

INVLOED VAN EIWITBESTANDDELEN DER TARWE
OP DE VETRESORPTIE BIJ DARMPATIËNTEN

CENTRALE LANDBOUWCATALOGUS



0000 0092 6523

Dit proefschrift met stellingen van

JOHANNES HENDRIK VAN ROON,

landbouwkundig ingenieur, geboren te Rotterdam,
31 juli 1928, is goedgekeurd door de promotor,
Dr. C. den Hartog, hoogleraar in de leer van de
voeding en de voedselbereiding.

De Rector Magnificus
der Landbouwhogeschool

W. F. Eijvoogel.

Wageningen, 22 mei 1963.

NN 8201,350

~~no 350~~

C

INVLOED VAN EIWITBESTANDDELEN DER TARWE
OP DE VETRESORPTIE BIJ DARMPATIENTEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD
VAN DOCTOR IN DE LANDBOUWKUNDE
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS,
IR. W. F. EIJSVOOGEL,
HOGLERAAR IN DE HYDRAULICA, DE BEVLOEIING,
DE WEG- EN WATERBOUWKUNDE EN DE
BOSBOUWARCHITECTUUR,
TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN
VAN EEN COMMISSIE UIT DE SENAAT
VAN DE LANDBOUWHOGESCHOOL TE WAGENINGEN
OP VRIJDAG 28 JUNI 1963 TE 16.00 UUR

DOOR

J. H. VAN ROON

DRUKKERIJ „TRIO HILLEGERSBERG” — ROTTERDAM — 1963

1511 = 104522.03

BIBLIOTHEEK
DER
LANDBOUWHOGESCHOOL
WAGENINGEN

STELLINGEN

I

De waarneming van Krainick dat door verhitting gedenatureerde gliadine bij lijders aan coeliakie geen toxische werking heeft is onjuist.

H. G. Krainick, Deut. Med. Woch. Schr. 83, 1609 (1958).

II

Een combinatie van analyse-methodieken, zoals de door Woychik toegepaste ionenwisseling met carboxy-methyl-cellulose en de door Jones gebruikte vrije elektroforese, levert resultaten, die de argumentatie omtrent de heterogeniteit van de gliadine versterken.

J. H. Woychik et al., Arch. Biochem. Biophys 91, 235 (1960).

R. W. Jones et al., Arch. Biochem. Biophys. 84, 363 (1959).

III

De resultaten van een enzymanalyse, waarbij van kleuringsmethoden gebruik wordt gemaakt, dienen voorzichtig gehanteerd te worden.

Ann. Rev. Med. 1961, pag. 43, 49.

IV

Voor een beter inzicht in het verloop van de eiwitafbraak bij de kaasrijping is het van belang dat, naast de enzymatische afbraak van α -caseïne en β -caseïne, ook de enzymatische afbraak van subcomponenten dezer caseïne-fracties, zoals Wake en Baldwin ze met zetmeelgel-elektroforese hebben aangetoond, wordt bestudeerd.

R. G. Wake, R. L. Baldwin, Biochem. et Biophys. Acta 47, 225 (1961.)

V

Onderzoek van het membraan van het melkvetbolletje kan een bijdrage leveren bij de bestudering van de stabiliteit van emulsies. Het is te betreuren dat Voyntskii in zijn verhandeling over de oorzaak van de stabiliteit van emulsies geen aandacht wijdt aan de rol van dit melkvetbolmembraan.

S. S. Voyntskii, Russ. Chem. Revs. 30, 556 (1961).

VI

De opvatting van Hartley en Waugh dat een natief eiwit uit een grote verscheidenheid van moleculen bestaat, mogelijk identiek in hun primaire structuur, doch verschillend in secundaire of tertiaire structuur is minder waarschijnlijk.

R. W. Hartley, D. F. Waugh, J. Am. Chem. Soc. 82, 978 (1960).

VII

Noblitt et al. geven onvoldoende bewijs dat de door hen in voedingsproeven met koeien en vaarzen van het Holsteinse veeslag geconstateerde verschillen tussen de vertering van het voedsel in de „voorperiode” en in de „proefperiode” door „stress” veroorzaakt werden.

C. G. Noblitt et al., J. Dairy Sci. 46, 67 (1963).

VIII

Bij het leggen van verband tussen biologische proeven met proefdieren als ratten, muizen, caviae etc., en de stofwisseling van de mens, is het van belang te letten op verschillen in enzympatroon in organen tussen deze proefdieren en de mens.

S. L. Bonting et al., Science 127, 1342 (1958).

IX

In levensmiddelen voorkomende coli-achtige micro-organismen worden soms „faecale verklikkers” genoemd. Deze betiteling is misleidend.

M. Frobisher Fundamentals of bacteriology (W. B. Saunders Cy; 1950), 661.

R. Buttiaux, D. A. A. Mossel, J. Appl. Bacteriol. XXIV (1961), 360.

Proefschrift van: J. H. VAN ROON,
Wageningen, 28 juni 1963.

WOORD VOORAF

Op deze plaats wil ik gaarne allen, die tot mijn academische vorming hebben bijgedragen, mijn oprechte dank betuigen.

Hooggeleerde Brouwer, Hooggeleerde Hartmans, Hooggeleerde den Hertog en Hooggeleerde Mulder, ik dank U zeer voor alles wat ik op colleges en practica, maar ook in persoonlijk contact, van U heb mogen leren.

De nagedachtenis van wijlen Prof. Dr. J. Smit zal door mij steeds in ere worden gehouden om zijn persoon en om de wijze waarop hij de microbiologie op colleges en in gesprekken voor mij deed leven. Het was mij een voorrecht gedurende enige tijd één zijner assistenten te hebben mogen zijn.

Zeergeleerde de Graaff, ik dank U hartelijk voor de vriendschappelijke gezindheid die U, als mijn rechtstreekse chef, mij steeds hebt betoond in de periode van mijn practicum-assistentschap op het laboratorium voor Organische Chemie te Wageningen. Uw met mij gevoerde gesprekken over de natuurwetenschap hebben mijn verdere interesses richting gegeven.

Hooggeleerde Veldstra, ik dank U voor de colleges in de Biochemie die ik, na als landbouwkundig ingenieur te zijn afgestudeerd, gedurende 3 jaar te Leiden mocht volgen en voor de welwillendheid die U mij betoond hebt.

Ook allen die hebben bijgedragen tot de voltooiing van dit proefschrift ben ik veel dank verschuldigd.

Hooggeleerde den Hartog, Hooggewaardeerde promotor, ik ben U zeer erkentelijk dat U mijn promotor hebt willen zijn. Ook dank ik U voor de belangstelling, die U regelmatig in mijn werk hebt getoond.

U, Zeergeleerde Haex, ben ik erkentelijk dat U mij in de gelegenheid stelde op dit onderzoek, dat voor een belangrijk deel op de afdeling Gastro-enterologie van de Interne Kliniek van het Academisch Ziekenhuis te Leiden werd uitgevoerd, te promoveren.

U, Hooggeleerde Boekenoogen en Zeergeleerde Boldingh, directeurs van het Unilever Research Laboratorium te Vlaardingen, dank ik dat U mij in de gelegenheid stelde dit onderzoek af te ronden naast mijn werk op Uw laboratorium.

Zeergeleerde van de Kamer, hartelijk dank dat U die een zo grote ervaring hebt met het coeliakie-onderzoek dit manuscript wilde doorlezen. Van Uw opmerkingen maakte ik gaarne gebruik.

Zonder de toegewijde hulp van mijn medewerkers, zowel van die op het laboratorium voor Gastro-enterologie te Leiden als van de heren C. Dorsman en J. H. van Brouwershaven, werkzaam aan het Unilever Research Laboratorium te Vlaardingen, zou dit proefschrift niet tot stand zijn gekomen.

Ik dank de heer Ir. W. F. van Gils voor het kritische doorlezen van het manuscript. Tenslotte gaat mijn dank uit naar de heren J. P. de Mey en D. Groenewoudt, die de tekeningen hebben vervaardigd, en naar hen die bij de afwerking van het manuscript hebben medegeholpen.

INHOUDSOPGAVE

	Pagina
ALGEMENE INLEIDING	10
HOOFDSTUK I: LITERATUURBESCHOUWING OVER DE GLUTEN-EIWITTEN UIT TARWE	11
1. Het klassieke glutenonderzoek	11
2. Nader onderzoek over de gliadine	13
3. Splitsing van tarwe-eiwit in „Zwickelprotein” en „Haftprotein”	14
4. Het onderzoek van Rohrllich et al.	15
5. Recent onderzoek met elektroforese en ionen-uitwisselaars	18
6. Conclusie	22
HOOFDSTUK II: LITERATUURBESCHOUWING OVER COELIAKIE EN IDIOPATHISCHE STEATORRHOE	24
1. Beschrijving der coeliakie	24
2. Beschrijving der idiopathische steatorrhoe	24
3. Tropische spruw	24
4. Afbakening der nomenclatuur	25
5. Het onderzoek van Dicke	25
6. Voortgezet onderzoek over coeliakie	26
7. De polypeptide-hypothese	27
7.1. Onderzoek naar polypeptiden in bloed-serum	28
8. Onderzoek over idiopathische steatorrhoe	29
HOOFDSTUK III: PROBLEEMSTELLING EN VERMELDING VAN RESULTATEN	32
1. Inleiding	32
2. De te gebruiken testmethode	33
3. Resultaten van het eerste gedeelte van het onderzoek	35
4. De disulfidebindingen in tarwe-gluten	35

HOOFDSTUK IV : BEREIDING DER TARWE-EIWITFRACTIES	39
1. De bereiding van gliadine	39
2. De enzymatische afbraak van gliadine	39
3. Isolering der zure peptiden	41
4. Bereiding van geoxideerde zure peptiden	43
5. Analyse der zure peptide-fractie (tarwe-eiwit- fractie IV)	48
5.1. Opzet van het onderzoek, resultaten en discussie	49
5.2. Experimenteel gedeelte	51
5.2.1. De bereiding der fracties in het aanvul- lende onderzoek	51
5.2.2. Papierelektroforese	51
5.2.3. Zetmeel-gel-elektroforese	52
5.2.4. Ketenlengtebepaling	52
5.2.5. Bepaling van het gehalte van cystine + cysteïne	53
5.2.6. Gel-filtratie met Sephadex	54
HOOFDSTUK V : PATIENTEN TEST MET TARWE-EIWITFRACTIES	55
1. Inleiding	55
2. Het glutenvrije dieet	55
3. Het onderzoek der faeces	58
4. De bij de test toe te dienen hoeveelheid van de betreffende fractie	58
5. Het testen van tarwe-eiwitfractie III	59
6. Het testen van van tarwe-eiwitfractie II	60
7. De tweede test der tarwe-eiwitfractie II	61
8. Het testen der tarwe-eiwitfractie IV	61
9. Het testen der tarwe-eiwitfractie V	64
10. Het testen der tarwe-eiwitfractie VI	66
HOOFDSTUK VI : DISCUSSIE	69
Samenvatting	70
Summary	71
Zusammenfassung	71
Literatuuropgave	73

ALGEMENE INLEIDING

Tarwe is een kwantitatief en kwalitatief belangrijk broodgraan, dat zeer veel tot de voeding der mensheid heeft bijgedragen. In ons land wordt tarwe op ruime schaal verbouwd. Door de jongste opgravingen in het waterweggebied te Vlaardingen weten we dat tarwe in ons land reeds 2000 jaar voor Christus bij de toenmalige bewoners bekend was.

Dat tarwe in enkele uitzonderlijke gevallen een schadelijke werking kan hebben is voor het eerst aangetoond door Dicke ¹⁾, die constateerde dat weglaten van tarwe uit het dieet voor patiëntjes lijdende aan coeliakie een belangrijke verbetering in hun toestand teweeg bracht. Verschillende groepen onderzoekers hebben sedertdien getracht een beter inzicht te krijgen over de oorzaak van de ongunstige werking der tarwe bij deze patiënten.

Nadat Van de Kamer, Weijers en Dicke ²⁾ hadden vastgesteld dat de schadelijke werking aan het tarwe-eiwit toegeschreven moet worden, is ons toegenomen inzicht betreffende de rol die de tarwe bij deze ziekte speelt nauw verbonden met de toename van de kennis van de structuur der tarwe-eiwitten.

In Hoofdstuk I wordt een beschouwing gegeven over de samenstelling van het in water onoplosbare deel van het tarwe-eiwit, waarover nog geen definitieve klaarheid bestaat. Desondanks is met technieken als ionen-uitwisseling, zetmeel-gel-elektroforese en röntgendiffractiemeting onze kennis juist de laatste twee jaar belangrijk toegenomen.

Hoewel verschillende groepen van onderzoekers na Van de Kamer c.s. de invloed van tarwe-eiwit op de coeliakie onderzocht hebben, is dezelfde methode van onderzoek, n.l. het opsplitsen van het tarwe-eiwit in fracties, nog niet gevolgd bij de idiopathische steatorrhoe (een tweede darmziekte, die echter in afwijking van de coeliakie bij volwassenen voorkomt).

Met de in het onderhavige proefschrift beschreven onderzoekingen werd getracht nadere gegevens te verkrijgen over dat deel van het tarwe-eiwit, dat schadelijk blijkt te zijn bij de idiopathische steatorrhoe.

Het verband tussen coeliakie en idiopathische steatorrhoe wordt in Hoofdstuk II besproken.

HOOFDSTUK I

LITERATUURBESCHOUWING OVER DE GLUTEN-EIWITTEN UIT TARWE.

1. Het klassieke glutenonderzoek.

In tarwe komt 9 à 10% eiwit voor, dat als volgt kan worden onderverdeeld ³⁾:

- 4—4,5% gliadine
- 4% glutenine
- 0,6—0,7% globuline
- 0,3% albumine
- 0,3% proteose

Het is niet zeker dat de proteose in de tarwekorrel voorkomt. De mogelijkheid bestaat dat deze component tijdens het isoleren der eiwitten gevormd wordt.

Bij het uitwassen van tarwemeel met water ontstaat de gluten. Beccari ⁴⁾ beschreef deze werkwijze voor het eerst. De droge stof der gluten ⁵⁾ bestaat ten dele uit : 75—80% eiwit, 5—15% sacchariden en polysacchariden (meest zetmeel) en 5—10% vet. Enige zouten, enig cholesterol en lecithine komen er in voor. Grosskreutz ⁶⁾ wijst op het voorkomen van lipoproteïnen in de gluten. De in water onoplosbare eiwitten van de gluten zijn het gliadine en het glutenine. Beide eiwitten zijn uit het endosperm der tarwekorrel afkomstig ⁷⁾.

Ook in andere granen dan tarwe, b.v. rogge, gerst en haver, wordt een gluten gevonden, die eveneens gliadine en glutenine bevat, doch van een andere chemische structuur is ⁸⁾. De hoeveelheid gliadine en glutenine is bij de genoemde graansoorten verschillend ⁷⁾.

De gliadinen zijn gekenmerkt door hun oplosbaarheid in 50—90% ethanol ⁷⁾. Ze zijn onoplosbaar in zuivere ethanol en in water doch gaan in oplossing na toevoeging van zuur of loog. De gluteninen zijn onoplosbaar in water, ethanol en in neutrale zoutoplossingen. In loog zijn ze oplosbaar.

