

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Porównanie dwóch formatów metody ELISA z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych przeciwciał do oznaczania prolamin w piwie

PAULINA GÓRECKA, DOROTA PIASECKA-KWIATKOWSKA,
MAGDALENA ZIELIŃSKA-DAWIDZIAK, MAŁGORZATA BARANIAK

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU, WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOSCI I ŻYWIENIU,
KATEDRA BIOCHEMII I ANALIZY ŻYWNOSCI

Słowa kluczowe: piwo, alergia, prolaminy, ELISA

STRESZCZENIE

Tradycyjne piwo produkowane jest najczęściej ze słodu jęczmiennego. Ok. 75% białek jęczmienia stanowią polipeptydy tworzące gluten, z czego 50% to prolaminy, a 25% gluteniny. Ze względu na skład surowcowy spożywanie piwa przez osoby z nadwrażliwością na gluten może wywołać niepożądane reakcje organizmu. Celem pracy było oznaczenie prolamin w dostępnych na rynku piwach za pomocą bezpośredniej i pośredniej metody ELISA oraz porównanie możliwości detekcyjnych stosowanych komercyjnie dostępnych przeciwciał. Stwierdzono, że większymi możliwościami detekcyjnymi hordein w piwie charakteryzowały się antygliadynowe przeciwciała znakowane enzymatycznie stosowane w metodzie ELISA bezpośrednia.

Comparison of two ELISA methods with commercially available antibodies for prolamin detection in beer

Keywords: beer, allergy, prolamins, ELISA

ABSTRACT

Traditional beer is made by barley malt. Approx. 75% of the barley proteins are polypeptides forming gluten, of which 50% is prolamines and 25% glutenins. Due to composition of beer consumption by persons with hyperintensity to gluten can cause adverse reactions of the body. The aim of this study was to determine the prolamins in beers available in the market with use of direct and indirect ELISA methods and compare detection possibilities of commercially available antibodies. It was found that enzymatically labeled antigliadin antibodies was characterized much more detection possibilities of hordeins in beer.

1. WSTĘP

Proces odżywiania stanowi niezbędny warunek utrzymania życia, dodatkowo dla ludzi jest również źródłem przyjemności i dobrego samopoczucia. Dla funkcjonowania całego organizmu na poziomie fizjologicznym, jak i psychicznym, kluczowe znaczenie ma jakość tego, co spożywamy. Człowiek przez cały okres swojego życia spożywa ok. 100 ton pokarmów różnego rodzaju, z czego większość stanowią produkty zawierające białko pochodzenia roślinnego i zwierzęcego. U niektórych osób po spożyciu określonych pokarmów pojawiają się niepożądane reakcje, od wysypki skórnej, aż do wystąpienia ciężkich objawów chorobowych [1]. Do takich reakcji zalicza się alergię i nietolerancję pokarmową. W ciągu ostatnich lat zaobserwowano wzrost liczby osób ze zdiagnozowanymi chorobami alergicznymi i nietolerancjami pokarmowymi. Szacuje się, że alergię pokarmową dotyczą 2% osób dorosłych oraz ok. 4-8% dzieci [2, 3].

Alergia pokarmowa to nieprawidłowa immunologiczna odpowiedź organizmu na pokarm lub składnik pokarmowy spożywany zwyczajowo, na ogół nieszkodliwy dla populacji. Reakcja organizmu na spożyty alergen następuje niemal natychmiast po jego spożyciu [4]. Do objawów alergii pokarmowej zalicza się przede wszystkim bóle brzucha, reakcje skórne, wymioty, zaburzenia snu, katar, rozdrażnienie, a wstrząs anafilaktyczny może stanowić zagrożenie życia [5].

Nietolerancja pokarmowa jest natomiast niewłaściwą odpowiedzią organizmu na spożywany pokarm, u której podłoża leżą nieimmunologiczne reakcje takie jak reakcje farmakologiczne, toksyczne, metaboliczno-biochemiczne. W przeciwieństwie do alergii, objawy nietolerancji pokarmowej występują od pół godziny do kilku dni po spożyciu pokarmu. Poza opóźnioną reakcją, nietolerancji pokarmowej towarzyszy również wiele schorzeń i objawów, które niekojarzone z dietą utrzymują się przez miesiące, a nawet lata. Jedną z najczęściej występujących nietolerancji pokarmowych jest celiakia [4-6].

