

УДК 664.871:543.9

ГОЛУБЕЦ О. В., КИЩЕНКО В.А., ГОЛУБЕЦ Р.А, ТИМЧЕНКО В.К.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮТЕНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОГО
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

Наведені основні характеристики різних комерційних тест-систем для визначення вмісту глютену в харчових продуктах та продовольчій сировині методом твердофазного імуноферментного аналізу. Визначено вміст глютену у оброблених та необроблених харчових продуктах. Виявлені слідові кількості глютену в продуктах, які потенційно не містять глютен, що може свідчити про їх випадкову контамінацію. Обґрунтовано необхідність визначення глютену в харчових продуктах та продовольчій сировині.

Ключові слова: глютен, імуноферментний аналіз, маркування харчових продуктів.

Приведены основные характеристики различных коммерческих тест-систем для определения содержания глютена в пищевых продуктах и продовольственном сырье методом твердофазного иммуноферментного анализа. Определено содержание глютена в обработанных и необработанных пищевых продуктах. Выявлены следовые количества глютена в пищевых продуктах, потенциально не содержащих глютен, что может свидетельствовать об их случайной контаминации. Обоснована необходимость определения глютена в пищевых продуктах и продовольственном сырье.

Ключевые слова: глютен, иммуноферментный анализ, маркировка пищевых продуктов.

The basic characteristics of various commercial tests - systems for analysis of gluten content in foodstuff and food raw material by a method solid phase enzyme-link immunosorbent assay are given. Gluten content in the processed and untreated foodstuff is determined. The trace amount of gluten in foodstuff potentially gluten free was determined. The necessity of gluten analysis in foodstuff and food raw material is proved.

Key words: gluten, enzyme-link immunosorbent assay, food labeling.

Глютен представляет собой смесь растительных белков, содержащихся в семенах злаковых растений – пшеницы, ржи, овса, ячменя. Наибольшим содержанием глютена характеризуется зерно пшеницы. Измерение содержания глютена (клейковины) в муке используется для оценки ее качества и служит фактором, определяющим текстуру и форму хлебобулочных изделий.

В 50-х годах прошлого века было установлено связь между содержанием глютена в пищевых продуктах и целиакией – заболеванием тонкого кишечника, проявляющегося атрофией ворсинок. Благодаря кишечным ворсинкам происходит усвоение питательных веществ, поэтому их повреждение со временем может приводить к задержке развития или дефицитным состояниям. Развитие целиакии связано с генетически обусловленным аутоиммунным расстройством, при котором наблюдается неадекватная реакция иммунной системы на пищевой глютен [1].

Единственным эффективным методом лечения целиакии является строгая безглютеновая диета, соблюдение которой позволяет добиться уменьшения клинических проявлений и восстановления слизистой оболочки кишечника. Нарушение диеты приводит к обострению болезни и появлению тяжелых осложнений [2]. Сложность при этом заключается в том, что недостаточно просто исключить из рациона продукты,

потенциально содержащие глютен. Его могут использовать в качестве текстурирующей или влагоудерживающей добавки, кроме того, не исключена случайная контаминация в результате нарушения технологии производства и хранения зерна.

В соответствии с Регламентом Комиссии (ЕС) № 41/2009 от 20 января 2009 г. "О составе и маркировке пищевых продуктов, пригодных для людей с непереносимостью глютена", для людей, страдающих целиакией, специально производятся пищевые продукты, которые состоят или содержат один или больше ингредиентов, изготовленных из пшеницы, ржи, ячменя, овса, или их гибридных разновидностей с содержанием глютена в количестве, не превышающем 100 мг/кг, и маркируются как продукты "с очень низким содержанием глютена". Если содержание глютена в пищевом продукте не превышает 20 мг/кг, он маркируется как "не содержащий глютен (gluten-free)".

По данным Всемирной ассоциации гастроэнтерологов, опубликованным в 2005 году, распространенность целиакии во взрослой популяции большинства стран мира приблизительно одинакова и составляет около 1%. Данных о количестве людей с диагностированной целиакией в Украине на сегодняшний день нет. По данным сайта Украинского общества целиакии [3], возможное количество больных может достигать около 0,5 млн. Таким образом, исследование пищевых продуктов на содержание глютена является актуальной задачей.