Osborne ⁹⁾ vermeldt dat Einhof reeds in 1805 met alcohol een eiwitachtige stof uit tarwemeel extraheerde. Einhof meende dat deze stof gelijk was aan de gluten volgen Beccari. Taddei (1820) ¹⁰⁾ vond dat gluten uit

twee stoffen bestaat, waarvan één oplosbaar in alcohol is en de naam gliadine verkreeg. De in alcohol onoplosbare stof werd „zymon” genoemd. Osborne ⁹⁾ noemt Boussingault (1838), Liebig (1841) en Mulder (1844) onder degenen die onderzoek over de tarwe-eiwitten verrichtten. Dezelfde onderzoeker vond in de tarwekorrel vijf zeer duidelijk verschillende eiwitfracties. De fracties verschillen in samenstelling, in oplosbaarheid en in andere fysische eigenschappen. Hij kon niet uitmaken of deze vijf eiwitten alle chemisch gesproken individuen zijn of een mengsel van twee of meer verschillende stoffen. Het gelukte Osborne niet één dezer vijf componenten, n.l. gliadine, glutenine, albumine, globuline en de peptonfractie nog in twee of meer fracties te scheiden.

Guthrie ¹¹⁾ vond dat de waterbindende kracht van tarwegluten groter was wanneer deze meer glutenine en minder gliadine bevatte. „Sterke” bloemsoorten bevatten meer glutenine.

De aminozuursamenstelling van de tarwegluten volgens Jones c.s. ¹²⁾ is in de volgende tabel weergegeven.

TABEL 1

AMINOZUURSAMENSTELLING TARWEGLUTEN
(grammen/16 g totaal N)

Alanine	2,4	Methionine	1,8
Arginine	2,4	Phenylalanine	4,9
Asparaginezuur	2,9	Proline	13,7
Cystine	2,1	Serine	5,2
Glutaminezuur	37,3	Threonine	2,5
Glycine	3,1	Tryptofan	1,0
Histidine	2,2	Tyrosine	3,8
Isoleucine	4,0	Valine	4,1
Leucine	6,8	Ammonia	5,1
Lysine	1,2		

Bungenberg de Jong bestudeerde de fysische eigenschappen der gluten-eiwitten uitvoerig. Aanvankelijk meende hij dat de variaties in fysische eigenschappen, welke hij bij gluten van verschillende origine constateerde, niet veroorzaakt behoefden te zijn door chemische heterogeniteit van gliadine en glutenine ¹³⁾. Hoewel in latere publicaties ¹⁴⁾ de oorzaak van deze variaties in fysische eigenschappen allereerst aan variaties in de verhouding gliadine/glutenine werd toegeschreven, blijkt Bungenberg de

Jong in deze publicaties toch ook de uit de verdere ontwikkeling van analyse-technieken voortkomende mogelijkheden van belang te achten. „Zolang de organische chemie niet in staat is de verschillende chemische bestanddelen van een eiwitfractie exact te bepalen zijn wij gedwongen de fysische eigenschappen der gehele groep eiwitten te bestuderen”.

Nader onderzoek over de gliadine

Schwert c.s.¹⁵⁾ slaagde erin met behulp van kolom-elektroforese aan te tonen dat gliadine geen homogeen eiwit is. Reeds enkele andere onderzoekers hadden hiervoor aanwijzingen gevonden. Schwert loste de gliadine op in acetaatbuffers bij pH $3,8 \pm 0,1$. Bij deze pH werd de beste oplosbaarheid verkregen. Bij een ionensterkte van 0,01 werd een scheiding verkregen in 4 componenten. Bij verschillende gliadinepreparaten werden onderling kleine verschillen waargenomen. Het I.E.P. van de langzaamlopende fractie lag bij omstreeks pH 5, van de snellopende fractie bij omstreeks pH 7. Schwert was niet in staat deze fracties op preparatieve schaal te verkrijgen. Hij constateerde dat er een neiging bestond tot complexvorming tussen de fracties.

Blish⁵⁾ vatte in 1945 de stand van zaken aldus samen :

1. Gluteneiwit is bepaald inhomogeen en bestaat waarschijnlijk uit enkele, zo niet uit vele componenten in plaats van uit twee, zoals door Osborne gemeend werd.
2. De inhomogeniteit zou echter in aanzienlijke mate door complexvorming veroorzaakt kunnen worden in plaats van door talrijk voorkomende individuele componenten.
3. De oplosbaarheidseigenschappen van gluten veroorzaken bijzondere moeilijkheden en complicaties wanneer moderne fysisch-chemische technieken worden toegepast.
4. Een overtuigende oplossing van het probleem der glutenstructuur moet wachten op de ontdekking en toepassing van betere oplosmiddelen of geschiktere scheidingsmethoden.

Uit het overzicht van Blish blijkt, dat de technische moeilijkheden om tot nieuwe gegevens over de gluteneiwitten te komen vóór wereldoorlog II nog bijzonder groot waren. Door de verdere ontwikkeling van elektroforese-technieken, zowel vrije elektroforese als zône-elektroforese op dragers van cellulose, papier en zetmeel-gel, en door de mogelijkheid

ionenuitwisseling op gesynthetiseerde harsen en op andere gesynthetiseerde media uit te voeren, is de hoeveelheid informatie over de gluteneiwitten sedert 1945 belangrijk toegenomen.

Hoewel de slechte oplosbaarheid der gluteneiwitten een extra moeilijkheid is blijven vormen, zijn ook in dit opzicht vorderingen gemaakt.

3. Splitsing van tarwe-eiwit in „Zwickelprotein” en „Haftprotein”

Hess ¹⁶⁾ bestudeerde de samenstelling van de tarwekorrel. In de gemalen tarwekorrel nam Hess een aantal bestanddelen waar : 1. Endospermdeelen, 2. grote zetmeelkorrels, 3. kleine zetmeelkorrels, 4. vrij eiwit, 5. eiwit met zetmeelkorrels.

Het vrije eiwit blijkt in de tarwekorrel in door zetmeelkorrels overgelaten sikkelvormige ruimten te liggen en breekt hier bij het malen uit. Hess noemde dit eiwit „Zwickelprotein” (ZP). Het eiwit dat sterk met de zetmeelkorrels verbonden is, zodat het mechanisch hiervan niet te scheiden is, werd door Hess „Haftprotein” (HP) genoemd.

Vanwege de verschillen in soortelijk gewicht tussen zetmeel en eiwit slaagde Hess erin door middel van sedimentatie in een mengsel van benzeen-tetrachloorkoolstof, „Zwickel- en Haftprotein” van elkaar te scheiden, zonder dat deze met water in aanraking waren geweest.

Uit vergelijkend röntgenonderzoek van meel, „Zwickelprotein”, „Haftprotein”/zetmeel en gluten in droge en waterhoudende toestand concludeerden Hess en Hille ¹⁷⁾, dat bij de vorming van gluten door het Beccari-proces secundaire wijzigingen aan het tarwe-eiwit plaats vinden. Bij afwezigheid van water komen deze wijzigingen niet tot stand.

Beide componenten bevatten naast de fosphatide-vrije eiwitten, die de auteur „Grundproteine” noemt, verschillende lipoproteïnen met lecithine als vetgroep. Deze lipoproteïnen zijn door extractie met 96% alcohol bij 20°C te isoleren. Het blijkt, dat uit de „Zwickelprotein” en „Haftprotein” tezamen 4 x zoveel lipoproteïnen geëxtraheerd kunnen worden als uit Beccari-gluten. Door kneden met water zou denaturatie zijn opgetreden.

Bij voortgezet onderzoek ontwikkelde Hess ¹⁸⁾ een methode om „Zwickel- en Haftprotein” te scheiden zonder organische oplosmiddelen te gebruiken.

Tabel 2 geeft de aminozuursamenstelling van door Hess en Hille ¹⁷⁾ onderzochte fracties.

TABEL 2
AMINOZUURSAMENSTELLING (in %)

	„Zwickel- protein” (lipoidvrij)	„Haft- protein” (lipoidvrij)	Lipoproteïne uit ZP	Lipoproteïne uit HP
Cystine + cysteine als Cys SO ₃ H	0,71	1,10	—	—
Asparaginezuur	3,23	3,66	0,49	0,61
Threonine	2,09	2,30	0,23	0,43
Serine	5,02	4,99	0,34	0,62
Glutaminezuur	40,02	37,68	1,61	3,07
Proline	14,64	16,66	0,89	1,60
Glycine	2,04	2,28	0,27	0,43
Alanine	2,18	2,81	0,31	0,45
Cysteine	1,03	1,29	0,24	0,54
Valine	4,18	4,47	0,41	0,58
Isoleucine	3,40	3,83	0,27	0,41
Leucine	7,65	7,69	0,59	0,99
Tyrosine	2,79	2,78	0,20	0,35
Phenylalanine	5,78	5,93	0,33	0,56
Lysine	1,41	1,36	0,10	0,10
Histidine	1,83	1,98	1,33	0,15
Arginine	2,87	3,40	0,39	0,59

In het kader van het onderzoek is het belangrijk te weten hoe het „Zwickel- en Haftprotein” zich verhouden tot de Osborne tarwe-eiwitcomponenten, de gliadine, glutenine, albumine, globuline en de proteosefractie.

4. Het onderzoek van Rohrlich et al.

Rohrlich c.s.¹⁹⁾, ²⁰⁾ twijfelen op grond van bepaling van de N-eindstandige aminozuren en van reacties met natriumhypochloriet aan de verschillen in samenstelling tussen gliadine en glutenine. In een later commentaar op deze gegevens merken Rohrlich en Schulz²¹⁾ echter op, dat de geringe overeenstemming dezer resultaten met het werk van anderen het vermoeden doet rijzen, dat de methoden der eindgroepenbepaling niet zeer geschikt zijn voor de structuuropheldering der tarwe-eiwitten. Door dit commentaar wordt de bewijskracht van hun gegevens verminderd.

Bij papierchromatografisch onderzoek vonden Rohrlich c.s.²²⁾ geen verschil in aminozuursamenstelling tussen „Zwickel- en Haftprotein”, doch wel tussen de eiwitten van de aleuronlaag en van het endosperm.

Intussen verschilt de in de literatuur opgegeven aminozuursamenstelling van gliadine en glutenine wel degelijk zoals uit onderstaande tabel 3 blijkt.

TABEL 3

	Grammen aminozuur/100 gram eiwit	
	Tarwegliadine ²³⁾	Tarwegglutenine ²⁴⁾
Glycine	1,0	3,0
Alanine	2,1	3,8
Valine	2,7	5,5
Leucine	11,9	6,3
Isoleucine		7,0
Serine	4,9	3,7
Threonine	2,1	2,9
Cysteine	2,6	—
Cysteine (1/2)		3,6
Methionine	1,7	0,8
Phenylalanine	6,4	3,1
Tyrosine	3,2	5,4
Tryptofan	6,6	—
Proline	13,6	9,3
Asparaginezuur	1,3	5,1
Glutaminezuur	45,7	35,7
Lysine	0,7	0
Arginine	2,7	1,8
Histidine	1,8	4,5
Ammoniak	4,5	3,7

In november 1960 publiceerden Röhrlich en Schulz ²¹⁾ hun onderzoek over het verloop van de enzymatische afbraak van in water onoplosbare tarwe-eiwitten en de hierbij optredende peptiden. De auteurs zijn van mening dat twee hypothesen over de structuur van het tarwe-eiwit, speciaal van de gluten, op dat moment tegenover elkaar staan :

- I. De genoemde gegevens van Osborne en die van Hess, benevens de onderzoeken van Bilinski en Mc Connell ²⁵⁾, die met gemerkt koolstof de biosynthese van de tarweglutencomponenten bestudeerd hebben. Zij beschouwen allen de tarwegluten als bestaand uit enkele individuele eiwitten.
- II. De onderzoeken van Röhrlich c.s. ¹⁹⁾, ²⁰⁾, ²¹⁾ op grond waarvan Röhrlich het waarschijnlijk acht, dat tarwegluten uit één enkel eiwit bestaat. Dit eiwit zou dan door gebruik van verschillende oplosmiddelen en uiteenlopende scheidingsmethoden in een willekeurig aantal fracties gescheiden kunnen worden. De fracties zouden in ketenlengte of in chemische samenstelling kunnen uiteenlopen.

In hun onderzoek braken Rohrlich en Schulz gliadine, glutenine, „Zwickelprotein” en „Haftprotein” af door inwerking van kristallijn pepsine gedurende 24 uur bij 37,5°C. Na irreversibel denatureren van het enzym werd volgens Hirs, Moore en Stein over de ionenuitwisselaar Dowex 50-X2 gefractioneerd ²¹⁾.

Na kleuring met ninhydrine werd de extinctie gemeten. De aldus verkregen curve is in Fig. 1 weergegeven.

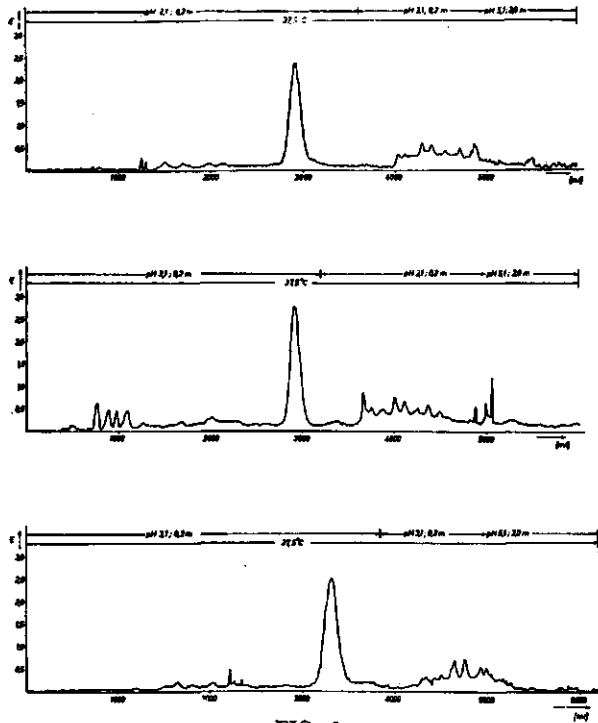


FIG. 1

Ionenuitwisseling van „Zwickelprotein” (boven), „Haftprotein” (midden) en gliadine (beneden), na afbraak gedurende 24 uur met pepsine volgens Rohrlich en Schulz ²¹⁾.

De auteurs wijzen op het hun inziens gelijksoortig verloop der curves. De aminozuursamenstelling van de in elk der drie curves voorkomende grote piek werd bepaald en bleek slechts kleine verschillen te vertonen, zoals uit onderstaande tabel blijkt.

Aminozuursamenstelling van de grote pieken uit Fig. 1

Gliadine	Glu ₈ , Pro ₇ , Asp _{0.5} , Thr, Ser _{0.5} , Phen, —, Leu ₂ , iLeu ₂ , Val, Gly
„Zwickelprotein”	Glu ₈ , Pro ₇ , Asp, Thr ₂ , Ser, Phen ₂ , —, Leu ₂ , iLeu ₂ , Val, Gly
„Haftprotein”	Glu ₈ , Pro ₈ , Asp, Thr ₂ , Ser, Phen, Ala, Leu ₂ , iLeu ₂ , Val, Gly ₂

De auteurs vonden dat bij de enzymatische afbraak peptiden tot een grootte van 32 aminozuren kunnen voorkomen. De conclusie dat de aminozuursamenstelling van de karakteristieke peptide-piek, die in de enzymatische afbraak der tarwe-eiwitten regelmatig terugkeert, aantoont dat de verschillende componenten van de tarwegluten „zumindest partiële Gleichartigkeit” vertonen, is mijns inziens te ver gaand. Zeker als de auteurs mededelen, dat de hoeveelheid zure, neutrale en basische peptiden der onderzochte tarwe-eiwitten sterk verschillen.