Celiakia, inaczej nazywana enteropatią glutenową lub glutenozależną chorobą trzewną, jest chorobą, polegającą na zaburzeniach funkcji trawienia i wchłaniania przez jelita, którą wywołuje spożycie glutenu. Szacuje się, że choroba ta dotyczy jedną na 300 osób w Europie, a w Polsce z jej powodu cierpi około 30 tysięcy osób. Gluten tworzy się z mieszaniny białek obecnych w ziarnach

takich zbóż, jak pszenica, jęczmień, żyto i owies [7, 8]. Spożycie produktów zawierających gluten przez osoby chore na celiakię powoduje uszkodzenie błony jelita cienkiego, co z kolei doprowadza do obniżenia zdolności wchłaniania, a w konsekwencji do niedożywienia organizmu i innych komplikacji [9, 10]. Osoby dotknięte celiakią często muszą utrzymywać ścisłą dietę bezglutenową przez całe życie, co oznacza dla nich wykluczenie pokarmów zawierających w swym składzie pszenicę, żyto, jęczmień i owies, chociaż zdania co do toksyczności owsa są w środowisku naukowców podzielone [11].

Ze względu na wzrost występowania alergii pokarmowych oraz konieczność uwzględnienia ewentualnego zagrożenia dla zdrowia i życia przez nieświadome spożycie produktów zawierających alergeny, Unia Europejska w 2003 roku wprowadziła przepisy, które nakazują znakowanie żywności w taki sposób, aby ułatwić alergikom świadomy wybór bezpiecznych dla nich produktów spożywczych [12]. Obecnie obowiązującym aktem prawnym dotyczącym znakowania produktów spożywczych jest Dyrektywa UE 2007/68/EC, która mówi, że wszystkie surowce i produkty zawierające alergenne składniki muszą być w odpowiedni sposób oznakowane bez względu na ilość występujących w nich alergenów. W odniesieniu do żywności specjalnego przeznaczenia, jaką jest żywność bezglutenowa, stosuje się różne zapisy. „Produkt o bardzo niskiej zawartości glutenu” oznacza, że maksymalna zawartość glutenu w tym produkcie nie może przekraczać 100 mg/kg produktu. Natomiast żywność oznaczona nazwą „produkt bezglutenowy” oznacza, że maksymalna zawartość glutenu nie przekracza 20 mg/kg produktu [13, 14].

Problem obecności glutenu w produktach spożywczych dotyczy także napojów, m.in. piwa. Tradycyjne piwo wytwarzane jest z jęczmienia, ale może być również warzone z innych zbóż, m.in. pszenicy, żyta, kukurydzy czy sorgo. Na aromat i jakość gotowego piwa szczególny wpływ ma skład surowcowy, a także rodzaj i sposób warzenia. Ze względu na łatwość poddawania technologicznym modyfikacjom, najczęściej wykorzystywanym surowcem do produkcji piwa jest jęczmień [15]. W piwie znajdują się przechodzące ze słodu frakcje prolaminowe białek nazywane w jęczmieniu hordeinami. To one są odpowiedzialne za wywoływanie niepożądanych reakcji pokarmowych u osób chorych na celiakię [16, 17].

Na podstawie badań przeprowadzonych w 2010 roku przez Dostálek i wsp. stwierdzono, że w procesie warzenia piwa prawie wszystkie prolaminy z jęczmienia zostają wyeliminowane, a białka podczas słodowania rozkładane są do polipeptydów i peptydów. Dodatkowe usunięcie prolamin następuje również w procesie fermentacji ze względu na ich adsorpcję na powierzchni drożdży i niskie pH [18]. Wcześniejsze badania wykonane przez Perrocheau i wsp. w 2006 roku wykazały jednak, że piwo nadal może stanowić zagrożenie dla osób z alergią i nadwrażliwością na białka glutenowe [19]. Ponieważ w procesie produkcji piwa białka alergenne ulegają różnym przemianom, mogą wchodzić w interakcje z innymi składnikami tworząc nowe produkty potencjalnie alergenne.

Jedną z metod rekomendowanych w UE do detekcji alergenów w żywności jest metoda ELISA, wykorzystująca specyficzne narzędzia analityczne, jakimi są przeciwciała. Jednak w przypadku hordein brak jest komercyjnie dostępnych odpowiednich przeciwciał dedykowanych do swoistych sekwencji aminokwasowych tych białek, czyli ich epitopów. W ramach prezentowanych badań podjęto próbę wykorzystania komercyjnych antygliadynowych przeciwciał do oznaczania hordein w piwie. Przeciwciała te wykorzystano ze względu na znaczną homologię sekwencji aminokwasów pomiędzy prolaminami pochodzącymi z różnych gatunków zbóż, w tym gliadyn z pszenicy, hordein z jęczmienia i sekaliny z żyta. Jednocześnie producent zastosowanych przeciwciał deklaruje występowanie reakcji krzyżowych pomiędzy prolaminami tych zbóż i oferowanymi przeciwciałami.