Основными методами качественного и количественного определения глютена в пищевых продуктах являются иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Каждый из этих методов имеет свои достоинства и недостатки, однако в соответствии со стандартом CODEX STAN 118-1979 Объединенного комитета экспертов ФАО/ВОЗ комиссии Кодекс Алиментариус касательно специальных диетических пищевых продуктов, предназначенных для людей, страдающих непереносимостью глютена, в качестве референс-метода количественного определения глютена должен применяться иммуноферментный анализ. При этом предел обнаружения методики не должен превышать 10 мг/кг.

Наиболее часто для определения глютена используется т.н. "сэндвич"-вариант твердофазного ИФА. Для проведения анализа используется планшет, на дно лунок которого нанесены специфические антитела против глиадины. При добавлении стандартного раствора или растворов образцов, глиадин, содержащийся в этих образцах, специфически связывается с антителами в лунках планшета, формируя комплекс антиген-антитело. Если в растворе образца отсутствует глиадин, содержимое лунки вымывается во время промывки. На следующей стадии анализа в лунки добавляется конъюгат: антитела, соединенные с ферментом пероксидазой. Образуется т.н. "сэндвич" – комплекс антитело-антиген-антитело. Несвязавшийся конъюгат также удаляется во время промывки. Затем в лунки добавляются субстрат и хромоген, обеспечивающие окрашивание образовавшегося комплекса. После добавления стоп-раствора, обрывающего реакцию окрашивания, измеряется его оптическая плотность. При таком типе ИФА оптическая плотность прямо пропорциональна концентрации глиадины в образце.

Для определения глютена были предложены различные варианты антител, индуцированных к различным проламинам фракциям.

Проламины в зернах злаковых культур (глютенин и глиадин в зерне пшеницы, секалин в зерне ржи, гордеин в зерне ячменя) локализируются в эндосперме и являются основными запасами белка. Глютеновая фракция представлена белками из группы глиадинов и глютенинов размером от 30 до миллионов кДа [4]. Соотношение глиадины к глютенину составляет приблизительно 65 к 35 и может варьировать в зависимости от генетических факторов и условий окружающей среды [5].

Методом электрофореза в полиакриламидном геле глиадин можно разделить на α -, β -, γ -, и ω -фракции, которые отличаются между собой количеством цистеиновых остатков. Кроме того, методом электрофореза в полиакриламидном геле с добавлением натрия додецил сульфата глютенин пшеницы может быть разделен на высоко- и

низкомолекулярную фракции. В состав первой входят белки размером 90-120 кДа, второй – 30-70 кДа. Количество низкомолекулярной фракции в глютене в три раза превышает количество высокомолекулярной [6].

Основными требованиями к тест-системам являются их специфичность и селективность, т.е. способность детектировать только фракции глютена, не взаимодействуя с близкими им по природе зеином кукурузы, авенином овса и некоторыми протеинами риса.

Несколько первых коммерческих тест-систем было основано на использовании моноклональных антител против ω -глиаина, полученного из разновидности австралийской пшеницы [7]. Преимущество данного метода состояло в термостабильности ω -глиаина, что позволяло исследовать даже термически обработанные продукты. Однако точное количественное определение глютена при этом усложнялось в результате значительных колебаний ω -глиаиновой фракции в пшенице (от 6 до 20 %), кроме того, метод не обеспечивал достоверного определения проламинов ячменя [7]. Несмотря на это, антитела к ω -глиаину используются и в современных тест-системах.

Позже появились антитела против различных эпитопов α -глиаина: PN-3 [8], CDC5 [9], а также Abs [10] и R5 [11]. PN-3-антитела были разработаны против 19-мерного пептида α -глиаина и одинаково хорошо взаимодействовали как с глиаином, так и с гордеином, авенином и секалином, а также низкомолекулярными глютеиновыми субъединицами [8].

Антитела R5 были получены на экстракт ω -секалина и реагировали с глиаином, гордеином и секалином приблизительно в одинаковой степени, но не взаимодействовали с авенином [11]. Сэндвич-вариант ИФА, использующий антитела R5 в 2006 году был одобрен комиссией Кодекс Алиментариус для определения глютена. Исследовательским институтом Ассоциации официальных аналитических химиков (АОАК), проводившим независимые испытания тест-систем, была сертифицирована и валидирована тест-система RidaScreen® Gliadin, в работе которой были применены данные антитела.

В последнее время ведутся работы по созданию методов, основанных на применении антител к иммунотоксическим пептидам, участвующим в патогенезе целиакии. На таком принципе основан тест-набор AgraQuant® Gluten G12 (производитель RomerLabs®) [12].

