

Pivo a celiakie

Beer and Celiac Disease

Renata MIKULÍKOVÁ, Zdeněk SVOBODA, Karolína BENEŠOVÁ, Sylvie BĚLÁKOVÁ

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Sladařský ústav Brno, Česká republika / Research Institute of Brewing and Malting, Plc., Malting Institute Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno, Czech Republic

e-mail: mikulikova@brno.beerresearch.cz

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Benešová, K. – Běláková, S.: Pivo a celiakie. Kvasny Prum. 59, 2013, č. 10–11, s. 321–323

Celiakie je celoživotní onemocnění způsobené nesnášenlivostí lepku. Jedinou terapií je vyloučení lepku z potravy. Základem bezpečné diety je naprosté vyloučení pšenice, žita, ječmene, ovsa a výrobků z nich. Za účelem vhodnosti konzumace piva pro celiaky byla analyzována piva z obchodní sítě metodou ELISA. Bylo analyzováno 33 vzorků českých a zahraničních piv, obsahy gliadinu se pohybovaly od <5,0 do 1335,5 mg/l.

Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Benešová, K. – Běláková, S.: Beer and celiac disease. Kvasny Prum. 59, 2013, No. 10–11, p. 321–323

Celiac disease is a lifelong condition caused by gluten intolerance. The only therapy is a gluten-free diet, i.e. a complete exclusion of barley, rye, barley, oats and products made from them. Beers from retail shops were analyzed using the ELISA method to assess suitability of beer consumption for people with celiac disease. 33 samples of Czech and foreign beers were analyzed, gliadin contents varied from <5.0 to 1335.5 mg/l.

Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Benešová, K. – Běláková, S.: Bier und a Zeliakie. Kvasny Prum. 59, 2013, Nr. 10–11, S. 321–323

Die Zeliakie ist durch Unverträglichkeit gegen Gluten verursachte eine lebensdauernde Krankheit, einzige Therapie einer gluten freien Diät ist Ausschluss von Gluten in Lebensmitteln. Grund der Gluten freie Diät ist Ausschluss von Weizen, Roggen, Gerste, Hafer und aus diesen Produkten hergestellten Lebensmitteln. Für die Bestimmung der Eignung vom Bierkonsum mit dieser Krankheit betreffende Patienten (Zeliaken) wurden 33 tschechische und ausländische Biere aus Handelnetz analysiert, Gehalt an Gliadin liegt im Bereich von 5,0 bis zu 1335,5 mg/l.

Klíčová slova: celiakie, gliadin, ELISA, pivo

Keywords: celiac disease, gliadin, ELISA, beer

1 ÚVOD

Gluten (lepek – z latinského „lepidlo“) je složený protein, který se nachází v potravinách zpracovaných z pšenice a příbuzných druhů, včetně ječmene a žita. Lepek je složen z gliadinů (dříve nazývaných prolaminů) a glutelinů. Jejich triviální názvy vycházející z latinských názvů rostlin a typické složení proteinů v běžných obilovinách uvádí *tab. 1* (Velíšek, 2003).

Pro prolaminu se nyní obecně používá název gliadinu (odvozený název od pšeničných prolaminů). Gliadiny pšenice (nazývané gliadiny), žita (nazývané sekaliny), a ječmene (nazývané hordeiny) jsou toxické pro jedince trpící alergií na lepek – tzv. celiakií.

Celiakie patří mezi tzv. autoimunitní onemocnění. Její podstatou je abnormální reakce imunitního systému nemocného jedince na lepek. V jeho střevě vznikají obranné látky namířené proti lepku. Současně poškozují stěnu trávicí trubice (tenkého střeva). Rozvíjí se zánět a strádající sliznice mění své vlastnosti. Dochází k poruše trávení některých cukrů a nedostatečnému vstřebávání bílkovin, tuků, minerálů a vitamínů. (Keler et al., 2011). Pro zlepšení kvality života celiaků se v poslední době rozšiřuje sortiment potravin vhodných pro bezlepkovou dietu. Mezi nové nápoje vhodné pro celiaky patří i bezpečné pivo. Od 1. ledna 2012 platí nové Nařízení komise (ES) č. 41/2009, které mění označení bezpečných výrobků. Nařízení uvádí jednotný limit pro bezlepkovou potravinu, a to bez ohledu na to, z jakých surovin byla vyrobena, a to ve výši 20 mg lepku/kg potraviny ve stavu určeném ke spotřebě. Aby

1 INTRODUCTION

Gluten (gluten – glue in Latin) is a composed protein occurring in foods made from wheat and related species, including barley and rye. Gluten is composed of gliadins (formerly called prolamins) and glutelins. Their trivial names are based on the names of plants and typical protein composition in cereals is given in *Tab. 1* (Velíšek, 2003).