2. MATERIAŁY I METODY

Materiał badany stanowiły dostępne na rynku piwa o odmiennych składach, w głównej mierze różniące się od siebie gatunkiem zboża wykorzystanym do produkcji słodu lub zastosowanym jako niesłodowany surowiec. Badania przeprowadzono na 6 zakupionych w pobliskim sklepie piwach: „Karmi” zawierające sód jęczmienny; „Książęce” – słody jęczmienny i pszeniczny; „Żywiec” – sód jęczmienny; „Corona Extra” – sód jęczmienny, kukurydzą/ryż; „Żytnie” – sód żytni, pilzneński, monachijski, słody karmelowe i barwiące oraz deklarowane jako bezglutenowe piwo „Estrella” wyprodukowane na bazie słodu jęczmiennego i ryżu.

Ze względu na małe stężenie białka w badanych piwach, po odgazowaniu zagęszczono je metodą ultrafiltracji (Millipore Ultracone) w punkcie odcięcia 3000 Da.

Oznaczenie zawartości białek hordeinowych w materiale badanym przeprowadzono za pomocą dwóch formatów testu immunoenzymatycznego fazy stałej ELISA: ELISA bezpośrednia z wykorzystaniem przeciwciał antygliadynowych znakowanych peroksydazą chrzanową (SIGMA A1052) oraz ELISA pośrednia z detekcyjnymi pierwszorzędowymi przeciwciałami antygliadynowymi (SIGMA G1944) i drugorzędowymi znakowanymi peroksydazą chrzanową (SIGMA A8275) specyficznymi wobec pierwszego przeciwciała. Jako standard zastosowano hordeinę wyizolowaną ze słodu jęczmiennego zgodnie z procedurą opisaną przez Kohnera i wsp. [20].

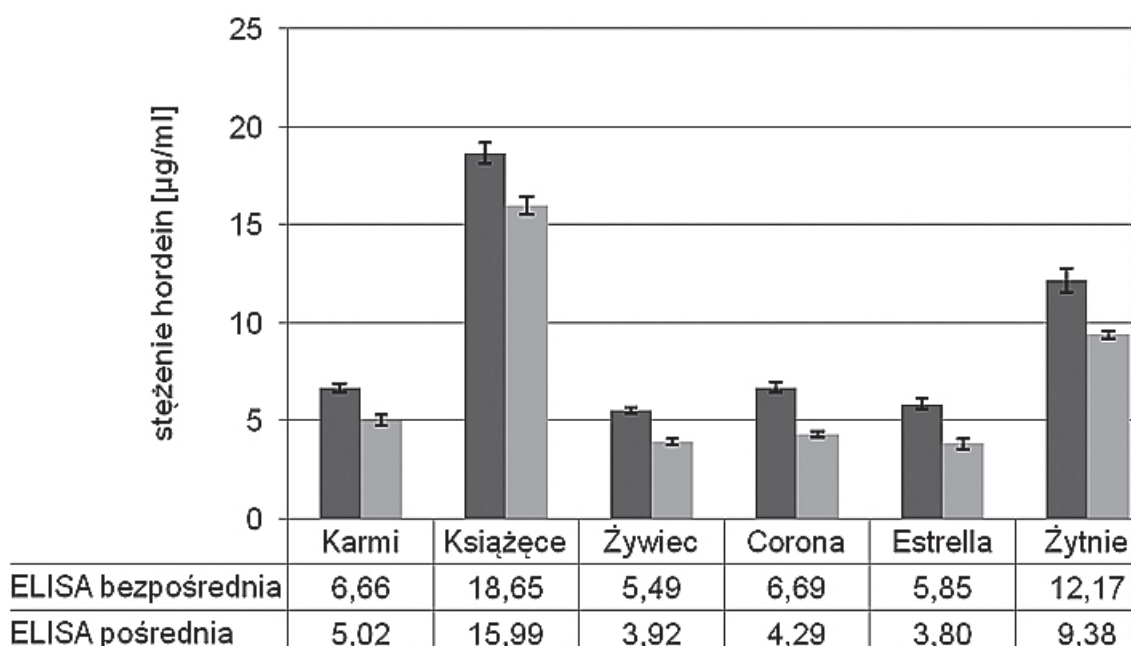
Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy pomocy programu MS Excel. Wyznaczono odchylenia standardowe oraz grupy jednorodne.