5. Recent onderzoek met elektroforese en ionenuitwisselaars.

Ook van andere zijde is het vraagstuk van de heterogeniteit van het tarwe-eiwit bestudeerd. Jones, Taylor en Senti¹²⁾ zochten bij hun werk waarbij zij Tiselius' elektroforese methode toepasten naar condities, waarbij symmetrische elektroforese-pieken verkregen werden. Dit is van belang daar symmetrische pieken beschouwd kunnen worden als bewijs, dat een enkelvoudige niet chemisch gebonden component aanwezig is¹⁵⁾. Op deze wijze kon het aantal componenten in de onderzochte monsters vastgesteld worden.

De spreiding in de geschikte elektroforese-condities bleek gering te zijn. Bij buffers van verschillende natrium-zouten werd het tarwe-eiwit onoplosbaar wanneer de ionen-sterkte de waarde 0,04 bereikte of wanneer de pH boven de waarde 4 steeg. De pieken werden asymmetrisch wanneer de eiwit-concentratie boven de 0,3% steeg. Een voor de verdere analyse der tarwe-eiwitten belangrijke ontdekking was de mogelijkheid de buffer aluminium-lactaat-melkzuur te gebruiken. In deze buffer met pH 3,1 kon een ionen-sterkte tot 0,1 toegepast worden. Een goede symmetrie der pieken werd hier nog verkregen met 0,8% gluten in de buffer.

Met deze techniek werd gluten van Ponca (harde „red winter” tarwe) in 5 componenten gescheiden in relatieve concentraties van 44, 22, 15, 16 en 3%. De piek met de concentratie van 15% bleek uit 2 componenten te bestaan.

Koenig²⁶⁾ bevestigde in een onderzoek, waarbij dezelfde methodiek gebruikt werd, de conclusie van Jones et al.¹²⁾. Behalve de zure buffer paste Koenig ook nog een alkalische buffer toe, welke een minder goede splitsing der glutencomponenten gaf dan de zure buffer.

Koenig en Kelley²⁷⁾ vergeleken, eveneens met vrije elektroforese, de samenstelling van de gluteneiwitten in de door Koenig²⁶⁾ toegepaste zure fosfaatbuffer (pH 3,0). Afhankelijk van de tarwesoort kregen zij 7 tot

11 pieken. Op grond van hun uitkomsten deelden zij de tarwesoorten in in drie typen, nl. „Hard Red” zomer-tarwe, „Hard Red” winter-tarwe en Durrum-tarwe.

Enkele onderzoekers maakten recent gebruik van papier-elektroforese voor onderzoek van tarwe-eiwit. Padmoyo ²⁸⁾ vergeleek tarwe-eiwitten met eiwitten van andere granen en van rijst. Deschreider ²⁹⁾ maakte bij zijn onderzoek met papier-elektroforese gebruik van een melkzure buffer volgens Custer en Zittle ³⁰⁾. Zentner ³¹⁾ scheidde de gluten met continue papier-elektroforese in 7 fracties.

Na ontdekking van cellulose-derivaten als carboxy-methyl-cellulose en di-ethyl amino-ethyl cellulose als ionenuitwisselaars werden ook deze voor de scheiding van tarwe-eiwitten gebruikt.

Woychik c.s. ³³⁾, ³²⁾ slaagden er in door ionenuitwisseling met carboxy-methyl-cellulose met een vloeistofgradient, opklimmend in H⁺ ionensterkte, een zestal eiwitfracties uit tarwegluten op preparatieve schaal te

TABEL 4
Grammen/16 g totaal N

	α_1	α_2	β	γ	ω	in water opl. fr.
Alanine	2,3	2,1	2,3	2,2	1,4	3,8
Arginine	2,9	3,1	2,0	1,8	1,2	6,1
Asparaginezuur	2,5	1,8	2,5	1,8	1,2	6,2
Cystine	1,4	1,8	1,9	2,2	1,3	4,0
Glutaminezuur	37,6	40,6	42,8	43,4	44,2	20,3
Glycine	5,0	4,3	1,5	1,9	2,0	3,9
Histidine	1,7	2,6	1,6	1,6	0,7	3,6
Isoleucine	3,1	4,3	4,5	4,3	2,2	3,8
Leucine	6,2	7,3	7,4	6,4	4,4	7,1
Lysine	1,3	0,8	0,7	0,7	0,7	4,1
Methionine	1,2	1,6	0,8	1,2	0,8	1,9
Phenylalanine	4,4	4,6	4,9	6,6	10,6	3,9
Proline	13,5	17,3	18,8	19,3	23,1	10,8
Serine	5,1	4,8	4,3	3,8	4,0	5,1
Threonine	2,8	2,6	2,7	2,1	2,4	2,6
Tryptofan	1,7	1,2	0,6	0,9	0,5	2,8
Tyrosine	4,1	2,8	2,8	1,7	2,5	3,9
Valine	3,6	4,2	4,6	3,7	2,5	6,1
Ammoniak	4,6	5,2	4,6	5,2	4,6	3,5

isoleren, α_1 , α_2 , β , γ , ω en „in wateroplosbare fractie” genaamd. Alle tevoren door Jones c.s.¹²⁾ met kolomelektroforese aangetoonde eiwitfracties uit gluten, behalve de α_1 -component, werden met deze methode verkregen. De α_1 -component werd met 8 M ureum geïsoleerd doch was hierna niet meer in oplossing te brengen. Het gedrag van de geïsoleerde gluteneiwitten bij her-chromatograferen maakte het waarschijnlijk dat het hier om zuivere eiwitten en niet om gevormde complexen gaat. Als elutievlloeistof werd gebruikt 0,006-0,030 N HCl (pH 3,40-1,50). De concentratie werd spectrofotometrisch bepaald bij 280 m μ .

Volgens Jones¹²⁾ omvat de α_1 -fractie 90% van de glutenine.

De aminozuursamenstelling³³⁾, van de geïsoleerde fracties, bepaald volgens Stein en Moore, geeft tabel 4.

Deze analyses geven geen groot verschil in aminozuur-samenstelling. Verschillen in moleculair gewicht of structuur zouden verantwoordelijk kunnen zijn voor de verschillen in fysische eigenschappen.

Jones c.s.³⁴⁾ bepaalden als moleculair gewicht voor de γ -fractie: 47.000. De 4 componenten van de β -fractie hebben alle een moleculair gewicht: 42.000; glutenine is volgens hen heterogeen en heeft een gemiddeld moleculair gewicht van 2 à 3 miljoen. Er komen echter ook kleinere moleculen (moleculair gewicht ca. 50.000) in voor.

Een minder goed resultaat kregen Coates en Simmonds³⁵⁾ bij pogingen tot ionenuitwisseling van tarwe-eiwit op di-ethyl-amino-ethyl-cellulose.

Woychik, Boundy en Dimler³⁶⁾,³⁷⁾ pasten voor het eerst de door Smithies³⁸⁾ ontdekte techniek van zône-elektroforese in zetmeel-gel bij de scheiding der tarwe-eiwitten toe. Zône-elektroforese heeft theoretische voordelen boven vrije of Tiselius elektroforese. De eerste bleek bij verschillende eiwitten³⁸⁾ bij gebruik van zetmeel-gel als drager de beste scheiding te geven. Woychik c.s. voerden de elektroforese in een 3 M ureum-oplossing uit.

Met de buffer aluminium-lactaat + 3 M ureum (pH 3,1) werden 9 componenten in gluten van Ponco-tarwe aangetoond (zie figuur 2); 4 hiervan waren tevoren met de Tiselius methode niet opgespoord.

Eén der componenten blijkt een zodanig hoog moleculair gewicht te hebben dat deze niet in zetmeel-gel loopt. Gliadine zou uit 8 componenten bestaan, terwijl glutenine identiek zou zijn met de hoger moleculaire α_1 -component uit totaal gluten.

Glutenine zou, hoewel elektroforetisch zuiver, uit verschillende componenten bestaan. Elke component zou een verschillend aantal gelijke

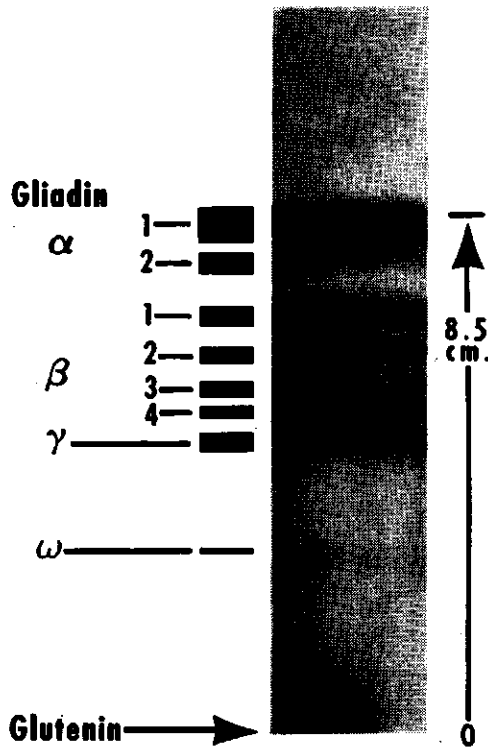


FIG. 2

Zetmeel-gel-elektroforese van tarwegluten volgens Woychik c.s.³⁶⁾.

basis-eenheden bevatten. (Dit laatste bevestigen Nielsen c.s.³⁹⁾ in een recent onderzoek; op deze opbouw zou volgens hen de elasticiteit van glutenine berusten).

Bij uitvoeren van de analyse zonder ureum waren alleen de banden α_1 , β_1 en γ duidelijk zichtbaar. De overige banden waren wel aanwezig doch uiterst vaag.

Elton en Ewart^{40), 41)} voerden een uitvoerige analyse uit, eveneens met zetmeel-gel-elektroforese, doch zonder ureum. Het eiwit van 8 verschillende tarwe-rassen, n.l. Wichita, Rescue, Conley, Bison, Svenno, Ring, Cappelle en Jufy werd onderzocht in de buffer aluminium-lactaat-melkzuur (pH 3,1). Het albumine en globuline patroon dezer rassen was gelijksoortig. Het patroon der gluteneiwitten vertoonde significante verschillen tussen de rassen. In totaal werden tot 20 banden verkregen, waarvan 8 zeer duidelijke banden.

Interessante bijzonderheden uit het werk dezer onderzoekers zijn,

dat de aanwezigheid van lipiden in het te analyseren materiaal geen invloed op de scheiding heeft. Ook verhitten van het eiwit tot 98,5°C veroorzaakt geen wijzigingen.

Zeer grote verschillen treden op tussen tarwe-, rogge-, gerst- en haver-eiwit.

Ook Coulson en Sim ⁴²⁾, ⁴³⁾ scheidde tarwe-eiwit in meer dan 20 componenten. Zij pasten eveneens zetmeel-gel-elektroforese in aluminium-lactaat-melkzure buffer van pH 3,1 toe. Ze gebruikten een lagere zetmeel-concentratie dan Elton en Ewart, ze verzadigden de buffer met Carbowax 20 M en kleurden de gel met Nigrosine.

Jones en Dimler ⁴⁴⁾ voerden zetmeel-gel-elektroforese en vrije elektroforese uit bij tarwebloem en bij de eiwitrijke en eiwitarme fracties van „hard red winter-“, „soft red winter-“ en „club-“ tarwe. Gluten van een bepaalde tarwebloem en van de eiwitrijke en eiwitarme fracties ervan bleek kwalitatief en kwantitatief gelijk te zijn. De verschillen tussen de rassen bleken significant te zijn. Jones en Dimler menen, dat eiwitrijke en eiwitarme fracties te vergelijken zijn met resp. „Zwickel-“ en „Haftprotein“ volgens Hess ¹⁶⁾. Zij concluderen, dat met zetmeel-gel-elektroforese en vrije elektroforese geen verschillen tussen „Zwickelprotein“ en „Haftprotein“ te constateren zijn. Wel is er een duidelijk onderscheid tussen de water oplosbare eiwitten der beide fracties.

Voorlopige resultaten van een analyse van tarwegluten met behulp van gel-elektroforese in polyacrylamide-gels werden door Lee ⁴⁵⁾ gepubliceerd. De splitsing der gluten vindt hier bij pH 8,6 en in 2 M ureum onder invloed van een potentiaal-verschil van 50 Volt/cm plaats. Kleuring geschiedt met Nigrosine. De splitsing verloopt snel, namelijk in 90 minuten, doch niet in meer componenten dan bij de zetmeel-gel-elektroforese.

6. Conclusie

Wanneer wij de gegevens vanaf pag. 18 overzien, kunnen wij concluderen dat door onderzoekers met verschillende elektroforetische methoden de heterogeniteit van de in water onoplosbare gluten-eiwitten is aangetoond. Het verschil tussen het eiwit van uiteenlopende tarwerassen bleek tot dusverre vooral in de gluten-eiwitten gelegen te zijn.

Het onderzoek van Jones en Dimler ⁴⁴⁾ zou de mening van Rohrllich en Schulz ²¹⁾ dat „Zwickelprotein“ en „Haftprotein“ geen verschillen vertonen bevestigen. Voor een definitief inzicht zullen verdere gegevens nodig zijn.

Met de ionenuitwisseling zijn tot dusverre weinig verschillen tussen de glutenfracties gevonden.

Wellicht zou een betere informatie verkregen worden wanneer de met ionenuitwisseling verkregen fracties op hun beurt met zetmeel-gel-elektroforese op identiteit onderzocht zouden worden.

Grosskreutz ⁴⁶⁾ tracht de controverse tussen homogeen of heterogeen tarwe-eiwit te overbruggen door op grond van röntgenonderzoek aan te nemen dat gliadine, hoewel het elektroforetisch in meerdere componenten te scheiden is, in oplossing als een enkel deeltje, een soort „super eiwit”, voorkomt.

Wellicht is verdere informatie over de heterogeniteit van tarwe-eiwit voor een deel afhankelijk van voortgezet röntgenonderzoek. Voorlopig verdient het mijns inziens aanbeveling met de heterogeniteit van de in water onoplosbare gluten-eiwitten rekening te houden.

HOOFDSTUK II
LITERATUURBESCHOUWING OVER COELIAKIE
EN IDIOPATHISCHE STEATORRHOE

1. Beschrijving der coeliakie

De coeliakie wordt door Gee ⁴⁷⁾ omschreven als „een soort chronische ontsteking der dunne darm, die bij personen van alle leeftijden voorkomt, echter speciaal bij kinderen tussen 1 en 5 jaar”. Een symptoom is het in sterke mate voorkomen van diarree. Gee noemt de oorzaak duister, wellicht een foutief dieet. Een onderzoek van de organen met het blote oog na overlijden gaf geen bijzonderheden: maag, darmen etc. werden normaal bevonden. Weijers, Dicke en Van de Kamer ⁴⁸⁾ hebben onlangs een uitvoerige omschrijving van het ziektebeeld gegeven waarin zij behalve op de vetontlasting wijzen op het voorkomen van infantilisme, opgezette buik en een afwijkende psychische toestand bij de patiëntjes.