Prolamins are generally called gliadins today (derived from wheat prolamins). Wheat gliadins (called gliadins), rye (called sekalins), and barley (called hordeins) are toxic for the individuals suffering from gluten allergy – so called celiac disease. Celiac disease belongs to autoimmune diseases. It is manifested by an abnormal response of the diseased person's immune system to gluten. Defensive substances against gluten are formed in the intestine; they damage the wall of the digestive tract (small intestine). The inflammation develops and the suffering tissue alters its characters. Digestion of some sugars is disrupted and absorption of proteins, fats, minerals and vitamins is inadequate. (Keler et al., 2011). In the effort to improve the quality of life for celiac people, the assortment of food products suitable for gluten-free diet has been extended recently. Gluten-free beer belongs to new drinks suitable for people with celiac disease.

Since January 1, 2012, the amendment of the Commission Regulation (EC) No 41/2009 concerning labelling the gluten-free food products has been in force. The Regulation defines a unique limit for

Tab. 1 Proteiny obilovin a jejich složení / Cereal Proteins And Their Composition

Obilovina / Cereal	Albumin	Globulin	Gliadin	Glutelin
Pšenice / wheat	leukosin 14.7%	edestin 7.0%	gliadin 32.6%	glutenin 45.7%
žito / rye	44.4%	10.2%	sekalin 20.9%	sekalinin 24.5%
ječmen / barley	12.1%	8.4%	hordein 25.0%	hordenin 54.5%
oves / oats	20.2%	avenalin 11.9%	gliadin 14.0%	avenin 53.9%
rýže / rice	10.8%	9.7%	oryzin 2.2%	oryzenin 77.3%
kukuřice / maize	4.0%	2.8%	zein 47.9%	zeanin 45.3%

gluten-free food products regardless raw materials used for its production in the amount of 20 mg gluten/kg of food in the state for consumption. To be able to get in this category, a producer must guarantee the fulfillment of the Regulation (the product must be laboratory tested and have a label on the product packaging indicating its gluten-free content).

For the analysis of cereal proteins more methods based on the principle of electrophoresis, liquid chromatography and immunochemical reactions are used (Molina-Delgado et al., 2011; Guerdum and Bamforth, 2011; Picariello et al., 2011; Hulin et al., 2008; Dostálek et al., 2006). The immunochemical assay ELISA is most frequently used for the determination of allergenic effects of prolamins. It is due to the fact that antibodies

se výrobce dostal do této kategorie, musí garantovat plnění podmínek vyhlášky (na obalu uvést označení o bezpečnosti výrobku a výrobek musí být laboratorně otestován).

K analýze obilných proteinů se využívá více metod založených na principu elektroforézy, kapalinové chromatografie i imunochemických reakcí (Molina-Delgado et al., 2011; Guerdum a Bamforth, 2011; Picariello et al., 2011, Hulín et al., 2008; Dostálek et al., 2006). Pro stanovení alergenních účinků prolaminů je nejrozšířenější variantou imunochemický test ELISA. Je to dáno skutečností, že protilátky zaměřené na prokazatelně toxické sekvence gliadinů se v současnosti jeví jako nejracionalnější způsob kontroly potravin z hlediska jejich vhodnosti pro lidi nemocné celiakií.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie

Rybí želatina (Sigma-Aldrich, Kanada), etanol pro UV (ML Chemica, ČR), hydroxid sodný (ML Chemica, ČR), destilovaná voda, ELISA kit RIDASCREEN® Gliadin competitive (R-Biopharm, Německo).

2.2 Vzorky pív

Ke sledování obsahu gliadinu v pivu bylo analyzováno celkem 32 různých druhů českých a zahraničních pív zakoupených v obchodní síti. Pro analýzu bylo vybráno 9 českých světlých ležáků, 12 českých světlých výčepních pív, 1 české tmavé pivo, 2 česká nealkoholická piva a 5 českých speciálních pív (z toho 1 pšeničné pivo a 1 pivo označené jako bezlepkové). Dále byla analyzována 3 zahraniční světlá piva, která pocházela z Mexika, Holandska a Kanady.