3. WYNIKI I DYKUSJA

Na Rysunku 1 przedstawiono wyniki pomiaru stężenia białek hordeinowych w badanych piwach z zastosowaniem dwóch formatów metody ELISA. Największe stężenie hordein oznaczono w piwie Książęcym 18,66 µg/ml (ELISA bezpośrednia) oraz 15,99 µg/ml (ELISA pośrednia). Wysoka zawartość hordein w tym piwie wynikała ze składu surowcowego, bowiem do jego produkcji użyto oprócz słodu jęczmiennego również sód pszeniczny, a stosowane przeciwciała uzyskano po immunizacji zwierząt gliadynami – prolaminową frakcją pszenicy. W konsekwencji mogło to wpłynąć na zwiększenie możliwości detekcyjnych wszystkich prolamin obecnych w badanym piwie.

Natomiast w piwie Żytnim oznaczono o 6 µg/ml mniej hordein za pomocą obu metod ELISA (12,17 µg/ml – test bezpośredni oraz 9,38 µg/ml – test pośredni).

Niskie stężenie białek hordeinowych w piwie Żywiec, wyprodukowanym ze słodu jęczmiennego, uznawanego za surowiec zawierający gluten, było dość zaskakujące. Kształtowało się ono na poziomie odpowiednim dla piw bezglutenowych (5,49 µg/ml – ELISA bezpośrednia, 3,92 – ELISA pośrednia). Prawdopodobnie proces technologiczny produkcji słodu i sposób warzenia piwa wpłynęły na ekstraktywność prolamin z jęczmienia oraz na stopień ich modyfikacji. Piwo to jest otrzymywane



Rysunek 1 Stężenie hordein [$\mu\text{g/ml}$] w badanych piwach oznaczone za pomocą bezpośredniej i pośredniej metody ELISA przy użyciu przeciwciał antygliadynowych
Figure 1 Hordein concentration [$\mu\text{g/ml}$] in analysed beers measured with the use of direct and indirect ELISA with antigliadin antibodies

techniką high gravity, co mogło spowodować, że w czasie uzyskiwania stężonej brzeczki nie wszystkie polipeptydy hordeinowe zostały wyodrębnione ze słodu, ponieważ przechodzą one do brzeczki tylko do określonego punktu nasycenia [21]. Wskutek tego ich stężenie w gotowym piwie mogło być tak niewielkie, że nie zostały one wykryte przez przeciwciała detekcyjne. Piwa Karmi i Corona nie różnią się statystycznie istotnie zawartością prolamin oznaczonych metodą bezpośrednią (około $6,6 \mu\text{g/ml}$). Natomiast metodą pośrednią wykryto niższe stężenie prolamin, odpowiednio $5,02$ i $4,29 \mu\text{g/ml}$.

Zawartość hordein w bezglutenowym piwie Estrella była zgodna z deklaracją producenta i nie przekroczyła $6 \mu\text{g/ml}$ niezależnie od zastosowanego formatu metody ELISA. Ponieważ zawartość glutenu w piwie bezglutenowym nie może przekraczać poziomu 20 ppm [14], a przyjmuje się, że zawartość wykrywanych prolamin w produkcie należy podwoić, aby wyznaczyć zawartość glutenu, piwo Estrella można zakwalifikować do piw bezglutenowych [22]. Zgodnie z *Codex Alimentarius* [23] do tej grupy, na podstawie zaprezentowanych wyników badań, można byłoby włączyć również piwo Żywiec, jednak wymaga to dalszego potwierdzenia innymi metodami analitycznymi, przy wykorzystaniu innych przeciwciał.

Stwierdzono, że zawartość prolamin oznaczonych za pomocą bezpośredniej metody ELISA była $15\text{--}30\%$ wyższa od zawartości prolamin oznaczonych za pomocą metody ELISA pośrednia we wszystkich badanych piwach.

4. WNIOSKI

Bezpośrednia metoda ELISA wykorzystana do wykrywania prolamin w piwie okazała się o wiele bardziej czuła w porównaniu z metodą ELISA pośrednia. Znakowane enzymatycznie przeciwciała stosowane w metodzie bezpośredniej wykryły więcej swoistych epitopów prolamin zawartych w piwie niż nieznakowane przeciwciała w metodzie ELISA pośrednia.