2. Beschrijving der idiopathische steatorrhoe

De tweede in de titel genoemde ziekte, de idiopathische steatorrhoe (betekent letterlijk: „vetontlasting van eigen aard”) komt bij volwassen personen voor. Ze wordt in de U.S.A. „malabsorption syndrome” genoemd. Adlersberg ⁴⁹⁾ omschrijft deze ziekte als „een complexe stofwisselingsafwijking, die erfelijk wordt overgebracht”. Adlersberg wijst op een verminderde resorptie in de darm, op wijzigingen in het bloedbeeld en op andere afwijkingen, die niet met de eerstgenoemde in verband behoeven te staan. Volgens Adlersberg zijn genetisch beïnvloede storingen in enzymatische ketenreacties de oorzaak van onvoldoende resorptie in de darm. Komen hiervoor gevoelige personen in contact met belastende omstandigheden als verblijf in de tropen, de aanwezigheid van tarwe-gluten in het dieet of andere oorzaken, dan treden de symptomen der ziekte op. Volgens Adlersberg kan het „malabsorption syndrome” evenals andere „inborn errors of metabolism” in de jeugd voorkomen als coeliakie of op latere leeftijd als tropische of niet-tropische spruw. Veel van Adlersberg's patiënten met idiopathische steatorrhoe hadden in hun jeugd coeliakie.

3. Tropische spruw

De tropische spruw is een ziekte, die vaak met de coeliakie en de idiopathische steatorrhoe (of niet-tropische spruw) in verband gebracht wordt. Volgens Cooke ⁵⁰⁾ moet de tropische spruw echter als een geheel afzonderlijke ziekte worden beschouwd.

4. Afbakening der nomenclatuur

Om meer uniformiteit in de nomenclatuur van de in de titel genoemde ziekten te brengen, stelde Cooke voor, de idiopathische steatorrhoe in het vervolg „coeliakie bij volwassenen” te noemen. Ook Frazer⁵¹⁾ stelde reeds voor, deze beide ziekten samen te vatten als „gluten induced enteropathy”. Men gebruikt echter in ons land nog steeds de termen coeliakie en idiopathische steatorrhoe.

Alvorens nader op de verwantschap dezer beide ziekten in te gaan, dient te worden opgemerkt, dat de steatorrhoe een verschijnsel is, dat bij veel meer dan de hier genoemde ziekten voor kan komen. Zie hiervoor het overzicht van Paterson⁵²⁾ en Volwiler⁵³⁾. Een verdere bespreking valt buiten het bestek van dit proefschrift. Er wordt aangenomen, dat aan de coeliakie en de idiopathische steatorrhoe hetzelfde metabolische defect ten grondslag ligt. Frazer⁵¹⁾ noemt van deze ziekten de volgende gemeenschappelijke verschijnselen: verminderde resorptie van opgeloste voedingsstoffen en geëmulgeerde vetten, een verandering in het slijmvlies van de dunne darm, waarbij de darmvlokken afgeknot zijn en een gewijzigde peristaltiek van de darm.

5. Het onderzoek van Dicke

Een van de interessante kanten is, dat hoewel de ziekte te wijten is aan bestanddelen uit de normale voeding de frequentie van de beschreven ziekten relatief niet hoog is (in Nederland naar schatting een paar duizend gevallen).

Reeds Gee⁴⁷⁾ sprak hier veronderstellenderwijs over. Later is door het onderzoek van Dicke¹⁾ gebleken, dat de patiënt, wanneer hij tarwe of rogge consumeert, heftig ziek wordt en dat de ontlasting van deze patiënten een grote hoeveelheid vet en vetzuren bevat. Er wordt een hoog percentage niet-geresorbeerd vet gevonden waaronder verstaan wordt⁵⁴⁾:

$$100 - \left[\frac{\text{aantal g voedingsvet} - \text{aantal g vet in ontlasting}}{\text{aantal g voedingsvet}} \times 100 \right] \%$$

Het blijkt dat het percentage niet-geresorbeerd vet als kwantitatieve typering der ziekte kan dienen. De bepaling van het percentage niet-geresorbeerd vet in de ontlasting geschiedt volgens de methode van Van de Kamer⁵⁵⁾.

Baanbrekend onderzoek werd door Dicke¹⁾ verricht.

Hij beschrijft hoe hij bij coeliakie-patiënten regelmatig de ongunstige invloed van voedingsmiddelen als brood, beschuit en meelspijzen kon

waarnemen. Hierdoor ontstond in de loop der jaren bij Dicke de overtuiging, dat deze waarnemingen niet toevallig golden voor een bepaald individu, maar dat deze essentieel waren voor de coeliakie. Beschuit, tarwebloem en waarschijnlijk roggebloem, maar vooral brood vertoonde de ongunstige werking sterk, terwijl maizena, rijstbloem en aardappelen juist goed verdragen werden. Dicke constateerde verder :

- a) het vervangen van bepaalde meelsoorten, als tarwe en rogge, in het dagelijks dieet verbetert de toestand, hetgeen zich uit in het terugkeren van de eetlust, het verbeteren van het humeur, het aankomen in gewicht, het herstel van de lengtegroei en het meer normaal worden van de ontlasting ;
- b) acute aanvallen van diarrhee met plotselinge levensgevaarlijke toestanden blijven uit indien de genoemde meelsoorten niet gegeven worden ;
- c) na kortere of langere latente tijd treden verergeringen en acute aanvallen van diarrhee op indien de gewraakte meelsoorten te vroeg aan het dieet toegevoegd worden.

Uit de uitvoerige en grondige wijze waarop Dicke vervolgens ingaat op de samenstelling van het aan de patiënten toe te dienen proefdieet, blijkt duidelijk de grote waarde welke Dicke aan de dieet-samenstelling hecht. Op grond van zijn balansproeven zegt Dicke, dat de hoeveelheid ontlasting en de verlaging van de vetresorptie-coëfficiënt niet bij elke proefneming even sterk optreden. Bij eenzelfde hoeveelheid meel, in verschillende perioden aan een patiënt gegeven, wisselt dit effect. Dicke verklaart dit door verband te leggen met spontane verbeteringen en verergeringen in de klinische toestand van de patiënt. Proefperioden die ver uit elkaar liggen, mogen niet zonder meer onderling vergeleken worden. Ook wijst Dicke op de z.g. latente periode, welke optreedt alvorens de verschijnselen beginnen en ophouden.

Dicke ¹⁾ concludeert uit zijn proeven dat, indien tarwe en rogge niet zouden bestaan, er misschien geen coeliakie tot ontwikkeling zou komen. In tegenstelling tot de toenmalige heersende opvatting ⁵⁶⁾, ⁵⁷⁾, ⁵⁸⁾ bewijst Dicke ¹⁾ dat tarwezetmeel onschadelijk is. Anderson et al. ⁵⁹⁾ bevestigden de toxische werking van tarwemeel en tarwegluten en de onschadelijkheid van tarwezetmeel.

6. Voortgezet onderzoek over coeliakie

Bij voortgezet onderzoek toonden Van de Kamer, Weijers en Dicke ²⁾ aan, dat de schadelijke werking van tarwemeel voornamelijk in de

gliadine-fractie gelokaliseerd is. De geëxtraheerde fosfolipide fractie uit tarwegluten bleek volgens Alvey c.s. ⁶⁰⁾ onschadelijk te zijn.

Anderson en Langford ⁶¹⁾ hebben een uitvoerig onderzoek gedaan bij coeliakie-patiëntjes en vonden geen afwijkingen in de bacterieflora van de dunne darm.

De genetische beïnvloeding van coeliakie en idiopathische steatorrhoe, die verschillende onderzoekers aannemelijk maakten, sluit een bacteriële beïnvloeding zeer waarschijnlijk uit.

Bij het testen van glutenine, het andere eiwit uit de tarwegluten, bij coeliakie-patiëntjes, vonden Krainick ⁶²⁾ en Sheldon ⁶³⁾ een licht-toxische werking. Beide onderzoekers schreven deze toe aan een verontreiniging van hun glutenine-preparaten.

Verdere onderzoekingen richtten zich op het opsporen van de toxische factor in gliadine. Van de Kamer en Weijers ⁶⁴⁾ sloten een aminozuurtekort als oorzaak van het zich openbaren der ziekte uit, daar een melk-eiwitrijk dieet de coeliakie-patiënten niet beschermt tegen de invloed van de tarwe.

Indien glutamine in hoge dosering aan patiëntjes wordt gegeven ⁶⁴⁾, wordt in de ontlasting geen verhoogde vetuitscheiding waargenomen, evenmin wanneer glutaminezuur ⁶⁰⁾ wordt toegediend. Ook een zoutzuurhydrolysaat van gliadine blijkt onschadelijk te zijn ⁶⁰⁾, ⁶⁵⁾.

Desamidering van de gliadine door koken met 1 N zoutzuur gedurende 2 uur, waardoor slechts 30% der amidegroepen van het glutamine intact blijft, maakt het produkt onschadelijk ⁶⁴⁾.

Bij verteringsproeven van gliadine met papaine verkrijgt Krainick ⁶⁴⁾ echter onwerkzame preparaten, welke nog 40% van de in de oorspronkelijke toestand aanwezige amidegroepen bevatten.

De waarnemingen van Van de Kamer, Weijers en Dicke ²⁾ omtrent de schadelijke werking van gliadine werden bevestigd door Ross ⁶⁶⁾ en Krainick ⁶²⁾.

7. De polypeptide-hypothese

Op grond van de besproken uitkomsten stelden verschillende onderzoekers ⁶⁷⁾, ⁶⁸⁾, ⁵¹⁾, ⁶⁹⁾, de hypothese op, dat het schadelijk effect van de gliadine veroorzaakt wordt door een of meer glutamine bevattende polypeptides. Om deze hypothese nader te bestuderen heeft men verschillende wegen bewandeld.

Een eerste mogelijkheid, namelijk om gliadine als zodanig in fracties te scheiden (zie hoofdstuk I) is nog zeer recent. Daarom is het niet verwonderlijk, dat Weijers en Van de Kamer ⁷⁰⁾ de scheiding van gliadine

niet door elektroforese of ultracentrifugeren beproefden. Het werd namelijk onmogelijk geacht op deze wijze voldoende van elke fractie te krijgen voor een klinische test.

Een tweede mogelijkheid is de enzymatische afbraak van gluten of gliadine.

Shaw ⁷¹⁾ en Frazer ⁷²⁾ lieten achtereenvolgens kristallijn pepsine en kristallijn trypsine op gluten inwerken. Na dialyse van de verkregen in water-oplosbare fractie door een cellofaan membraan werd deze fractie klinisch getest en toxisch bevonden. Alvey, Anderson en Freeman ⁶⁰⁾ testten gedroogde, met pancreasextract behandelde gluten en vonden een toxische werking. Krainick, Mohn en Fischer ⁶⁵⁾ lieten achtereenvolgens kristallijn pepsine en trypsine op gliadine inwerken. Na ultra-filtratie werd de oplosbare fractie bij coeliakie-patiënten getest en toxisch bevonden.

Bij afbraak van gliadine met papaïne ⁶⁵⁾ werd een niet-toxisch polypeptidenmengsel verkregen. Na inwerking van een extract van de mucosa van een varkensdarm op gluten werd een fractie verkregen welke in de klinische test geen toxische reactie veroorzaakte ⁷¹⁾, ⁷²⁾. Zowel Frazer c.s. als Krainick c.s. trachtten, uit de door enzymatische afbraak van gluten c.q. gliadine verkregen polypeptidemengsels, gegevens te verzamelen omtrent een in de gliadine aanwezige toxische factor.

7. 1. Onderzoek naar polypeptiden in bloedserum

Een andere wijze om de polypeptide-hypothese te testen is volgens Weijers en Van de Kamer ⁷⁰⁾, ⁷³⁾ het onderzoek van het bloed van coeliakie-patiëntjes na belasting met gliadine.

Bij een poging op snellere wijze dan tot dusver mogelijk coeliakie vast te stellen ⁷⁴⁾ gaven Weijers en Van de Kamer 350 mg gliadine per kg lichaamsgewicht in 15-20 ml karnemelk aan vastende patiëntjes. Het glutamine-gehalte in het bloed werd bepaald volgens Prescott-Waelsch en bleek na de gift met 50% te zijn gestegen. Door verder naast het totaal glutamine-gehalte ook het niet in peptidevorm gebonden glutamine volgens Archibald en Krebs te bepalen en de uitkomsten te vergelijken, meenden Weijers en Van de Kamer ⁷³⁾ aanwijzingen te hebben, dat, na belasting met gliadine, glutaminehoudende peptiden in het bloed der patiëntjes zouden voorkomen. De gedachte welke deze opvatting zou moeten ondersteunen was, dat bij coeliakie specifieke enzymen in de darmwandcel zouden ontbreken of geïnactiveerd zijn. Deze specifieke enzymen zouden bij normale personen de polypeptiden, die in de darm door de pepsine en trypsine uit de gliadine gevormd zijn, afbreken tot aminozuren ⁷³⁾. Een waarneming van Shaw ⁷¹⁾ wees in deze richting.

Grüttner, Mellin en Bramstedt ⁷⁵⁾ namen in het bloed van coeliakiepatiëntjes, na glutenbelasting, peptiden waar, die bij gezonde kinderen en bij coeliakiepatiënten op gluten-vrij dieet niet aangetoond konden worden. De gevonden peptiden bevatten geen proline.

Aan het algemeen geldig zijn van de gliadine-belastingstest wordt echter getwijfeld.

Visakorpi ⁷⁶⁾ paste een gliadinebelastingstest toe bij 41 kinderen, waaronder coeliakiepatiëntjes, gezonde kinderen en kinderen met andere stofwisselingsafwijkingen. Hij vond bij coeliakie een stijging van het glutamine-gehalte in het serum tot 40⁰/₀, bij gezonden tot 20⁰/₀. Een beperkt aantal gevallen met stijging boven 40⁰/₀ werd ook gevonden bij kinderen met andere voedingsstoornissen. Behalve de toeneming van het glutamine-gehalte in het serum vond Visakorpi dat ook het niveau van de andere in gliadine voorkomende aminozuren in het serum steeg. Deze stijging correleerde met de toeneming van het glutamine-gehalte. Visakorpi concludeerde dat de gliadinebelastingstest niet specifiek is voor coeliakie.

Alvey c.s. ⁶⁰⁾ vonden na belasting met gluten geen verschil tussen het serum van coeliakiepatiëntjes en dat van normale personen. Zij analyseerden dit serum met tweedimensionale papierchromatografie, na de serum-eiwitten en de aminozuren verwijderd te hebben. Daar ook Weijers en Van de Kamer ⁷⁰⁾ in verschillende gevallen bij voortgezet onderzoek geen stijging van de glutaminecurve vonden na belasting van coeliakiepatiëntjes met gliadine, menen wij, dat ten aanzien van het voorkomen van peptiden in bloed van coeliakiepatiëntjes nog geen conclusies getrokken mogen worden.

8. Onderzoek over idiopathische steatorrhoe

In 1952 publiceerde Mc Iver ⁷⁷⁾ voor het eerst een geval waarin een patiënt lijdende aan idiopathische steatorrhoe met een glutenvrij dieet een bijna normale vetresorptie herkreeg. De „tarwegevoeligheid” werd bij patiënten, lijdende aan idiopathische steatorrhoe, door Haex en Lips ⁷⁸⁾, Ruffin ⁷⁹⁾, French en Hawkins ⁸⁰⁾ en vele anderen bevestigd. Sleisenger ⁸¹⁾ gaf een overzicht van de behandeling van 29 volwassen patiënten met glutenvrij dieet. In twee gevallen trad geen verbetering in.