2.3 Příprava a zpracování vzorků pív

1 ml odplyněného piva se smíchá s 9 ml 60% roztoku etanolu obsahujícího 10% rybí želatiny. Směs se 10 min protřepává na tře-

against demonstrably toxic gliadin sequences appear to be the most reasonable way of food control in terms of their suitability for people suffering from celiac disease.

2 EXPERIMENTAL PART

2.1 Chemicals

Fish gelatin (Sigma-Aldrich, Canada), ethanol for UV (ML Chemica, CR), sodium hydroxide (ML Chemica, CR), distilled water, ELISA kit RIDASCREEN® Gliadin competitive (R-Biopharm, Germany).

2.2 Beer samples

Gliadin content in beer was tested in a total of 32 various brands of Czech and foreign beers bought in retail shops. 9 Czech pale lagers, 12 Czech pale draught beers, 1 Czech dark beer, 2 Czech non-alkoholic beers and 5 Czech special beers (including 1 wheat beer and 1 beer denoted as gluten-free) were selected for the analysis. In addition, 3 foreign pale beers from Mexico, Holland and Canada were analyzed.

2.3 Preparation and assessment of beer samples

1 ml of degassed beer was blended with 9 ml 60% of ethanol solution containing 10% of fish gelatin. The mixture was shaken for 10 min in a shaker and then centrifuged. The beer sample was used for the determination using the ELISA kit.

2.4 Determination of gliadin by the ELISA set

The test was conducted using a microtitration plate with wells coated with antigen gliadin Standards of gliadin (calibrated to QGP-FP-peptides) or solution of the sample and labeled anti-gliadin antibodies (monoclonal R5-antibody) were added into the wells. The labeled antibodies (enzyme conjugates) bind to gliadin in the plate

Tab. 2 Obsah gliadinu v českých a zahraničních pivech / Gliadin content in Czech and foreign beers

Označení Vzorku / Sample Identification	Obsah Gliadinu / Gliadin Content (Mg/L)
České Pivo – Nealko / Czech Beer – Non-Alcoholic	22.7
České Pivo – Nealko / Czech Beer – Non-Alcoholic	23.5
České Pivo – Special / Czech Beer – Special	128.9
České Pivo – Special / Czech Beer – Special	92.3
České Pivo – Special / Czech Beer – Special	39.4
České Pivo – Special / Czech Beer – Special	25.6
České Pivo – Special – Pšeničné / Czech Beer – Special-Wheat	1335.5
České Pivo – Sv.Ležák / Czech Beer – Pale Lager	24.0
České Pivo – Sv.Ležák / Czech Beer – Pale Lager	44.3
České Pivo – Sv.Ležák / Czech Beer – Pale Lager	36.2
České Pivo – Sv.Ležák / Czech Beer – Pale Lager	30.7
České Pivo – Sv.Ležák / Czech Beer – Pale Lager	36.8
České Pivo – Sv.Ležák / Czech Beer – Pale Lager	40.1
České Pivo – Sv.Ležák / Czech Beer – Pale Lager	60.0
České Pivo – Sv.Ležák / Czech Beer – Pale Lager	26.9
České Pivo – Sv.Ležák / Czech Beer – Pale Lager	108.4
České Pivo – Sv.Výčepní / Czech Beer – Pale Draught	40.3
České Pivo – Sv.Výčepní / Czech Beer – Pale Draught	58.8
České Pivo – Sv.Výčepní / Czech Beer – Pale Draught	41.3
České Pivo – Sv.Výčepní / Czech Beer – Pale Draught	19.7
České Pivo – Sv.Výčepní / Czech Beer – Pale Draught	24.7
České Pivo – Sv.Výčepní / Czech Beer – Pale Draught	26.1
České Pivo – Sv.Výčepní / Czech Beer – Pale Draught	17.3
České Pivo – Sv.Výčepní / Czech Beer – Pale Draught	16.6
České Pivo – Sv.Výčepní / Czech Beer – Pale Draught	6.2
České Pivo – Sv.Výčepní / Czech Beer – Pale Draught	13.6
České Pivo – Sv.Výčepní / Czech Beer – Pale Draught	26.2
České Pivo – Sv.Výčepní / Czech Beer – Pale Draught	22.0
České Pivo – Tmavý Ležák / Czech Beer – Dark Lager	49.1
Zahraniční Pivo / Foreign Beer	< 5.0
Zahraniční Pivo / Foreign Beer	14.7
Zahraniční Pivo / Foreign Beer	19.6

pačce a následně se centrifuguje. Takto připravený vzorek piva je použit k vlastnímu stanovení kitem ELISA.