LITERATURA

- [1] Czerwionka-Szaflarska M., Zawadzka-Gralec A., Alergia pokarmowa u niemowląt i dzieci – objawy, diagnostyka, leczenie. *Polski Mercuriusz Lekarski*, 23, 2007, 138-443.
- [2] Dvořák J., Dostálék P., Čejka P., Kellner V., Čulík J., Horák T., Jurková M., Significance of SO₂ in beer. *Kvasny Prum*, 52, 2006, 346-348.
- [3] Słowianek M., Leszczyńska J., Detekcja alergenów w żywności, metody immunodiagnostyczne. *Technika-Technologia, Przem. Spoż.*, 65, 2011, 30-32.
- [4] Kaczmarski M., Matuszewska E., Diagnostyka alergii i nietolerancji pokarmowej u dzieci. *Alergia Astma Immunol.*, 5, 2000, 77-81.
- [5] Darewicz M., Dziuba J., Dietozależny charakter enteropatii pokarmowych na przykładzie celiakii. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1 (50), 2007, 5-15.
- [6] Haraszi R., Chassaigne H., Maquet A., Ulberth F., Analytical Methods for Detection of Gluten in Food – Method Developments in Support of Food Labeling Legislation. *J. AOAC Inter.*, 94 (4), 2011, 1006-1025.
- [7] Mills E. N. C., Madsen C., Shewry P. R., Wichers H. J., Food allergens of plant origin – their molecular and evolutionary relationships. *Trends in Food Sci. & Technol.*, 14, 2003, 145-156.
- [8] Wojtasik A., Daniewski W., Kunachowicz H., Ocena wybranych produktów spożywczych w aspekcie możliwości ich stosowania w diecie bezglutenowej. *Bromat. Chem. Toksy.*, 3, 2010, 362-371.
- [9] Wieser H., Koehler P., The biochemical basis of celiac disease. *Cereal Chem.*, 85 (1), 2007, 1-13.
- [10] Cielecka E. K., Dereń K., Grzegorzczak A., Nadwrażliwość pokarmowa. *Alergia Astma Immunol.*, 15(3), 2010, 118-124.
- [11] Van Eckert R., Berghofer E., Ciclitira P. J., Chirido F., Denery-Papini S., Ellis H. J., Ferranti P., Goodwin P., Immed U., Mamone G., Méndes E., Mothes T., Novalin S., Osman A., Rumbo M., Stern M., Thorell L., Whim A., Wieser H., Towards a new gliadin reference material – isolation and characterization. *J. Cereal Sci.*, 43, 2006, 331-341.
- [12] Dyrektywa 2003/89/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 10 listopada 2003 r.
- [13] Dyrektywa Komisji 2007/68/WE z dnia 27 listopada 2007 r.
- [14] Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 41/2009 z dnia 20 stycznia 2009 r.
- [15] Evans D. E., Sheehan M. C., Don't Be Fobbed Off: The Substance of Beer Foam – A review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 60, 2002, 47-57.
- [16] Dziuba J., Fornal Ł., *Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności*, Warszawa, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, 2009, 1-480.
- [17] Korzeń A., Korzeń S., Kuprowicz J., Malicki J., *Chemia organiczna*, (red.: J. Kuprowicz), Lublin, Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Lublinie, 1995, 226-229.
- [18] Dostálék P., Dvořák J., Hulín P., Allergens in Beer. *Kvasny Prum*, 56 (2), 2010, 105-108.
- [19] Perrocheau L., Bakan B., Boivin P., Marion D., Stability of barley and malt lipid transfer protein 1 (LTP1) toward heating and reducing agents: Relationships with the brewing process. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2006, 3108-3113.
- [20] Kanerva P. M., Sontag-Strohm T. S., Lehtonen P., Determination of prolamins in beers by ELISA and SDS-PAGE. *J. Inst. Brew.*, 111, 2005, 1, 61-64.
- [21] Stewart G. G., Mader A., Chlup P., Miedl M., The influence of Process Parameters on Beer Foam Stability. *MBAATQ*, 43, 2006, 1, 47-51.
- [22] Guerdrum L. J., Bamforth C. W., Levels of gliadin in commercial beers. *Food Chem.*, 129, 2011, 1783-1784.
- [23] Codex-Alimentarius - Commission. Codex Standard. Joint FAO/WHO Foods Standards Programme. Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses. Proposed Draft Revised Standards for "gluten-free" foods. CX/NFSDU 98/4, Rome: WHO/FAO, 1998: 1-4.