Dat coeliakie bij kinderen en idiopathische steatorrhoe bij volwassenen door eenzelfde metabolisch defect veroorzaakt wordt, zoals Cooke ⁵⁰⁾ het uitdrukte, wordt verder nog aannemelijk gemaakt doordat vele lijdens aan idiopathische steatorrhoe als kind aan coeliakie hebben geleden. Gerrard c.s. ⁸²⁾ vonden dat bij 32 patiënten van 4-19 jaar die in hun jeugd aan coeliakie geleden hadden en ten tijde van het onderzoek tarwe in

hun voedsel gebruikten, geen algeheel herstel was opgetreden. Di Sant 'Agnese ⁸³⁾ toonde aan, dat veel oud-coeliakie-patiënten, schijnbaar geheel hersteld, toch nog een afwijkende vetresorptie hadden. Dat in talrijke gevallen van coeliakie een genetische beïnvloeding voorkomt werd onder meer door Cooke, Peeney en Hawkins ⁸⁴⁾ aangetoond.

Ook met de biopsie-techniek, waarbij door middel van een via de mond ingebrachte capsule met een er aan bevestigde slang een stukje weefsel uit de darm kan worden weggenomen, zijn belangrijke gegevens over de coeliakie en de idiopathische steatorrhoe verkregen. Sakula en Shiner ⁸⁵⁾ pasten als eersten deze techniek bij de coeliakie toe en toonden aan, dat de villi in het jejunum afgevlakt zijn. Fone c.s. ⁸⁶⁾ kregen in 27 gevallen van idiopathische steatorrhoe eenzelfde beeld.

Rubin c.s. ⁸⁷⁾ vergeleken het histologische beeld, verkregen uit jejunumbiopsiën, bij de coeliakie en de idiopathische steatorrhoe. Zij vonden eenzelfde beeld, dat niet bij enige andere vorm van „malabsorption” wordt waargenomen, uitgezonderd bij tropische spruw. Het ileum blijkt normaal te zijn. Bij voortgezet onderzoek vonden Rubin c.s. ⁸⁸⁾ dat bij volwassenen de afwijkingen in het slijmvlies meestal inversibel zijn. Zij opperden de mogelijkheid, dat de histologische afwijking niet primair is, doch secundair. De waarnemingen van Rubin werden door onderzoek van biopsie-materiaal met de elektronen-microscop bevestigd ⁸⁹⁾.

Rubin c.s. ⁹⁰⁾ toonden een rechtstreeks verband aan tussen tarwe-gluten en de door hen gevonden histologische afwijkingen. Na injecties in het ook bij de idiopathische steatorrhoe normaal blijvende ileum met een tarwebloem-suspensie (3 x per dag gedurende 9 dagen) bij een tweetal patiënten werden in het ileum de afgevlakte villi waargenomen. Rubin ⁹⁰⁾ concludeerde hieruit, dat tarwebloem de histologische veranderingen bij idiopathische steatorrhoe veroorzaakt.

Wij willen aan het eind van dit overzicht nog enkele metabolische afwijkingen vermelden welke bij de idiopathische steatorrhoe gevonden zijn, maar waarvoor nog niet een zodanige verklaring gevonden is, dat de verschijnselen in het algehele beeld passen.

De resorptie van d-xylose is bij de idiopathische steatorrhoe sterk verlaagd. In verband hiermede wordt de concentratie van d-xylose in de urine bepaald gedurende 5 uur na het nuttigen van 25 gram d-xylose. Deze concentratie wordt als kwantitatieve maat voor de steatorrhoe gebruikt ⁸¹⁾. De uitscheiding van enkele tryptofan stofwisselingsproducten nam bij de idiopathische steatorrhoe toe.

Kowlessar ⁹¹⁾ vond een verhoogde hoeveelheid 5-hydroxy-indoolazijnzuur in de urine. Sleisinger ⁸¹⁾ vermeldde dat ook meer idool-3-azijnzuur, kynurenine en xanthurinezuur in de urine gevonden werd.

De concentratie van de laatste beide stoffen in de urine nam toe na toediening van 4 gram l-tryptofan; geeft men hiernaast pyridoxine dan is hun uitscheiding normaal. Volgens Sleisinger is de klinische betekenis van de verhoogde idooluitscheiding niet bekend. Het verhoogde gehalte van kynurenine en xanthurinezuur in de urine zou op een vitamine B6-deficiëntie kunnen wijzen. Marko, Gerrard en Buchan ⁹²⁾ vonden dat het glutaminezuurgehalte van hydrolysaten van 24 uur oude urine-monsters bij de idiopathische steatorrhoe duidelijk verhoogd was als het dieet niet glutenvrij was.

PROBLEEMSTELLING EN VERMELDING VAN RESULTATEN

1. Inleiding

In Hoofdstuk II werd het bij coeliakie-patiëntjes uitgevoerde onderzoek ^{60), 65), 71), 72)} ter verkrijging van gegevens over de voor het eerst door Weijers c.s. ⁶⁷⁾ opgestelde polypeptide-hypothese besproken.

Shaw ⁷¹⁾, Frazer ⁷²⁾ en Alvey ⁶⁰⁾ deden hun onderzoek met onbehandelde * gluten; Krainick ⁶⁵⁾ voerde zijn proeven uit met gliadine. Allen behalve Alvey lieten eerst kristallijn pepsine en vervolgens kristallijn trypsine op het onderzochte eiwit inwerken; Alvey ⁶⁰⁾ gebruikte gedroogd pancreas-extract.

Er werd voor gezorgd dat geen onafgebroken eiwit in het polypeptidemengsel achterbleef.

Uit door alle genoemde onderzoekers uitgevoerde klinische tests, waarbij aan de patiëntjes een hoeveelheid van het door enzymatische afbraak verkregen preparaat werd toegediend, bleek dat de steatorrhoe veroorzakende (in den vervolge kortweg „toxisch” te noemen) werking na de enzymatische afbraak nog aanwezig was.

Hooghwinkel ⁹³⁾ liet in oriënterende proeven maagsap en daarna duodenaalvocht van personen, welke niet aan idiopathische steatorrhoe leden, op gluten of gliadine inwerken. Het in water oplosbare polypeptidemengsel, door afcentrifugeren verkregen, werd aan patiënten, lijdende aan idiopathische steatorrhoe, toegediend. Deze patiënten waren te voren op een glutenvrij dieet gehouden. Na toediening traden bij hen de verschijnselen der vetontlasting op.

Het polypeptidemengsel werd vervolgens door toevoeging van aceton zoveel mogelijk neergeslagen. Een deel van de afbraakprodukten sloeg niet neer. Deze werden door afdampen van de bovenstaande vloeistof in droge vorm verkregen. Zodoende kon men werken met een met aceton precipitabele en een niet met aceton precipitabele fractie.

Bij het in dit proefschrift beschreven onderzoek is uitgegaan van gliadine. De opzet was de methoden van het bovengenoemde bij de coeliakie uitgevoerde onderzoek ^{60), 65), 71), 72)} zo goed mogelijk kwantitatief toe te passen op idiopathische steatorrhoe bij volwassenen.

Daartoe werd na fractionering van het door enzymatische afbraak verkregen polypeptide-mengsel nagegaan welke fracties verantwoordelijk zijn voor de steatorrhoe veroorzakende werking.

* Niet met meelverbeteraars behandelde

2. De te gebruiken testmethode

Om de mate waarin een bepaalde, uit tarwe-eiwit verkregen fractie het symptoom der idiopathische steatorrhoe, n.l. de vetontlasting, doet ontstaan vast te kunnen stellen, zijn wij aangewezen op toediening van deze fractie aan patiënten, die aan deze ziekte lijden.

Vrijwel alle onderzoekers, op dit gebied werkzaam, bepalen de vet-resorptie volgens de methode van Van de Kamer⁵⁵⁾, doch soms worden ook andere parameters aan de patiënt gemeten, b.v. de d-xylose-resorptie⁸¹⁾.

Technisch moeilijk is de methode van Rubin⁹⁰⁾. Hierbij wordt bij de patiënt rectaal een kleine hoeveelheid van de te onderzoeken stof in het ileum ingebracht.

Het pathologisch beeld der darmvilli, dat volgens Rubin alleen in duodenum en jejunum en niet in het ileum voorkomt, bleek door deze ingreep ook in het ileum zichtbaar te worden, indien de toegediende fractie toxisch is. Deze methode kan alleen gebruikt worden wanneer een biopsie-apparaat ter beschikking is dat aan hoge eisen voldoet.

Het is begrijpelijk dat ook in dierexperimenten de genoemde invloed van tarwe-eiwitten is nagegaan. Althusen en Grodsky⁹⁴⁾ stelden vast dat deze geen invloed hebben op de resorptie van vetten, koolhydraten en aminozuren.

Schneider c.s.⁹⁵⁾ ontwikkelden een methode om gluten-fracties te onderzoeken, waarbij zij gebruik maakten van een geïsoleerd gedeelte van de dunne darm van een rat, n.l. het proximale deel van het jejunum. Daar uit röntgenonderzoek van patiënten met coeliakie of idiopathische steatorrhoe bekend is dat het bewegingsrythme van de dunne darm door tarwe-eiwitten wordt vertraagd, trachtten zij door meting van de peristaltiek van het geïsoleerde rattenorgaan enkele glutenfracties op toxiciteit te testen. Wanneer het in water oplosbare deel van met pepsine en trypsine afgebroken tarwegluten in het lumen van de rattendarm werd ingebracht, werd de peristaltiek niet vertraagd. Werd dezelfde fractie met de serosa, het buitenste deel der darmwand, in contact gebracht dan stopte de peristaltische reflex gedurende enkele minuten.

Een met extract van varkenmucosa onwerkzaam gemaakte toxische fractie had bij toediening op de serosa geen effect.

Schneider c.s. onderzochten, met behulp van het ileum of de jejunum van de marmot, de invloed van deze glutenfracties op het vrijkomen

via zijn inactieve precursor van acetylcholine in zenuwuiteinden. Uit deze studie concludeerden zij dat de vermindering van peristaltische reflex van ileum of jejunum der marmot door glutenfracties veroorzaakt wordt doordat de peptiden het vrijkomen van acetylcholine remmen. Bij voortgezet onderzoek liet Frazer ⁹⁶⁾ de mucosa afkomstig van een perorale biopsie van de dunne darm na vriesdroging op een toxische glutenfractie inwerken.

Gebruikt werd biopsie-materiaal van een drietal patiënten lijdende aan idiopathische steatorrhoe. Indien de patiënten door gliadinebelasting een afwijkend beeld van de mucosa vertoonden, bleek het na vriesdroging verkregen poeder na inwerking op de glutenfractie en testen van dit materiaal volgens Schneider de peristaltiek niet te remmen. Door de patiënten op tarwevrij dieet te houden, was de herstelde mucosa na inwerking op een toxische glutenfractie wel in staat de peristaltiek te remmen. Twee van de drie patiënten bleven echter gevoelig voor gluten.

Nader onderzoek zal moeten leren of deze testmethoden, waarbij darm van dieren gebruikt wordt, correlatie vertonen met de biologische patiëntentest. In een aantal gevallen was deze correlatie afwezig.

Een mogelijkheid voor onderzoek welke nog nimmer is nagegaan, doch waarop Wieringa ⁹⁷⁾ wees is deze. In de bierbrouwerij is reeds lang bekend dat de rietsuikervergisting met ondergist door toevoegen van tarwebloem sterk geremd wordt. In Wageningen zijn de factoren, welke op deze remming van invloed zijn, onderzocht. Waarschijnlijk is gliadine hiervoor verantwoordelijk. Het zou zeker interessant zijn na te gaan of andere in de idiopathische steatorrhoe toxische fracties op de rietsuikervergisting bij brouwgist eveneens een remmende werking hebben.

Intussen is door ons uitsluitend de reactie van patiënten als criterium voor de toxiciteit der fracties gebruikt.

Het principe dat hier aan ten grondslag ligt is dat een zorgvuldig samengesteld evenwichtig en glutenvrij dieet (zie Hoofdstuk V) gedurende een z.g. inlooperperiode en een hierop volgende proefperiode aan een lijder aan idiopathische steatorrhoe wordt toegediend. Tijdens de proefperiode wordt een hoeveelheid te onderzoeken gluten aan het eten toegevoegd, die per dag overeen dient te komen met 24 g tarwegluten zoals in een gemiddeld dagmenu van een normaal persoon voorkomt. Tijdens de inloop- en de proefperioden wordt de opgenomen hoeveelheid vet in het dieet zo goed mogelijk constant gehouden op de tevoren berekende waarde. De ontlasting per etmaal wordt verzameld en gemengd en de

hoeveelheid hogere vetzuren volgens de methode van Van de Kamer bepaald. Uit de waarden van opgenomen en uitgescheiden vet wordt het „percentage niet geresorbeerd vet” per dag berekend. In verband met de darmlediging wordt uit deze dagelijkse percentages een „gemiddelde driedagscurve” samengesteld. Technische bijzonderheden over de gevolgde testmethodiek worden in Hoofdstuk V besproken..

3. Resultaten van het eerste gedeelte van het onderzoek

Een schematisch overzicht van het eerste gedeelte der door ons uitgevoerde proeven volgt hieronder.

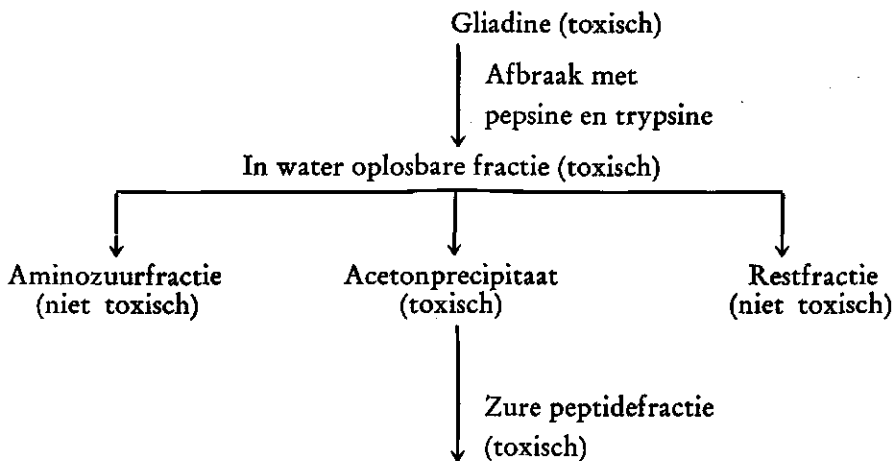


FIG. 3

Overzicht toxiciteit der uit gliadine verkregen fracties.

Later werd getracht te bewijzen dat de, uit de gliadine afkomstige, in de zure peptidefractie voorkomende disulfidebindingen, geen rol spelen bij het verschijnsel toxiciteit, zoals we dit kennen uit de klinische balansproeven bij lijdens aan idiopathische steatorrhoe.

