H. (2018). Discovery of digestive enzymes in carnivorous plants with focus on proteases. *PeerJ*, 6, e4914.
22. Rollan, G., De Angelis, M., Gobetti, M., De Valdez, G. F. (2005) Proteolytic activity and reduction of gliadin-like fractions by sourdough lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 99(6), 1495–1502.
23. Rutherford, S. M., Montoya, C. A., Zou, M. L., Moughan, P. J., Drummond, L. N., Boland, M. J. (2011). Effect of actinidin from kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) on the digestion of food proteins determined in the growing rat. *Food Chemistry*, 129(4), 1681–1689.
24. Schröder, C. U., Lee, L., Rey, M., Sarpe, V., Man, P., Sharma, S., ... Schriemer, D. C. (2017). Neprosin, a selective prolyl endoprotease for bottom-up proteomics and histone mapping. *Molecular & Cellular Proteomics*, 16(6), 1162–1171.
25. Siow, H. L., Choi, S. B., Gan, C. Y. (2016). Structure–activity studies of protease activating, lipase inhibiting, bile acid binding and cholesterol-lowering effects of pre-screened cumin seed bioactive peptides, *Journal of Functional Foods*, 27, 600–611.
26. Standard 118–1979. Codex Standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. Codex Alimentarius Commission. Revision; 2015,1. Available at: [http://www.codexalimentarius.net/download/standards/291/cxs\\_118e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/291/cxs_118e.pdf) (accessed Sep 18, 2019).
27. Sun, Q., Zhang, B., Yan, Q. J., Jiang, Z. Q. (2016). Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources. *Food chemistry*, 213, 708–713.
28. Taga, Y., Hayashida, O., Kusubata, M., Ogawa-Goto, K., Hattori, S. (2017). Production of a novel wheat gluten hydrolysate containing dipeptidyl peptidase-IV inhibitory tripeptides using ginger protease, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 81(9), 1823–1828.
29. Vici, G., Belli, L., Biondi, M., Polzonetti, V. (2016). Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clinical Nutrition*, 35(6), 1236–1241.
30. Wang, J. S., Zhao, M. M., Zhao, Q. Z., Jiang, Y. M. (2007). Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food chemistry*, 101(4), 1658–1663.
31. Watanabe, M., Watanabe, J., Sonoyama, K., Tanabe, S. (2000). Novel method for producing hypoallergenic wheat flour by enzymatic fragmentation of the constituent allergens and its application to food processing. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(12), 2663–2667.
32. Wild, D., Robins, G. G., Burley, V. J., Howdle, P. D. (2010). Evidence of high sugar intake, and low fibre and mineral intake, in the gluten-free diet. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 32(4), 573–581.

## Use of Plant Extracts for the Reduction of Gluten Immunogenicity

(Received in January, 2020; Accepted in April, 2020; Available Online from 11<sup>th</sup> of May, 2020)

### Summary

After removing gluten residues from wheat processing by-products – starch and bran, they could be used for production of gluten-free products. Various plants and their extracts contain gluten decomposing proteases. For gluten hydrolysis, based on the previous research data, it was determined to use pineapple, kiwi, papaya juices and *Nigella sativa* seeds extract. Wheat starch and brans samples were mixed with these plants based remedies and were fermented for 24 hours at 37°C temperature. pH in samples and gluten residual derivatives have been measured after 12 and 24 hours. It was determined that these extracts have strong proteolytic effect. After fermentation gluten amount in wheat starch was reduced to 15-28 mg/kg, while in brans - to 530-3500 mg/kg. The largest proteolytic effect was registered in pineapple, kiwi and papaya substrates. With these substrates it was able to remove gluten residues from wheat starch, however in the brans it wasn't able to achieve safe limit which is allowed for gluten-free products. For this reason the experiments will be continued by using enzymes of bacterial and fungal origin and pure plants enzymes – bromelin and papain.