Таким образом, несмотря на разнообразие моноклональных антител, разработанных для анализа глютена, метод ИФА, основанный на применении R5-антител, характеризуется высокой специфичностью и одобрен комиссией Кодекс Алиментариус для определения глютена в разнообразных пищевых продуктах.

Целью работы было проведение сравнительной оценки коммерческих тест-систем для определения глютена методом твердофазного ИФА и изучение возможности использования тест-систем Ridascreen® Gliadin и Ridascreen® Gliadin competitive производства R-Biopharm AG для определения глютена в потенциально глютенсодержащих и безглютеновых пищевых продуктах.

Материалы и методы. Для определения содержания глютена в крупе, кашах и молочных продуктах применялась тест-система Ridascreen® Gliadin, рекомендованная к использованию в официальном методе АОАК Official Method 991.19 и предназначенная для определения проламинов пшеницы (глиадин), ржи (секалин), ячменя (гордеин) в необработанных (мука, отруби) и обработанных продуктах (хлебобулочные изделия, мясные продукты, напитки). Работа тест-системы основана на принципе неконкурентного ИФА (“сэндвич-метод”) с использованием антител R5. Предел детектирования (LOD, limit of detection) глютена составляет 3 мг/кг, предел количественного определения – 5 мг/кг, что соответствует требованиям стандарта CODEX STAN 118-1979.

Массовую долю глютена в образцах крахмала, кваса, солода и пива определяли с помощью тест-системы Ridascreen® Gliadin competitive, разработанной специально для

анализа продуктов, подвергавшихся процессам ферментации и гидролиза. В основе работы тест-системы лежит конкурентный ИФА.

В лунки планшета, содержащие глиадин, вносят стандартные растворы образцов и конъюгат (моноклональные антитела против глиадина, связанные с пероксидазой). Свободный и связанный глиадин конкурируют за связывание со специфическими антителами. Не связанный в процессе реакции конъюгат удаляется во время промывки. Дальнейшие стадии реакции включают добавление субстрата и хромогена и измерение оптической плотности раствора. При этом оптическая плотность обратно пропорциональна концентрации глиадина в образце

Предел детектирования глиадина составляет 1,36 мг/кг, предел количественного определения – 5 мг/кг.

Контроль качества тест-систем проводился на основании сравнения оптической плотности растворов в лунках со стандартами спецификациям производителя.

Экстракция глиадина из образцов проводилась в соответствии с инструкциями производителя тест-систем.

Для регистрации результатов анализа использовали иммуноферментный анализатор Sunrise™ (Tecan™) с программным обеспечением Magellan, оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 450 нм. Массовая доля глютена в образцах определялась с помощью калибровочных кривых, построенных по результатам измерений оптической плотности в лунках со стандартными растворами.

Результаты и их обсуждение. Основные характеристики тест-систем для определения содержания глютена в пищевых продуктах методом ИФА приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Коммерческие тест-системы для анализа глютена в пищевых продуктах методом ИФА

Производитель	Название тест-системы	Область применения	LOD глютена, мг/кг	Вид определения	Используемые антитела
BioControl Systems Inc. [13]	Transia® Plate Prolamin	Пищевые продукты	3	Количественное	R5
	Transia® Plate Gluten	Пищевые продукты	10	Количественное	R5
Elisa Systems [14]	Gliadin	Обработанные и необработанные пищевые продукты, объекты окружающей среды	5	Количественное	Антитела к ω-фракции глиадина
Neogen® Corporation [15]	Alert for Gliadin	Обработанные и необработанные пищевые продукты, объекты окружающей среды	20	Качественное	—
	Alert for Gliadin R5		20	Качественное	—
	BioKits Gluten Assay Kit		1	Количественное	—
	Veratox for Gliadin		10	Количественное	—
	Veratox for Gliadin R5		5	Количественное	R5
INGENASA [16]	INGEZIM Gluten	Пищевые продукты	3	Количественное	R5
R-Biopharm AG [17]	RIDASCREEN® Gliadin	Обработанные и необработанные пищевые продукты	3	Количественное	R5
	RIDASCREEN®FAST Gliadin	Пищевые продукты, подвергавшиеся ферментации и гидролизу	4	Количественное	R5
	RIDASCREEN® Gliadin competitive	Пищевые продукты, подвергавшиеся ферментации и гидролизу	2,7	Количественное	R5
Romer Labs Inc. [18]	AgraQuant® ELISA Gluten G12	Пищевые продукты	4	Количественное	G12

Как видно из таблицы 1, на современном рынке представлены тест-системы как для качественного, так и для количественного определения глютена в пищевых продуктах и объектах окружающей среды. В большинстве из них основным компонентом иммунологической реакции являются моноклональные антитела R5, использование которых рекомендовано Стандартом CODEX STAN 118-1979 в качестве референс-метода при определении глютена. Предел детектирования всех тест-систем для количественного определения, приведенных в таблице 1, также отвечает требованиям данного стандарта и не превышает 10 мг/кг.

