

Verbesserte Nachweismethode für Gluten

Mehr Sicherheit für Zöliakieerkrankte

Benedict Geßendorfer, Herbert Wieser
und Peter Köhler (Garching)



Menschen, die an Zöliakie leiden, müssen ein Leben lang auf den Verzehr von Produkten aus Roggen, Weizen, Gerste und auch Hafer verzichten, da die darin enthaltenen Speicherproteine (Gluten) eine schwere Schädigung der Dünndarmschleimhaut verursachen. Die einzige Therapie ist eine lebenslange Diät, bei der die tägliche Aufnahme von Gluten unter 20 mg liegen sollte. Dies bedeutet für die Betroffenen, dass sie eine große Palette von Lebensmitteln wie Brot, Teigwaren und Bier nicht konsumieren dürfen. Für dietätische glutenfreie Lebensmittel ist ein Höchstwert von 20 mg Gluten pro kg Lebensmittel vorgeschrieben. Um diesen Wert genau bestimmen zu können, müssen allerdings geeignete Referenzsubstanzen zur Verfügung stehen.

Zöliakie

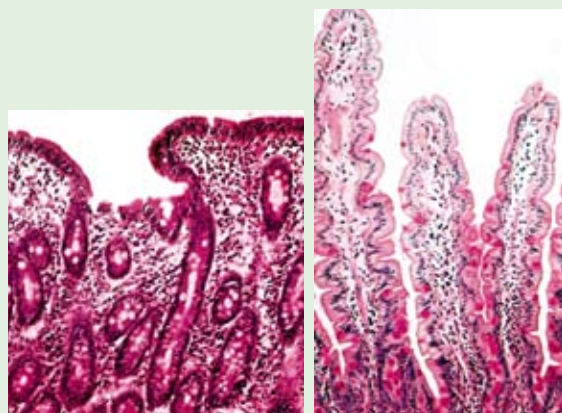
Bei der Zöliakie, beim Erwachsenen auch als „Einheimische Sprue“ bezeichnet, handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung im Bereich des Dünndarms. Sie beruht auf einer lebenslangen Intoleranz gegenüber den Speicherproteinen des Weizens (Gliadine und Glutenine), der Gerste (Hordeine), des Roggens (Secaline) und möglicherweise auch des Hafers (Avenine). Diese Proteine werden im Zusammenhang mit Zöliakie auch als „Gluten“ bezeichnet. Da bei der Verarbeitung von Weizenmehl das Gluten dafür sorgt, dass der Teig elastisch bleibt und Flüssigkeit gebunden wird, wird es auch als Klebereiweiß bezeichnet.

Für die Schädigung der Dünndarmschleimhaut sind nicht die Speicherproteine selbst verantwortlich, sondern deren Bruchstücke (Peptide), die im Verdauungstrakt gebildet werden. Besonders die Proteinabschnitte, die reich an den Aminosäuren Prolin und Glutamin sind, können von Protein abbauenden Enzymen des Magens und Darms nicht vollständig verdaut werden.

Wenn nun diese Peptide aus mehr als acht Aminosäureresten bestehen, lösen sie bei Zöliakie-Patienten eine entzündliche Immunreaktion aus: Die Peptide dringen in das lymphatische Gewebe ein, werden dort von zöliakiespezifischen Zellen gebunden und stimulieren

T-Lymphozyten, die daraufhin die Entzündung und Zerstörung der Darmzotten herbeiführen.

Die zurzeit einzig mögliche, aber auch notwendige therapeutische Maßnahme ist eine strikte glutenfreie Diät. Die tägliche Aufnahme



Gewebschnitt atrophischer Dünndarmschleimhaut (li.) – zum Vergleich: normale Dünndarmschleimhaut (re.)

Deutsche Zöliakie Gesellschaft e.V.



von Gluten sollte unter 20 mg liegen, welches in etwa dem hundertsten Teil einer Brotscheibe entspricht. Dies bedeutet für den Betroffenen den Verzicht auf sämtliche Gerste-, Weizen-, Roggen-, und Haferprodukte. Sie müssen auf „glutenfreie Lebensmittel“ zurückgreifen, die zum Beispiel aus Mais, Hirse oder Reis hergestellt werden. Diätetische glutenfreie Lebensmittel unterliegen dem „Codex Alimentarius Standard for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten“; sie dürfen einen Höchstwert von 20 mg Gluten pro kg Lebensmittel nicht überschreiten. Als Gluten werden dabei nicht nur intakte Speicherproteine gesehen, sondern auch deren Bruchstücke (Peptide). Dies bezieht sich insbesondere auf Lebensmittel, die durch Fermentation hergestellt werden, wie zum Beispiel Bier oder Malztrunk, da hierbei die im Rohstoff enthaltenen Proteine teilweise oder vollständig in Peptidfragmente gespalten werden. Daher sind auch solche Lebensmittel nicht glutenfrei und für Zöliakieerkrankte ungeeignet.