2.4 Stanovení gliadinu setem ELISA

Test je prováděn za pomoci mikrotitrační destičky s jamkami, které jsou potaženy gliadinem jako antigenem. Standardy gliadinu (kalibrované na QQPFP-peptidy) nebo roztok vzorku a označené anti-gliadin protilátky (monoklonální R5-protilátky) jsou do jamek přidány ve stejném čase. Protilátky (enzymový konjugát) jsou navázány na gliadin na destičce a prolaminové peptidy v roztoku. Během inkubace se vytvoří komplexy antigen-protilátka. Následným krokem je promývání, při kterém je nenavázaný enzymový konjugát z roztoku odstraněn, navázaný na destičce zůstane, nevymyje se. Po promytí se do jamek přidá substrate/chromogen a inkubuje se. Navázaný enzymový konjugát mění během inkubace barvu chromogenu na modrý produkt. Po uplynutí stanovené doby inkubace se přidá stop roztok, který způsobí změnu modré barvy na žlutou a zbarvení se proměří spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. Absorbance je nepřímo úměrná koncentraci prolaminových peptidů ve vzorku.

Pro vyhodnocení se používá speciální software RIDA®SOFT Win.

Zavedená metodika kompetitivního testu ELISA pro stanovení gliadinu v pivu je v podmínkách laboratoře VÚPS, Sladařský ústav Brno dostatečně reprodukovatelná a využitelná.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro stanovení toxické sekvence pentapeptidu QQPFP, která se opakovaně vyskytuje v molekulách prolaminu, byl použit test RIDASCREEN® Gliadin competitive. Je to kompetitivní enzymová imunoanalýza pro kvantitativní stanovení peptidových fragmentů prolaminu z pšenice (gliadiny), z rýže (sekaliny) a z ječmene (hordeiny) v pivu, škrobu a škrobovém sirupu. Použitá monoklonální protilátka R5 rozpoznává mezi ostatními toxickou sekvencí QQPFP. Z tohoto důvodu jsme i v naší práci zvolili test ELISA jako základní analytický postup.

Ke sledování obsahu gliadinu v pivu bylo vybráno celkem 32 českých a zahraničních piv. Výsledky stanovení gliadinu jsou uvedeny v tab. 2.

Obsahy gliadinu se v českých světlých ležáckých pivech pohybovaly v rozmezí 24,0 – 108,4 mg.l⁻¹, u českých výčepních piv 6,2 – 58,8 mg.l⁻¹. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u českého pšeničného piva 1335,5 mg.l⁻¹. Zahraniční piva měla obsahy gliadinu nižší (< 5,0 – 19,6 mg.l⁻¹). Nižší obsahy gliadinu v zahraničních pivech mohou souviset s použitím surogátů (náhražka sladu) při výrobě piva.

4 ZÁVĚR

Piva na českém trhu vykazují poměrně široký rozsah koncentrací gliadinu. Při přepočtu na gluten běžně užívaným faktorem 2 jen výjimečně splňují požadavek Codex Alimentarius (mezinárodně platné doporučení Codex Stan 118–1979, čl. 2 Definice a čl. 5 Analytické metody, jehož zásady byly plně převzaty do komunitárního Nařízení (ES) č. 41/2009/ES z 20. ledna 2009) pro označení „gluten-free“. Pro označení „gluten-free“ by z analyzovaných českých piv vyhovovalo pouze bezlepkové pivo vyrobené speciální technologií (Dostálek, 2010).

Poděkování

Výsledků bylo dosaženo v rámci projektu MPO IIMPULS FI-IM5/067.