4. De disulfidebindingen in tarwegluten

Verschillende onderzoekers kennen aan de in tarwemeel en tarwegluten voorkomende disulfidebindingen betekenis toe voor de fysische structuur, die tot uiting komt in de typische eigenschappen van deeg bij het rijzen en bakproces. Bloksma⁹⁸⁾ beschouwde de disulfidebindingen in tarwegluten als belangrijke structurelementen. Hij bepaalde amperometrisch de thiol- en disulfide groepen in tarwemeel en -gluten in verband met de bakeigenschappen.

Hoewel de reproduceerbaarheid der titraties niet bevredigend was, kon hij vaststellen dat tarwemeel 0,40 thiol- en 7,5 disulfidegroepen per

1000 N-atomen bevat. In tarwegluten werden 0,15 thiol- en 7 disulfidegroepen per 1000 N-atomen gevonden.

Frater c.s.⁹⁹⁾ vonden bij amperometrische titratie met een overmaat methyl mercuri jodide voor tarwemeel (gemeten in een 8 M ureum-suspensie) 450 μmol —SH groepen tegen 2220 μmol S—S-bindingen per 300 g droog meel. Zij schreven de reologische eigenschappen van het deeg eveneens toe aan de disulfidegroepen. Axford c.s.¹⁰⁰⁾ vonden dat het aantal disulfidegroepen per 1000 N-atomen omgekeerd evenredig is met het eiwitgehalte der bloem. Zij gaven hiermede een verklaring voor de verschillende gehalten die in de literatuur voor deze groepen worden opgegeven.

Het zou waardevol kunnen zijn na te gaan of er een verband bestaat tussen de aanwezigheid der disulfidebindingen in tarwegluten en de toxiciteit hiervan voor lijders aan idiopathische steatorrhoe.

Teneinde de invloed van de disulfidebinding op de toxiciteit van de uit gliadine verkregen zure peptidefractie te kunnen bestuderen, trachtten we de cystinemoleculen door oxidatie met permierenzuur te splitsen in twee moleculen cysteïnezuur.

Om disulfidebindingen in een eiwit te verbreken bestaan verschillende methoden, die onderverdeeld kunnen worden in oxidatieve en reductieve methoden¹⁰¹⁾. Slechts de belangrijkste worden hier vermeld :

a. Oxidatie met per-zuren, vooral permierenzuur

Sanger¹⁰²⁾ paste de permierenzuuroxidatie toe om de structuur van insuline op te helderen. Later werd deze methode gebruikt voor het structuuronderzoek van ribonuclease, lysozyme, papaïne, bovine plasma albumine en andere eiwitten. Een nadeel der methode is dat tryptofan gedurende de oxidatie vernietigd wordt en dat o.a. kynurenine gevormd wordt. Verder wordt methionine omgezet in het sulfon terwijl enige chlorering van tyrosine kan voorkomen. Verdund perazijnzuur werd gebruikt voor het structuuronderzoek van keratine.

b. Reductieve methoden

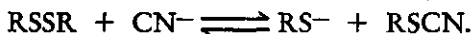
Speciaal om tryptofan te behouden is de toepassing van reductieve methoden bestudeerd. Daar bij de reductie van disulfidebindingen SH-groepen ontstaan, welke gemakkelijk opnieuw tot S—S-bindingen geoxideerd worden, moet men na de reductie deze SH-groepen blokkeren. Als voorbeeld kunnen genoemd worden de reductie met thioglycolzuur en die met natrium tetrahydro boraat¹⁰³⁾. In beide gevallen worden de

vrijgekomen SH-groepen beschermd door behandeling met monojood-azijnzuur.

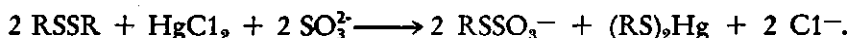
c. De reactie met sulfiet

Bij deze reactie is het eindprodukt thiosulfaat. Reactievergelijking : $\text{RSSR} + \text{SO}_3^{--} \rightleftharpoons \text{RS}^- + \text{RSSO}_3^-$. Volgens Swan heeft de splitsing met sulfiet als nadeel dat de reactie reversibel is, de alkyl-thiosulfaat-groep enigszins onstabiel is en de splitsing niet symmetrisch geschiedt.

d. Reactie met cyanide



e. Reacties met zilver-ionen of mercuri-zouten



Vanwege het biologische onderzoek met patiënten kwamen de twee laatstgenoemde mogelijkheden niet in aanmerking. De bezwaren van de sulfietreactie achtten wij doorslaggevend. Bij de keuze tussen de oxidatieve methoden en de onder b) genoemde reductieve methoden werd als voordeel gezien dat de bij de permierenzuuroxidatie gebruikte reagentia vluchtig zijn. Daarom werd deze oxidatieve methode toegepast.

Sanger ¹⁰²⁾ schrijft hierover :

„De methode is in principe die van Toennies en Homiller ¹⁰⁴⁾, die aantoonde dat cystine binnen 1 uur de theoretisch te verwachten 5 atomen zuurstof opneemt en dat na 5 uur een meer algemene oxidatie van een aantal aminozuren plaatsvindt. Het is dus wenselijk de minimale oxidatietijd uit te zoeken, welke nodig is om de S—S-binding volledig te splitsen. Bij gebruik van papierchromatografie volgens Consden, Gordon en Martin ¹⁰⁵⁾ werd aangetoond dat de reactie met vrije cystine in 5 minuten volledig was, doch dat voor insuline 15 minuten nodig waren”.

De wijze waarop de behandeling met permierenzuur plaats vindt is beschreven in Hoofdstuk IV.

Het geoxideerde polypeptide-mengsel werd na hydrolyse met 6 N HCl (24 uur bij 100°C) papierchromatografisch onderzocht. Op de cystine-plaats bleek nog een kleine vlek voor te komen. Door behandeling van het met permierenzuur geoxideerde zure peptidemengsel met broom in geringe concentratie werd een mengsel van verbindingen verkregen, dat aanvankelijk na hydrolyse met 6 N HCl en twee dimensionale papier-

chromatografie geen vlek meer op de cystineplaats gaf.

In een andere proef bleken echter wel vlekjes op de cystineplaats voor te komen.

Uit door Haex et al.¹⁰⁶⁾ uitgevoerde kleuringen met mercurijodide werd duidelijk dat zowel de vlekjes op de cystineplaats na de permierenzuuroxidatie als die welke in latere porties met broom behandelde met permierenzuur geoxideerde zure peptiden op dezelfde plaats voorkwamen, niet aan cystine kunnen worden toegeschreven.

Reeds van Halteren¹⁰⁷⁾ waarschuwde er voor dat oxidatie van cystine, zowel door broomwater als door waterstofperoxide in aanwezigheid van andere aminozuren, tot andere vlekken dan cysteinezuur op het papierchromatogram aanleiding kan geven.

Uit de afwezigheid van cystine na hydrolyse van de met permierenzuur behandelde zure peptidefractie werd geconcludeerd dat alle disulfidebindingen verbroken zijn.

De afwezigheid van cystine werd door Haex et al.¹⁰⁶⁾ vastgesteld en kon later door ons worden bevestigd.

BEREIDING DER TARWE-EIWITFRACTIES

In dit hoofdstuk wordt achtereenvolgens de bereiding der tarwe-eiwitfracties besproken, waarna het analytische werk over de zure peptidefractie wordt vermeld.

1. De bereiding van gliadine

Gliadine werd volgens onderstaande werkwijze uit ongebleekte tarwe-gluten bereid :

Suspendeer 1 kg gluten in 9 liter 55% ethanol. Roer de suspensie gedurende 3 uur en decanteer na 1 nacht bezinken. Centrifugeer de gedecanteerde vloeistof af ($1/2$ uur bij 4500 omw./minuut). Voeg het sediment en het bij het decanteren achtergebleven bezinksel samen en suspendeer opnieuw in 4,5 liter 55% ethanol. Roer gedurende 3 uur, laat vervolgens gedurende 1 nacht bezinken en centrifugeer af ($1/2$ uur bij 4500 omw./minuut). Herhaal het uittrekken met 55% ethanol nog 1 maal. Damp de in totaal 18 liter verdund alcoholische oplossing op een waterbad in tot een volume van enkele liters. Was na toevoegen van een overmaat water de in water onoplosbare gliadine eerst met warm en vervolgens met koud gedestilleerd water uit. Droog de gliadine in de vacuum-droogstoof.

De opbrengst bedroeg gemiddeld 35 (gewichts) % der gluten, wat overeenkomt met 87% der theoretische hoeveelheid.

De op deze wijze bereide gliadine wordt in het vervolg „tarwe-eiwitfractie I” genoemd.

De gedroogde gliadine werd bij 0—4°C bewaard.

2. De enzymatische afbraak van gliadine

De afbraak van gliadine geschiedde met pepsine en trypsine, waarvan de enzymatische activiteit regelmatig werd gecontroleerd door bepaling van de hoeveelheid niet-eiwitachtige N-houdende verbindingen, door deze enzymen uit een oplossing van caseïne volgens Hammersten in 1 N natronloog gevormd. De pepsine en trypsine werden bij -30°C bewaard.

De afbraak geschiedde volgens onderstaande werkwijze :

Suspendeer 100 g gliadine in 2 liter gedestilleerd water en breng met 5% zoutzuur de pH op 1—2. Voeg aan de suspensie 0,5 g pepsine en enige druppels chloroform toe. Plaats de kolf na omschudden gedurende 24 uur in een broedstoof bij 37°C . Breng na deze periode de gestegen pH, door toevoegen van 5% HCl op

nieuw op 1—2. Voeg nu nogmaals 0,5 g pepsine toe en houd de suspensie 24 uur op 37°C. Breng vervolgens de pH met 0,1 N natronloog op 7—8 en centrifugeer af (1/4 uur bij 4500 omw./min.). Doe bij de heldere oplossing 0,5 g trypsine. Houd de oplossing na toevoegen van enige druppels chloroform 24 uur op 37°C. Stel hierna op pH 7—8 bij en voeg nogmaals 0,5 g trypsine toe.

Centrifugeer na opnieuw 24 uur af (1/4 uur bij 4500 omw./min.).

De in de verkregen polypeptide-oplossing voorkomende vrije aminozuren werden aan Dowex 50—X10 gebonden en wel als volgt :

Voeg aan de polypeptide-oplossing 100 g Dowex 50—X10 [H⁺] (20—50 mesh) toe. Roer de suspensie 1 uur bij kamertemperatuur. Roer na affiltreren nog een half uur met 50 g verse Dowex. Filtreer hierna opnieuw af. Was de verzamelde Dowex enkele malen met gedestilleerd water uit en voeg daarna 5 N ammonia toe. Nu 15 minuten magnetisch roeren, filtreer en herhaal de bewerking met 5 N ammonia 2 maal. Voeg de aminozuurfracties samen en damp in een warme luchtstroom tot klein volume in. Droog verder in een vacuum droogstoof (beneden 45°C).

De van aminozuren gezuiverde polypeptide-oplossing werd verdeeld in een gedeelte dat met een overmaat aceton in de koude (pH ca. 3,5) precipiteerde en een restfractie welke onder deze omstandigheden niet precipiteerde. De werkwijze was als volgt :

Damp de gezuiverde polypeptide-oplossing in een warme luchtstroom tot ongeveer 200 ml in en koel hierna tot ongeveer 4°C. Voeg een tienvoudig volume op 4°C gekoelde aceton toe. Decanteer na een nacht staan bij 4°C en droog het neerslag bij verminderde druk beneden 45°C („tarwe-eiwitfractie II”). Destilleer de vloeistoflaag af en droog de achtergebleven visceuze substantie bij verminderde druk (beneden 45°C) („tarwe-eiwitfractie III”).

Hoogspanningselektroforese proeven bevestigden dat aminozuren in de tarwe-eiwitfracties II en III afwezig waren.

De aminozuurfractie en fracties II en III werden ongeveer 60 maal bereid om een voorraad te krijgen voor de patiëntentest op toxiciteit. De gemiddelde opbrengsten der fracties II en III bedroegen resp. 45—50 en 20—25% (ten opzichte van de gliadine). De fracties werden bij —30°C bewaard.

Uit een polypeptide mengsel kunnen de zure, de basische, de neutrale of de aromatische peptiden geïsoleerd worden¹⁰⁸).

Vanwege het hoge percentage glutaminezuur dat in gliadine voorkomt,

werd het isoleren van de zure peptidefractie uit de tarwe-eiwitfractie II gekozen.

Voor het isoleren werd gebruik gemaakt van zuur aluminiumoxide dat volgens Fromageot ¹⁰⁹) op de volgende wijze werd voorbehandeld :

Voeg aan 250 g aluminiumoxide (p.a.) in een bekglas 1250 ml 2 N zoutzuur toe en roer 20 minuten.

Giet na filtreren over een Büchner-filter 1250 ml kokend 2 N zoutzuur op het filter. Breng na afpersen het aluminiumoxide in een bekglas over en was met 4 à 5 porties van 1 liter gedestilleerd water. Decanteer en suspendeer afwisselend. Op deze wijze verwijdt men de fijnste deeltjes aluminiumoxide. Droog tenslotte het aluminiumoxide 10 uur bij 110°C.

3. Isolering der zure peptiden

Aanvankelijk werd de zure peptidefractie op een kolom geïsoleerd en wel als volgt :

Een glazen kolom (inwendige diameter 10 mm; effectieve hoogte 10 cm), aan de onderzijde van een P5-sinterfilter voorzien, wordt met 5 gram van het op bovenbeschreven wijze voorbehandelde aluminiumoxide gevuld. Men vult de kolom met gedestilleerd water tot de pH van de uitlopende vloeistof 4,8—5,0 bedraagt (ca. 300 ml). Wanneer de kolom te zuur is, worden namelijk volgens Jutis en Lederer ¹⁰⁸) de neutrale peptiden gedeeltelijk vastgehouden. 200 mg tarwe-eiwitfractie II wordt in 200 ml gedestilleerd water opgelost onder verwarming op een waterbad van 50°C. Indien nodig wordt gefiltreerd. De oplossing wordt op pH 7 gebracht door toevoeging van 0.1 N natronloog. Ongeveer 200 ml polypeptide-oplossing wordt op de kolom gebracht en met 250 ml met 3 ml 0,1 N zoutzuur aangezuurd water geëluëerd. De neutrale peptiden komen in het filtraat terecht; de zure peptiden blijven op de kolom. Deze worden geëluëerd met 30 ml 1 N zoutzuur.

De zure peptide-oplossing wordt nu door dialyse in een kolloidionhuls ontzuurd. Door de kolloidionhuls in een speciale glazen houder, welke met de waterstraal pomp wordt verbonden, (fabr. Membranfilter-Gesellschaft, Sartorius-Werke A.G. en Co., Göttingen) te plaatsen, concentreren we de zure peptide-oplossing tijdens de dialyse nog ongeveer 5 maal.

Beschrijving dialyse-apparaat Membranfilter-Gesellschaft (Fig. 4)

De kolloidion membraanhuls wordt ongeveer 1 cm over de op de glazen

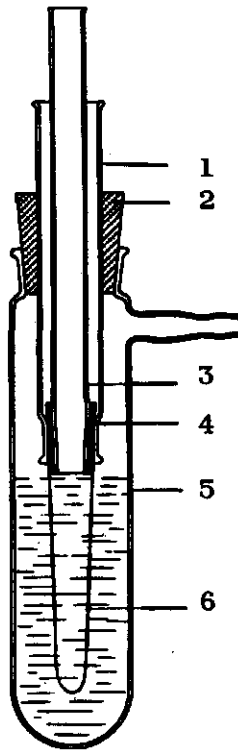


FIG. 4

DIALYSE-APPARAAT

- | | |
|---------------|------------------|
| 1. Mantelbuis | 4. Manchet |
| 2. Gummistop | 5. Afzuigvat |
| 3. Binnenbuis | 6. Kollodionhuls |

binnenbuis aangebrachte kunststofmanchet geschoven. Hierover komt de mantelbuis en het geheel wordt in een rubber stop in de met gedestilleerd water gevulde buitenbuis geplaatst.