Immunchemischer Nachweis von Gluten

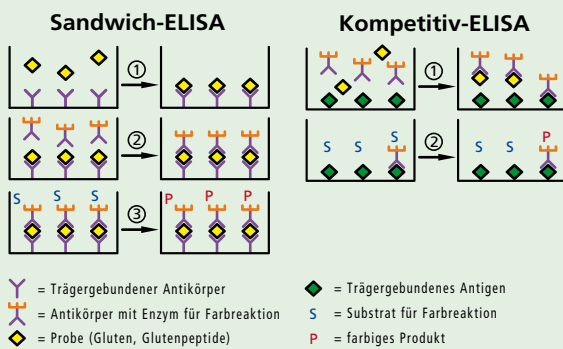
Die Bestimmung der Glutengehalte in Lebensmitteln erfolgt heute in den meisten Fällen mittels einer immunchemischen Nachweismethode, dem ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Ein ELISA ist ein analytischer Test, der sich die spezifische Wechselwirkung zwischen einem Antigen und seinem Antikörper zunutze macht, um die Konzentration von einem der beiden zu bestimmen. Hierbei bedient man sich eines Enzyms als Marker. Dadurch kann die Konzentration des Antigens über den Substratumsatz bestimmt werden. Generell können zwei wesentliche ELISA-Systeme unterschieden werden (Abb. 1). Bei dem Sandwich-ELISA dockt das zu bestimmende Protein (Antigen) mit seiner Bindungsstelle (Epitop) an den Antikörper, der sich im Testsystem befindet, an. Die quantitative Erfassung dieser Komplexe erfolgt durch Zugabe eines weiteren Antikörpers, der durch Markierung mit einem Enzym durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden kann. Damit der zweite Antikörper an den primären Antigen-Antikörper-Komplex binden kann, muss das zu bestimmende Antigen mindestens zwei spezifische Bindungsstellen aufweisen, was bei hochmolekularen Proteinen in der Regel der Fall ist. Bei dem Kompetitiv-ELISA wird kein enzymmarkierter Antikörper,

sondern ein enzymmarkiertes Antigen zugegeben. Dieses konkurriert mit dem nicht-enzymmarkierten Antigen aus der entsprechenden Lebensmittelprobe um die Bindungsstelle am Antikörper. Über eine Kalibrierkurve kann der Verdrängungsgrad und damit seine Konzentration bestimmt werden. Bei dieser Variante des ELISA muss also nur ein Epitop vorliegen. In der Regel weisen niedermolekulare Peptide diese strukturellen Eigenschaften auf. Daher können beide Methoden für die Quantifizierung von intaktem Gluten verwendet werden, für die Quantifizierung von Glutenabbauprodukten ist allerdings nur der Kompetitiv-ELISA geeignet, weil die Peptide aus dem Gluten in der Regel so kurz sind, dass sie nur eine Bindungsstelle für die Wechselwirkung mit dem Antikörper aufweisen.

Zu beachten ist weiterhin, dass der verwendete Antikörper sowohl im Sandwich- als auch im Kompetitiv-ELISA nur einen Teil des Glutens detektiert. Nachgewiesen werden nur die sogenannten Prolamine, bei denen es sich um diejenigen Speicherproteine handelt, die in wässrigen Alkoholen löslich sind und einen hohen Gehalt an den Aminosäuren Glutamin und Prolin aufweisen. Diese werden beim Weizen als Gliadin, bei der Gerste als Hordein und beim Roggen als Secalin bezeichnet. Unberücksichtigt bleiben die in wässrigen Alkoholen unlöslichen Speicherproteine, die sogenannten Gluteline. Da Gluten die Summe aus Prolaminen und Glutelinen darstellt und im Weizen das Verhältnis dieser beiden Fraktionen etwa gleich ist, wird vereinbarungsgemäß die Prolaminkonzentration mit dem Faktor 2 multipliziert, um auf den Glutengehalt zu kommen.