Специальная тест-система для продуктов, подвергавшихся ферментации или гидролизу, разработана специалистами фирмы R-Biopharm AG. Необходимость ее применения обусловлена тем, что молекулы глиаина в ферментированных продуктах частично или полностью разрушаются на мелкие пептидные фрагменты. Однако для людей, больных целиакией, эти фрагменты представляют опасность так же, как и интактная молекула глиаина.

Содержание глютена в исследованных продуктах приведено в таблице 2. Исследованные продукты не были маркированы как “безглютеновые” или “с низким содержанием глютена”.

Таблица 2.

Результаты определения глютена в пищевых продуктах методом ИФА

№ п/п	Наименование продукта	Содержание глютена, мг/кг
1	Детская молочная смесь с рисовой мукой	менее 5
2	Каша сухая безмолочная кукурузная быстрорастворимая для детского питания	менее 5
3	Каша сухая безмолочная злаково-йогуртная	более 80
4	Крупа манная, образец № 1	более 80
5	Крупа манная, образец № 2	более 80
6	Крупа манная, образец № 3	более 80
7	Крупа манная, образец № 4	более 80
8	Крупа манная, образец № 5	более 80
9	Зерно пшеницы	более 80
10	Зерно ячменя	более 80
11	Мука гречневая	39
12	Овсяные хлопья, образец № 1	6
13	Овсяные хлопья, образец № 2	7
14	Овсяные хлопья, образец № 3	более 80
15	Паста сырковая	менее 5
16	Сыр кисломолочный	менее 5
17	Пиво, образец № 1	более 80
18	Пиво, образец № 2	более 80
19	Пиво, образец № 3	более 80
20	Квас пастеризованный	37
21	Солод пшеничный	более 80
22	Солод ячменный	более 80
23	Крахмал картофельный	73

Из 23 исследованных образцов в 4 глютена не обнаружен (менее предела определения), в 5 содержится в количестве от 6 до 73 мг/кг, в 14 – в количестве более 80

мг/кг. Наибольшие количества глютена выявлены в продуктах, изготовленных из пшеницы и ячменя. Наличие глютена в гречневой муке и картофельном крахмале может свидетельствовать об их контаминации продуктами, содержащими глютен. В двух образцах овсяных хлопьев содержание глютена находилось в диапазоне 6-7 мг/кг, в третьем образце превышало 80 мг/кг. Согласно рекомендаций Стандарта CODEX STAN 118-1979 овес относится к злакам, употребление которых запрещено больным целиакией. Однако оговаривается, что разрешается использование овса и продуктов из него в составе безглютеновых диет при условии, что эти продукты не загрязнены пшеницей, рожью и ячменём. В связи с этим актуальным вопросом является обеспечение людей, страдающих непереносимостью глютена, продуктами, изготовленными из т.н. “чистого овса”. “Чистый овес” должен выращиваться с соблюдением определенных требований: производитель должен контролировать чистоту семян, удалять с поля посторонние зерновые культуры и обеспечить условия, предотвращающие контаминацию продукции семенами других злаков при производстве, хранении и переработке. В 90-х годах прошлого века было доказано, что употребление в пищу продуктов из овса не вызывает клинических проявлений целиакии, что послужило основанием для разрешения к употреблению продуктов из “чистого овса” обществами целиакии ряда европейских стран [19]. К сожалению, проведенные исследования показали, что в настоящее время в Украине качество продукции, производимой из овса, нестабильно и наряду с продуктами, свободными от глютена, на рынке присутствуют и овсяные хлопья, содержащие его в значительном количестве.