Nadat de kollodionhuls met de te dialyseren vloeistof is gevuld, wordt met een waterstraalpomp de druk op ong. 50 cm gebracht. Na de dialyse wordt de oplossing gevriesdood met behulp van vloeibare lucht.

Om een grotere hoeveelheid zure peptidefractie te verkrijgen werd later een gewijzigde bereidingswijze toegepast, waarbij niet op een zure aluminiumoxyde kolom geadsorbeerd wordt doch waar de adsorptie in een bekersglas plaats heeft.

De gewijzigde bereidingswijze is als volgt :

Los 10 g van het gedroogde acetonprecipitaat (tarwe-eiwitfractie II) op in 10 liter gedestilleerd water van 50°C. Koel, nadat met 0,1 N natronloog tot pH 7 geneutraliseerd is, af tot kamertemperatuur, voeg 250 g voorbehandeld zuur aluminiumoxyde toe en roer 15 min. Decanteer nadat het aluminiumoxide bezonken is. Roer het aluminiumoxide 5 min. met 1,5 liter aangezuurd gedestilleerd water (met 12 ml 0,1 N zoutzuur per liter). Herhaal het uitwassen met aangezuurd water nog 4-maal. Vervolgens wordt 4-maal uitgewassen met 600 ml N zoutzuur. Voeg deze zure peptide-fracties samen en filtreer het restant aluminiumoxide af.

Na dialyse onder afzuigen gedurende 16 uur bij 2—4°C (in de bovenbeschreven dialyse-apparaten) worden de zure peptiden gevriesdroogd. De opbrengst (tarwe-eiwitfractie IV) bedraagt 35—40%, betrokken op de tarwe-eiwitfractie II.

Zuiverheid der zure peptide fractie

Uiteraard is de mate van zuiverheid der bereide fracties van belang in verband met de in Hoofdstuk V te bespreken patiëntentest.

Als belangrijkste mogelijke verontreinigingen kunnen genoemd worden: NaCl en een zeker watergehalte. Algehele afwezigheid van zout is niet steeds te vermijden geweest. Hierop wordt bij de discussie nog nader ingegaan.

Door bepaling van het N-gehalte volgens Kjeldahl is bij de zure peptide-bereiding steekproefsgewijze onderzocht in hoeverre de verkregen preparaten zuiver zijn. In 20 g tarwe-eiwit-fractie II, waarvan bij een bereiding werd uitgegaan, was 3218 mg N aanwezig. In oplossing bleef na de behandeling met zuur Al_2O_3 : 307 mg N. Bij het uitwassen werd in het waswater 191 mg N gevonden. In de zure peptide-fractie werd gevonden: 1108 mg N. Na de elutie met 1 N HCl bleek aan het Al_2O_3 geen N-houdend materiaal meer gehecht te zijn. In totaal werd 1606 mg N of 50% der N teruggevonden. In de zure peptiden (gemiddelde opbrengst uit 20 g tarwe-eiwit-fractie II is 8 g) werd 1108 mg N of 6,92 g eiwit teruggevonden. In deze proef komt dit overeen met een zuiverheid van 86,5%.

4. Bereiding van geoxideerde zure peptiden

In een oplossing van 9 ml mierenzuur (96%) en 1 ml waterstofperoxide 30% wordt 250 mg zure peptiden opgelost. Men laat deze oplossing 15 minuten bij kamertemperatuur staan en verdunt dan

met 10 ml gedestilleerd water om de oxidatie te stoppen.

Bij ca. 40°C en onder verminderde druk wordt nu het volume van ca. 20 ml tot ca. 2 ml teruggebracht.

Na toevoegen van 20 ml aceton in de koude, waarbij de geoxideerde zure peptiden (OZP) neerslaan, wordt afgecentrifugeerd (15 min. bij 2000 omw./min.) en met aceton uitgewassen tot zuurvrij. Het verkregen poeder wordt aan de lucht gedroogd. In Tabel 5 zijn de resultaten weergegeven onder Expt. 1—7.

Bij de volgende porties werd niet in vacuum ingedampt, doch direct neergeslagen met aceton en vervolgens afgecentrifugeerd (Expt. 8—22).

TABEL 5

Experimenten over oxidatie van zure peptiden

OZP portie	Hoeveelheid ZP (mg)	Opbrengst (mg)
1	250	136
2	250	170
3	250	215
4	250	248
5	250	191
6	250	178
7	250	192
8	250	135
9	250	146
10	500	258
11	750	430
12	500	255
13	1000	670
14	1000	500
15	1000	625
16	1000	572
17	1000	557
18	1000	500
19	1000	462
20	1000	435
21	1000	217
22	1000	546

De opbrengst aan geoxideerde zure peptiden is gemiddeld 52—62%. De opbrengst is lager dan theoretisch te verwachten is. Bij de biologische test (Hoofdstuk V) is de theoretisch te verwachten hoeveelheid als toe te dienen dosis toegepast.

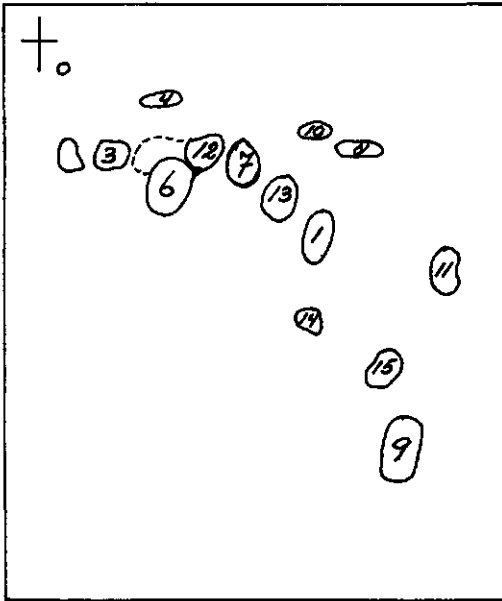


FIG. 5

Tweedimensionaal papierchromatogram van zure hydrolyse der zure peptidefractie (zie tekst). Verklaring der cijfers : zie onder fig. 6.

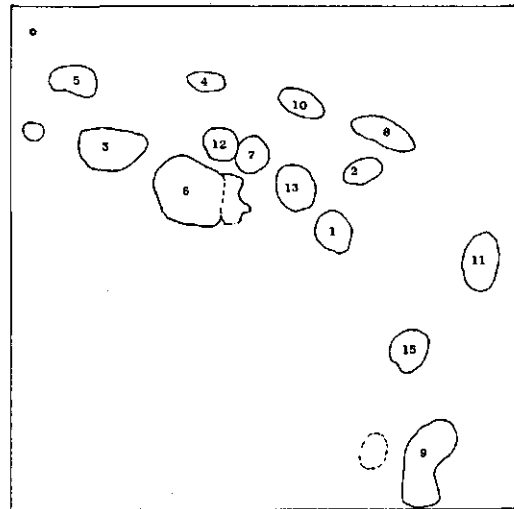


FIG. 6

Tweedimensionaal papierchromatogram van zure hydrolyse der met permierenzuur geoxideerde zure peptidefractie (zie tekst). Verklaring der cijfers :

- | | | |
|-------------------|-----------------|---------------|
| 1. Alanine | 7. Glycine | 11. Proline |
| 2. Arginine | 8. Histidine | 12. Serine |
| 3. Asparaginezuur | { Leucine | 13. Threonine |
| 4. Cystine | 9. { Isoleucine | 14. Tyrosine |
| 5. Cysteinezuur | { Phenylalanine | 15. Valine |
| 6. Glutaminezuur | 10. Lysine | |

Van elke bereide portie werd na hydrolyse met 6 N zoutzuur (24 uur bij 105°C) een tweedimensionaal papierchromatogram vervaardigd (butanol-azijnzuur-water, 4 : 1 : 5 en phenol-water, 3 : 1). Na kleuring met ninhydrine werd nagegaan of op de cystineplaats al dan niet een vlek aanwezig was.

Daar op de cystineplaats nog een vlekje aanwezig was, hoewel van geringere concentratie dan bij de zure peptiden (zie Fig. 5 en 6), werd aanvankelijk gemeend dat dit van cystine afkomstig was.

Uit kleuringen volgens Haex et al. ¹⁰⁶⁾ bleek echter dat dit vlekje geen cystine was doch waarschijnlijk een bij de oxidatie verkregen bijproduct.

Verlenging van de oxidatieduur gaf eveneens een produkt dat na hydrolyse met 6 N zoutzuur en twee-dimensionale papierchromatografie op de cystineplaats een vlekje vertoonde (zie Tabel 6 Expt. 23—27).

TABEL 6

Proeven over verlengde oxidatie van zure peptiden

OZP	Hoeveelheid uitgangsp product (mg)	Oxidatieduur	Opbrengst (mg)
23	1000	45 min.	300
24	250	1½ uur	47
25	250	3½ uur	89
26	250	5 uur	94
27	250	24 uur	125

Vervolgens werd in een serie proeven nagegaan of een verhoogde hoeveelheid waterstofperoxide bij de oxidatie van zure peptiden invloed had. Er kwam geen wijziging in het verkregen resultaat.

Bij inwerking van permierenzuur, verkregen uit mierenzuur en verschillende hoeveelheden waterstofperoxide op cysteine of cystine, werd in alle gevallen slechts één vlek op het twee-dimensionale papierchromatogram aangetroffen, n.l. van cysteinezuur.

Wanneer hetzelfde werd uitgevoerd met zure peptiden werd na hydrolyse op het twee-dimensionale chromatogram op de cystineplaats een vlek aangetroffen. Hiernaast kwam dan nog cysteinezuur op het chromatogram voor.

Inmiddels werden proeven uitgevoerd welke ten doel hadden deze laatste vermeende hoeveelheid cystine door behandeling met broom in de koude te oxideren.

Het verkregen produkt werd als tarwe-eiwitfractie VI in de patiëntentest toegediend. De opbrengst varieerde tussen 40 en 55 gewichtsprocenten (berekend op de met permierenzuur geoxideerde zure peptiden). Van elke bereide portie werd na hydrolyse met 6 N zoutzuur (24 uur bij 105°C) een twee-dimensionaal papierchromatogram vervaardigd (zie Figuur 7). De porties welke na de behandeling met broom nog een vlek op de cystineplaats gaven (geen cystine) werden niet gebruikt in de patiëntentest.

Achteraf bleek dat de disulfidebruggen reeds door het permierenzuur geheel verbroken zijn, zodat de behandeling met broom overbodig was.

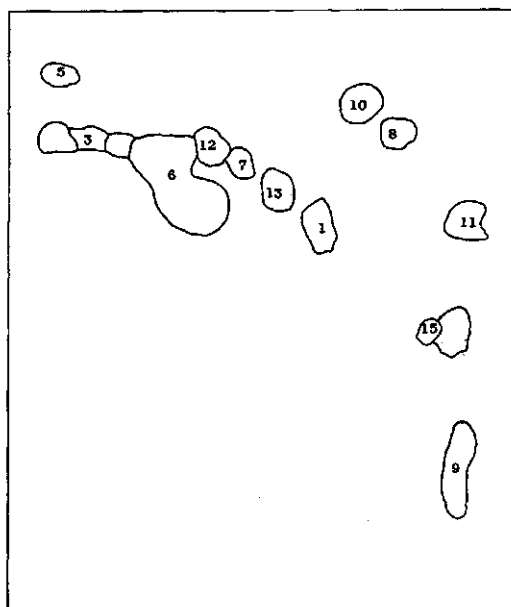


FIG. 7

Tweedimensionaal papierchromatogram van zure hydrolyse der met permierenzuur en broom behandelde zure peptiden (zie tekst). Verklaring der cijfers:

- | | | |
|-------------------|-----------------|---------------|
| 1. Alanine | 8. Histidine | 11. Proline |
| 3. Asparaginezuur | { Leucine | 12. Serine |
| 5. Cysteinezuur | 9. Isoleucine | 13. Threonine |
| 6. Glutaminezuur | { Phenylalanine | 15. Valine |
| 7. Glycine | 10. Lysine | |

Daar zowel de met permierenzuur als de met permierenzuur en broom behandelde zure peptiden in de patiëntentest toxisch bleken te zijn, is hiermede aangetoond dat disulfidebindingen niet van invloed zijn op de toxiciteit t.o.v. idopathische steatorrhoe.

Disulfide-bindingen kunnen in een eiwit of polypeptide in de peptideketen zelf voorkomen of zij kunnen een brug tussen peptide-ketens vormen. Natuurlijk kunnen in één molecule beide typen disulfide-bindingen voorkomen. Tot voor enkele jaren was het aantal eiwitten, waarbij iets over de aard der disulfide-bindingen bekend was, beperkt tot zeer weinige als insuline ¹¹⁰⁾ en ribonuclease ¹¹¹⁾. In 1959 besprak Ma ¹¹²⁾ de mogelijkheden van bepaling der disulfide-groepen in eiwitten. Hij wees op een onbevredigende nauwkeurigheid bij verschillende bepalingsmethoden, o.a. de polarografie.

Intussen zijn er voor de gluteneiwitten wel aanwijzingen ¹⁰⁰⁾ dat althans een deel der disulfide-bindingen tussen de peptide-ketens voorkomt. Een nieuwe methode tot bepaling van disulfide-groepen is de bepaling volgens de „disulfide-interchange reaction” ¹¹³⁾.

Behalve de disulfide-bindingen die tussen de peptideketens kunnen voorkomen zijn er theoretisch gesproken nog andere mogelijkheden van vertakking in eiwitmoleculen, n.l. vertakkingen via de tweede carboxyl-groep van glutaminezuur of asparaginezuur of via de tweede NH₂-groep van lysine of arginine. Hiernaast bestaat nog de mogelijkheid van cyclische peptiden of van esterbindingen.

Sanger ¹¹⁴⁾ toonde aan dat van alle eiwitten welke met de dinitrofluorbenzeenmethode bestudeerd zijn, de ε-aminogroepen van de lysinemoleculen vrij zijn. Dit bewijst dat deze moleculen niet aan vertakkingen deel nemen.

Desnuelle ¹¹⁵⁾ zegt in een recent overzicht dat zowel cyclische ketens als ketens met vertakkingen via de vrije COOH- of NH₂-groepen van de meerbasische aminozuren in eiwitten onbekend zijn, behalve in enkele uitzonderlijke polypeptiden.

Waldschmidt-Leitz ¹¹⁶⁾ meent dat deelneming van esterbindingen aan de eiwitstructuur nauwelijks voorkomt met uitzondering van de fosfoproteïden. Waldschmidt-Leitz c.s. ¹¹⁷⁾ vonden onlangs dat het N-eindstandige glutamine zuur in hordeïne grotendeels via de γ-carboxyl-groep aan het eiwit gebonden moet zijn.