Um die bei der Messung der Farbreaktion erhaltenen Intensitäten in Konzentrationen umzurechnen, ist es erforderlich, den ELISA-Test zu kalibrieren. Dazu werden definierte Konzentrationen einer geeigneten Referenzsubstanz analysiert und die erhaltenen Ergebnisse in Form einer Kalibrierfunktion dargestellt. Aus dieser kann bei der Analyse von Proben die gemessene Farbintensität direkt in eine Konzentration umgerechnet werden. Dabei ist zu beachten, dass die Referenzsubstanz mit den zu bestimmenden Verbindungen identisch oder ihnen möglichst ähnlich ist, um bei der Probe und der Referenz dieselbe Abhängigkeit zwischen Signalintensität und Konzentration zu erhalten. Für die Bestimmung von Gluten in Lebensmitteln steht bisher als Referenzsubstanz das sogenannte PWG-Gliadin zur Verfügung (PWG: Prolamin Working Group). Dabei handelt es sich um die intakten Gliadine der wichtigsten europäischen Weizensorten, weshalb diese Referenzsubstanz für die Bestimmung von intakten Gluten mit dem Sandwich-ELISA geeignet ist. Für die Quantifizierung von teilweise abgebautem Gluten, wie sie in fermentierten Lebensmitteln vorkommen, steht eine Referenzsubstanz bisher allerdings nicht zur Verfügung. Daher war das Ziel der dargestellten Untersuchungen die Entwicklung einer geeigneten Referenz für den Kompetitiv-ELISA.

Abb. 1: Schematische Darstellung eines Sandwich- und eines Kompetitiv-ELISA



Entwicklung einer geeigneten Referenz für den Kompetitiv-ELISA

Um eine Referenz für den Kompetitiv-ELISA herzustellen, wurden die Prolamin-Fractionen der Speicherproteine aus Weizen, Gerste und Roggen verwendet. Gliadin, Hordein und Secalin wurden zunächst aus den entsprechenden Getreidemehlen durch Extraktion mit wässrigem Ethanol isoliert und anschließend mittels zweier

Enzyme (Pepsin und Trypsin) in Peptide gespalten, um die bei der Herstellung fermentierter Lebensmittel ablaufenden Abbaureaktionen nachzuahmen. Die erhaltenen Peptidgemische (Hydrolysate) wurden in gefriergetrockneter Form gelagert und für die folgenden Untersuchungen eingesetzt. Zunächst wurden über die Bestimmung der Stickstoffgehalte die enthaltenen Mengen an Peptid ermittelt. Dieser Peptidgehalt entsprach der vor dem Abbau vorliegenden Proteinmenge und war damit die Grundlage der Bestimmung des Glutengehaltes in fermentierten Lebensmitteln.

Bevor die neuen Referenzen an fermentierten Lebensmittelproben zum Einsatz kamen, wurden der Sandwich- und der Kompetitiv-ELISA verglichen, wobei in beiden Tests PWG-Gliadin als Referenz eingesetzt wurde. Als „Proben“ dienten die intakten Prolamine aus Weizen, Roggen und Gerste sowie deren Hydrolysate, die später als neue Referenzen verwendet werden sollten. Um die beiden Methoden vergleichen zu können, wurden die mit intaktem Gliadin ermittelten Messwerte auf 100 gesetzt. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Prolaminäquivalente von intakten Prolaminfraktionen und von Prolaminhydrolysaten (40 µg Protein bzw. Peptid pro Milliliter Lösung), bestimmt mittels Sandwich- und Kompetitivem ELISA

Referenz	Prolaminäquivalente Sandwich-ELISA ¹	Prolaminäquivalente Kompetitiver ELISA ¹
Gliadin ²	=100,0 ± 4,5	=100,0 ± 6,1
Secalin	112,2 ± 6,5	104,8 ± 4,2
Hordein	117,4 ± 2,7	114,0 ± 6,9
Gliadinhydrolysat ³	39,8 ± 1,6	62,9 ± 4,0
Secalinhydrolysat ³	43,7 ± 1,8	72,7 ± 7,1
Hordeinhydrolysat ³	40,4 ± 4,3	74,8 ± 6,3

¹ Mittelwert aus drei Bestimmungen ± Standardabweichung, ² PWG-Gliadin; Äquivalente auf 100,0 gesetzt, ³ Hydrolyse mit Pepsin und Trypsin

Es zeigte sich, dass der Kompetitiv-ELISA insbesondere im Hinblick auf die Quantifizierung der Hydrolysate deutlich empfindlicher war als der Sandwich-ELISA. So konnten hier durchschnittlich etwa 70 % der Referenz wiedergefunden werden, im Sandwich-ELISA nur etwa 40 %. Ein Vergleich der verschiedenen Hydrolysate untereinander zeigte zusätzlich auch einen generell besseren Nachweis der Peptide aus Roggen und Gerste im Vergleich zu denen aus Weizen.