Выводы. Тест-системы Ridascreen® Gliadin и Ridascreen® Gliadin competitive могут быть использованы для определения уровня глютена как в необработанных пищевых продуктах, так и в продуктах, подвергавшихся ферментации и гидрогенизации (крахмал, солод, квас, пиво). Даже в потенциально не содержащих глютен пищевых продуктах были обнаружены его следовые количества, что может быть результатом случайной контаминации. Из трех образцов овсяных хлопьев в одном было обнаружено содержание глютена более 80 мг/кг, что, вероятно, также объясняется контаминацией в процессе производства или хранения. В целом, проведенные исследования свидетельствуют о необходимости постоянного лабораторного контроля содержания глютена в продуктах питания, присутствующих на рынке Украины и их соответствующей маркировки.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Parnell N. D. J.** Review article: coeliac disease and its management / N.D.J. Parnell, P. J. Ciclitira // *Aliment Pharmacol Ther.*— 1999.—Vol. 13(1).—P.1-13.
2. **Горгун Ю.В./** Диагностика и лечение целиакии. Учебно-методическое пособие / Ю.В.Горгун, А.С.Портянко, Ю.Х.Мараховский.— Минск: 2006.—35 с.
3. **Сироштан А.** Целиакия – проблема, которую в одиночку не решить [Электронный ресурс] // Украинское общество целиакии : [сайт]. — Режим доступа : <http://www.celiac-ukraine.com/stati-o-tseliakii/tseliakiya-problema-kotoruiu-v-odinochku-ne-reshit/>—Загл. с экрана.
4. **Shewry P.R.** The major seed storage proteins of spelt wheat, sorghum, millets and pseudocereals / *Pseudocereals and Less Common Cereals Grain Properties and Utilization Potential* / Ed. S.Peter, J.R. Belton, N. Taylor.— Springer, 2002.— P. 1-24.
5. **Johansson E.** Influence of nitrogen application rate and timing on grain protein composition and gluten strength in Swedish wheat cultivars / E.Johansson, M. L. Prieto-Lindel, G. Svensson // *Journal of Plant Nutrition and Soil Science.*—2004.—Vol. 167, Issue 3.—P. 345–350.

6. **Gianibelli M.C.** Biochemical, genetic, and molecular characterization of cheat glutenin and Its component subunits / M. C. Gianibelli, O. R. Larroque, F. MacRitchie [et al.] // *Cereal Chemistry*.—2001.—Vol. 78, Number 6.—P.635-646.
7. **Skerritt J.H.** Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study / J.H. Skerritt, A.S. Hill // *Journal Association of Official Analytical Chemists*.—1991.—Vol.74, No.2.— P.257-264.
8. **Ellis H.J.** Measurement of gluten using a monoclonal antibody to a celiac toxic peptide of A-gliadin / H.J.Ellis, S. Rosen-Bronson, N. O'Reilly [et al.] // *Gut*.—1998.—Vol.43, No.2.—P.190-195.
9. **Nassef H.M.** Electrochemical immunosensor for detection of celiac disease toxic gliadin in foodstuff / H.M.Nassef, Bermudo, M.C.Redondo [et al.] // *Analytical Chemistry*—2008.—Vol.80, No.23.—P.9265-9271.
10. **Mitea C.** Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease / C.Mitea, R.Havenaar, J.W.Drijfhout [et al.] // *Gut*.—2008.—Vol.57, No.1.—P.25-32.
11. **Valdés I.** Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol / I.Valdés, E.García, M.Llorente [et al.] // *European Journal Gastroenterology&Hepatology*.—2003.—Vol.15, No.5.—P.465–474.
12. Romer Labs: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.romerlabs.com/ru/knowledge/gluten/> – Загл. с экрана.
13. BioControlSystem: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://biocontrolsys.com/products/target/other/#prolamins>.– Загл. с экрана.
14. Elisa Systems: [Электронный ресурс].– Режим доступа: http://www.elisas.com.au/allergens/allergen_11/index.htm. – Загл. с экрана.
15. Neogen Corporation: [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.neogen.com/FoodSafety/FS_FA_Index/html.– Загл. с экрана.
16. INGENASA: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ingenasa.eu/index.php?enf=Residuos de gluten en alimentos y muestras ambientales&nm=alergenos>.– Загл. с экрана.
17. r-Biopharm AG: [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.html>– Загл. с экрана.
18. Romer Labs: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.romerlabs.com/ru/products/glutengliadin/> – Загл. с экрана.
19. Можно ли употреблять овес больным целиакией [Електронний ресурс] // Украинское общество целиакии : [сайт]. — Режим доступа : <http://www.celiac-ukraine.com/stati-otseliakii/mozhno-li-upotrebyat-oves-bolnim-tseliakiey>—Загл. с экрана.

*Науково-дослідний центр випробувань продукції ДП “Укрметртестстандарт”, м. Київ
Кафедра технології жирів та продуктів бродіння НТУ “ХПІ”, м. Харків*

*Надійшло до редакції
05.12.2013*