LITERATURA / REFERENCES

- Velíšek, J., 2002: Chemie potravin 3. OASSIS, Tábor. ISBN 80-86659-03-8
- Klener, P. et al., 2011: Vnitřní lékařství. Galén, Praha. ISBN 9788072627059
- Molina-Delgado, M.A., Aguilar-Caballeros, M.P., Gómez-Hens, A., 2011: Usefulness of gold nanoparticles as labels for the determination of gliadins by immunofluorescence chromatography with light scattering detection. *Talanta*, 85: 2391–2396
- Guerdrum, L.J., Bamforth, C.W., 2011: Levels of gliadin in commercial beers. *Food Chemistry*, 129: 1783–1784
- Picariello, G., Bonomi, F., Iametti, S., Rasmussen, P., Pepe, C., Lilla, S., Ferranti, P., 2011: Proteomic and peptidomic characterisation of beer: Immunological and technological implications. *Food Chemistry*, 124: 1718–1726
- Hulín, P., Dostálek, P., Hochel, I., 2008: Methods for determination of gluten proteins in foods. *Chem. Listy*, 102: 327–337.

and prolamin peptides in the solution. During incubation antigen-antibody complexes are formed. During the following washing step, the excess enzyme conjugate was removed from the solution while bound enzyme remained on the plate. After washing, substrate/chromogen was added into the wells and incubated. During incubation the bound enzyme conjugate changes chromogen color to a blue product. After the expiration of the given time stop solution was added and blue color changed to yellow, color was measured by spectrophotometry at the wavelength of 450 nm. The absorption is inversely proportional to the concentration of prolamin peptides in the sample.

The absorption is assessed with special RIDA®SOFT Win software.

The established method of the ELISA competitive test for the determination of gliadin in beer under the conditions of the RIBM's laboratory, Malting Institute Brno is sufficiently reproducible and usable.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Toxic pentapeptide sequence (QQPFP), occurring repeatedly in the prolamin molecules, was determined by the RIDASCREEN® Gliadin competitive test. It is a competitive enzyme immunoanalysis for the quantitative determination of peptide fragments of prolamin from wheat (gliadins), rye (sekalins), and barley (hordeins) in beer, starch and starch syrup. The monoclonal antibody R5 is able to recognize the toxic sequence QQPFP. For this reason the ELISA test was chosen as a basic analytical procedure in this study.

A total of 32 Czech and foreign beers were selected for monitoring gliadin content. The results of gliadin content are given in Tab. 2.

Gliadin content in Czech pale lager beers moved within 24.0 – 58.8 mg.l⁻¹, in Czech draught beers from 6.2 – 108.4 mg.l⁻¹. The highest value was measured in Czech wheat beer: 1335.5 mg.l⁻¹. Foreign beers had lower gliadin contents (< 5.0 – 19.6 mg.l⁻¹). The lower contents of gliadin in foreign beers may be connected with the use of surrogates (malt substitutes) for beer production.

4 CONCLUSIONS

Beers in the Czech market exhibit a relatively wide range of concentrations of gliadin. With conversion to gluten by a commonly used factor 2, they only exceptionally fulfill the requirement of the Codex Alimentarius (internationally valid recommendation Codex Stan 118–1979, art. 2 Definition and art. 5 Analytical Methods, principles of which were fully included into the Commission Regulation (EC) no. 41/2009/ES from January 20, 2009) for the “gluten-free” indication. Of the Czech analyzed beers, only the gluten-free beer brewed using a special technology would meet the “gluten-free” requirements (Dostálek, 2010).

Acknowledgements

The results were obtained within the project of MPO IIMPULS FI-IM5/067.

Translated by Vladimíra Nováková

- Dostálek, P., Hochel, I., Méndez, E., Hernando, A., Gabrovská, D., 2006: Immunochemical determination of gluten in malts and beers. *Food Addit. Contam.* 23: 1074–1078.
- Nařízení komise (ES) č. 41/2009 ze dne 20. ledna 2009 o složení a označování potravin vhodných pro osoby s nesnášenlivostí lepku: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=O-J:L:2009:016:0003:0005:CS:PDF> (staženo 25. 1. 2013)
- Codex Alimentarius, Codex standard for foods for special dietary use persons intolerant to gluten, Codex stan 118–1979: http://www.codexalimentarius.org/download/standards/291/cxs_118e.pdf (staženo 25.1.2013)
- Dostálek, P., Dvořák, J., Hulín, P., 2010: Alergeny v pivu. *Kvasný Prum* 56: 105–108. ISSN 0023-5830.