Glutengehalt in fermentierten Getränken

Um zu überprüfen, inwieweit ein Nachweis der Peptide in Lebensmitteln möglich ist, wurden verschiedene fermentierte Getränke untersucht. Als Testmaterial dienten die aus Gerstenmalz hergestellte Bionade®, zwei glutenfreie Biere, ein Malzgetränk, sowie ein aus Roggen- und Weizenbrot hergestellter Brottrunk. Der Glutengehalt dieser vier Getränke wurde sowohl mittels Sandwich-ELISA als auch mittels Kompetitiv-ELISA bestimmt. Als Referenz wurde für den

Tab. 2: Glutengehalte verschiedener Getränke, bestimmt mittels Sandwich- und Kompetitivem ELISA¹

Getränk	Glutengehalt [mg/kg] Sandwich-ELISA ²	Glutengehalt [mg/kg] Kompetitiver ELISA ³
Bionade®	< 4,0	< 4,6
Malztrunk	20,5 ± 1,4	32,3 ± 1,8
Brottrunk	25,4 ± 1,2	36,0 ± 2,2
Glutenfreies Bier 1	< 4,0	15,6 ± 0,8
Glutenfreies Bier 2	nicht bestimmt	8,1 ± 1,1

¹ Mittelwert aus drei Bestimmungen ± Standardabweichung, ² Referenzsubstanz: PWG-Gliadin, ³ Referenzsubstanz: Mit Pepsin und Trypsin hydrolysiertes Hordein

Sandwich-ELISA PWG-Gliadin und für den Kompetitiv-ELISA das hergestellte Hydrolysat aus Gerste (Hordeinhydrolysat) verwendet. Tabelle 2 zeigt die ermittelten Glutengehalte. Die Ergebnisse zeigten, dass Gluten in den fermentierten Lebensmitteln mit dem Kompetitiv-ELISA deutlich empfindlicher nachgewiesen wurde als mit dem Sandwich-ELISA. So waren die mittels Kompetitiv-ELISA gemessenen Mengen der Kleberabbauprodukte (Glutenpeptide) sowie die daraus berechnete Menge an Gluten gegenüber dem Sandwich-ELISA signifikant erhöht. Weiterhin wurde deutlich, dass die als glutenfrei bezeichneten Biere tatsächlich keine Glutengehalte oberhalb des Grenzwertes aufwiesen, was auch für die aus Gerstenmalz hergestellte Bionade galt. Brottrunk und Malztrunk, die als konventionelle Lebensmittel vermarktet werden, waren nicht glutenfrei.

Neben dem etablierten Sandwich-ELISA mit PWG-Gliadin als Referenz zur Bestimmung von intaktem Gluten steht nun eine neue Referenz für die Bestimmung von teilweise abgebautem Gluten zur Verfügung. Die hergestellten enzymatischen Hydrolysate der Prolamine aus Weizen, Gerste und Roggen bieten in Kombination mit dem kommerziell erhältlichen Kompetitiv-ELISA einen sehr empfindlichen Nachweis von partiell hydrolysiertem Gluten in fermentierten Lebensmitteln. Dies bedeutet mehr Sicherheit für Zöliakieerkrankte, da der Glutengehalt in fermentierten Lebensmitteln nun zuverlässiger als zuvor bestimmt werden kann. Vorteile sind aber auch für Lebensmittelhersteller denkbar. Bisher wurden fermentierte Lebensmittel auf Weizen-, Gersten- oder Roggenbasis häufig vorsorglich als glutenhaltig eingestuft, da es keine Möglichkeit gab, den Glutengehalt zu ermitteln. Mit der verbesserten Analytik ist dies nun möglich. Auf diese Weise könnte sich die Palette an geeigneten Lebensmitteln erweitern und den Speisezettel von Zöliakieerkrankten bereichern. ■



Benedict Geßendorfer, Dr. Herbert Wieser und Prof. Dr. Peter Köhler, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching.
E-Mail: peter.koehler@lrz.tum.de

» Danksagung:

Die Autoren bedanken sich bei der Leibniz-Gemeinschaft für die finanzielle Unterstützung des Projektes.