Op grond van het bovenstaande en van eigen experimenten menen we dat het verantwoord is aan te nemen dat vertakkingen niet van invloed zijn op de toxiciteit van gliadine voor lijders aan idiopathische steatorrhoe.

5. Analyse der zure peptide-fractie (tarwe-eiwitfractie IV)

De aminozuursamenstelling der zure peptide-fractie was met tweedimensionale papierchromatografie onderzocht (zie Fig. 5); gevonden werden :

alanine	histidine	proline
asparaginezuur	isoleucine	serine
cystine	leucine	threonine
glutaminezuur	lysine	tyrosine
glycine	fenylalanine	valine

In verder onderzoek werd de mogelijkheid nagegaan de zure peptidefractie in twee of meer componenten te splitsen met behulp van zetmeelgel-elektroforese en gelfiltratie over Sephadex. Verdere gegevens werden verkregen door aanvullende proeven met papierelektroforese, door ketenlengtebepalingen en door bepaling van het gehalte van cystine en cysteine in de zure peptidefractie en in de geoxideerde zure peptidefractie met behulp van de moderne disulfide-uitwisselingstechniek ¹¹³).

Een kwantitatieve aminozuurbepaling der fractie werd voor ons uitgevoerd op het Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek te Utrecht *).

5. 1. Opzet van het onderzoek, resultaten en discussie

Uit tarwegluten, afkomstig van onbehandelde Hollandse tarwebloem **), werd volgens de in hoofdstuk IV, pag. 39, beschreven werkwijze gliadine bereid. Het eiwitgehalte der gebruikte gluten, bepaald volgens Kjeldahl ***), bedroeg 80,6%.

De afbraaksnelheid onder invloed van de gebruikte pepsine en trypsine werd bepaald door een hoeveelheid van het betreffende enzym te brengen bij een suspensie van 1 g gliadine in 20 ml gedestilleerd water, respectievelijk bij een 7% 's natriumcaseinaatoplossing. Na een inwerking van de pepsine bij 37°C gedurende 6 uur nam de hoeveelheid niet-eiwitstikstof niet verder toe. De inwerking van trypsine op de natriumcaseinaat nam bij 37°C na 24 uur niet verder toe.

De uit de meting van de snelheid van afbraak met deze enzymen door ons getrokken conclusie is dat de door ons toegepaste inwerkingstijd van 2 dagen ruim voldoende is.

Uit de gliadine werd volgens Hoofdstuk IV de zure peptidefractie bereid. De dialyse der zure peptidefractie vond plaats gedurende 3 uur bij kamertemperatuur in het apparaat van Sartorius te Göttingen (Fig. 4). Door deze korte dialyse bleef vrij wat NaCl in de gevriesdroogde zure peptiden achter. (Het gemiddeld eiwitgehalte bedraagt slechts 19%.)

*) Wij zeggen de Directie van dit Instituut, benevens Dr. J. H. van de Kamer en Drs. F. Slomp gaarne dank voor hun bemiddeling en hulp.

**) Wij zeggen de Firma Honig te Koog aan de Zaan gaarne dank voor hun speciale zorg bij de bereiding dezer gluten.

***) De stikstofbepalingen werden uitgevoerd door Drs. P. W. Hendrikse, die wij hiervoor dank zeggen.

De verkregen zure peptidefractie was niet kleurbaar met ninhydrine, maar wel met amidozwart 10 B.

Een splitsing der fractie door middel van zetmeel-gel-elektroforese bleek niet mogelijk. Onder de gekozen omstandigheden (zie experimenteel gedeelte) was de diffusie der peptide-fractie te groot.

Bij gel-filtratie met Sephadex G 75 medium werd uit de zure peptide-fractie een hoofdcomponent en een drietal nevencomponenten verkregen (zie Fig. 8).

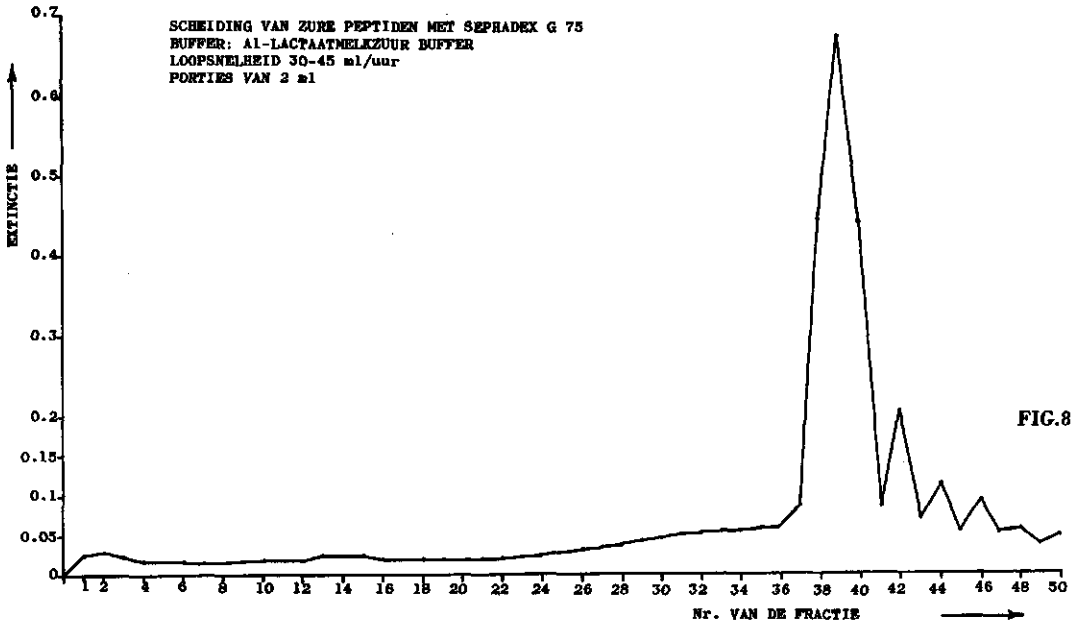


FIG. 8

Met papierelektroforese, uitgevoerd met veronal/veronalnatrium-buffer (pH 8,6) gelukte de splitsing der zure peptide-fractie niet.

De bepaling der ketenlengte der zure peptidefractie geschiedde volgens een werkvoorschrift afkomstig van het Biochemisch Laboratorium der R.U. te Groningen (directeur: Prof. Dr. M. Gruber *).

De gevonden gemiddelde ketenlengte der onderzochte zure peptiden bedraagt 35 aminozuren/molecuul. Wanneer rekening gehouden wordt met de hieronder te vermelden kwantitatieve aminozuursamenstelling der fractie kunnen wij als benadering van het molecuulgewicht 4700 noemen.

Met de disulfide uitwisselingsreactie ¹¹⁹) werd het gehalte aan cystine

*) Wij danken Prof. Dr. M. Gruber voor de toezending van dit voorschrift.

+ cysteine in de zure peptidefractie en in de met permierenzuur geoxideerde zure peptidefractie bepaald. Het gehalte cysteine + half-cystine der zure peptidefractie bedraagt 1,7%, dat van het geoxideerde produkt bedraagt 0%. Dit laatste stemt overeen met het door Haex et al.¹⁰⁶⁾ gevonden. De kwantitatieve aminozuursamenstelling der zure peptidefractie, op het C.I.V.O. te Utrecht bepaald in het zure hydrolysaat, is, uitgedrukt in moleculaire procenten als volgt :

alanine	2,2	leucine	5,4
arginine	0,7	lysine	0,7
asparaginezuur	3,2	methionine	spoor
cystine + cysteine	2,3	proline	20,4
fenylalanine	4,9	serine	5,6
glutaminezuur	42,3	threonine	2,3
glycine	4,4	tyrosine	1,4
histidine	0,8	valine	3,7
isoleucine	2,3		

Bij vergelijking van dit resultaat met hetgeen met de tweedimensionale papierchromatografie werd gevonden blijken de resultaten overeen te stemmen, behoudens de afwezigheid van arginine en methionine in het laatste geval.

Het verlies van methionine en ook van tryptofan, dat in beide gevallen afwezig is, kan aan omzettingen bij de zure hydrolyse worden toegeschreven.

Daar bovenstaande kwantitatieve aminozuur-analyse op een peptide-mengsel is uitgevoerd zijn verdere conclusies niet mogelijk.

5. 2. Experimenteel gedeelte

5. 2. 1. De bereiding der fracties in het aanvullende onderzoek

Uit 2 x 1 kg gluten werden achtereenvolgens opbrengsten van 216 g (21,6%) en 350 g (35,0%) gliadine verkregen.

Opbrengst Fractie II : 41,0% der gliadine (36,9 g).

Fractie III : 9,0% der gliadine (8,0 g).

Fractie IV : a)	28%	d)	45%
b)	30%	e)	52%
c)	55%	f)	14%

5. 2. 2. Papierelektroforese

Hierbij werd gebruik gemaakt van een L.K.B. papierelektroforese apparaat. Het potentiaal verschil bedroeg 10 V/cm (bij 0,5 — 1 m A).

Er werd 50 μ l der zure peptidefractie, opgelost in water, opgebracht. Na een gemiddelde looptijd van 4 uur werd gedroogd en gekleurd met 0,2% ninhydrine in aceton of met 0,2% amidozwart 10 B.

5. 2. 3. e) Zetmeel-gel-elektroforese

Ook voor deze techniek werd het onder 5. 2. 2. genoemde L.K.B.-apparaat gebruikt.

Gels van de volgende samenstelling werden toegepast:

I. Tris gel + 7 M ureum (pH 5,6)

8,75 ml Tris (hydroxy amino) methaan buffer 0,75 M
11,0 g gehydrolyseerd zetmeel (ex Connaught, Canada)
36,75 g ureum.
49,75 ml water.

Het gel werd bij 70°C gegoten.

II. Tris gel zonder ureum (pH 8,6)

100 ml 0,1 M Trisbuffer.
12,4 g zetmeel.

Dit gel werd kokend gegoten.

III. Lactaat gel + 3 M ureum (pH 4,1)

79,5 ml lactaatbuffer.
15,75 g ureum.
11,5 g zetmeel.

Het gel werd na 1 x opkoken gegoten.

Er werd 75 μ l oplossing van zure peptiden per strook opgebracht. Het voltage bedroeg 175 V/20 cm (bij 27—30 mA) en de looptijd gemiddeld 16 uur. Het gel werd horizontaal doorgesneden. De onderzijde werd gekleurd met 0,1% amidozwart 10 B in 7% 's azijnzuur. Er werd ontkleurd in 7% 's azijnzuur.

5. 2. 4. Ketenlengtebepaling

Bij de hydrolyse, die onderdeel van deze bepaling is, gaat tryptofan verloren.

Het voorschrift luidt als volgt: 3 mg peptide en 0,2 ml constant kokend HCl (6 N), wordt in een Pyrex buisje in vacuo ingesmolten. Het buisje wordt 24 uur in kokende toluen gehangen (K.p. 110°C). Na opening van de buis wordt het zuur verwijderd in een vacuüm-exsiccator boven vast NaOH. Het residu wordt opgenomen in 1 ml water, waarna in een vacuüm-exsiccator opnieuw wordt gedroogd. Dit laatste proces wordt nog twee keer herhaald, opdat het HCl volledig wordt verwijderd. Het residu wordt opgenomen in 3 ml water en 0,1 ml hiervan wordt weer tot 3 ml verdund.

Om de kleurintensiteit vóór hydrolyse te bepalen wordt 1 mg peptide afgewogen en opgelost in 10 ml water.

In 6 reageerbuizen worden respectievelijk afgemeten 0,5; 0,4 en 0,3 ml van de gehydrolyseerde en van de ongehydrolyseerde peptide-oplossingen, waarna in elk der buizen met water wordt aangevuld tot 0,5 ml. Bovendien wordt in 3 buizen 0,5 ml water gedaan als blanco.

Vervolgens wordt toegevoegd :

- 1 ml van de KCN-pyridine-oplossing.*
- 1 ml van de fenoloplossing in alcohol** en
- 0,2 ml van de ninhydrienoplossing.***

* 1 ml 0,01 M KCN-oplossing in water wordt met pyridine aangevuld tot 50 ml.

** 40 g fenol opgelost in 10 ml absolute alcohol.

*** 300 mg ninhydrien wordt opgelost in 6 ml absolute alcohol.

De inhoud der buizen wordt gemengd en de buizen worden met aluminiumdoppen afgesloten en 5 minuten in een kokend waterbad verwarmd. Na afkoelen worden de doppen er weer afgehaald, worden de reactiemengsels met 7,3 ml 60% alcohol verdund tot 10 ml en worden de buizen goed geschud.

De extincties van de oplossing bij 570 m μ worden gemeten, verminderd met de gemiddelde extinctie van de blanco's en omgerekend tot extinctie per ml peptide-oplossing (door vermenigvuldiging van respectievelijk 2; 2,5 en 3,3).

De gemiddelden van de verkregen waarden werden tenslotte uitgedrukt als extinctie per μ g peptide. De verhouding van de zo verkregen waarden voor gehydrolyseerd en ongehydrolyseerd peptide geeft aan uit hoeveel aminozuurresten het peptide is opgebouwd.

5. 2. 5. Bepaling van het gehalte aan cystine + cysteine

Met de methode van Glazer en Smith¹¹³⁾ voor de bepaling van cystine + cysteine, de disulfide uitwisselingsreactie, werd het cystinegehalte der zure peptidefractie en der met permierenzuur geoxideerde zure peptidefractie geverifieerd. De bepaling geschiedt (kort samengevat) als volgt: Een afgewogen hoeveelheid van het eiwitpreparaat wordt opgelost in 9,6 N HCl, zodanig dat de eiwitconcentratie tussen 0,025 en 0,20 μ mol. per ml ligt. De oplossing wordt dan in 2 gelijke delen verdeeld. Een deel

fungeert als blanco. Aan het andere deel wordt 1,2 mg di-DNP-cystine *) per ml toegevoegd. De oplossingen worden van de lucht afgesloten en in een waterbad van $39^{\circ} \pm 0,03^{\circ}\text{C}$ geplaatst, en op geregeld tijden worden monsters van 1 ml genomen. Deze monsters worden in buizen met 1,5 ml water en 3,0 ml ether gebracht. De overmaat di-DNP-cystine wordt eenmaal met 6 ml en 3 maal met 3 ml ether geëxtraheerd. De ether die in de waterfase aanwezig is wordt in vacuo verdampt. De waterfase wordt kwantitatief overgebracht naar een maatkolfje van 25 ml en met 6 N HCl tot de merkstreep aangevuld.

Van de verdunde waterfase en van de blanco wordt de absorptie bij $357\text{ m}\mu$ in een 1 cm-cuvet gemeten.

Het aantal μmol . mono-DNP-cystine per ml reactiemengsel = $25 A/15 = 1,67 A$, waarbij A de gemeten absorptie bedraagt.

5. 2. 6. Gelfiltratie met Sephadex

Na enkele oriënterende proeven, waarbij zure peptiden op Sephadex G-25 (medium) en G 75 (medium) kolommen gebracht werden werd een optimale scheiding verkregen op Sephadex G-75 (medium). De kolomafmetingen zijn $24 \times 2,2$ cm. 7 g Sephadex G 75 (medium) werd in 150 ml Al-lactaat-melk-zuurbuffer (pH 3,1; ionensterkte 0,1) gebracht. Na oproeren werd vrij snel gedecanteerd; dit werd nog tweemaal herhaald. De Sephadex werd gedurende de nacht in de buffer gelaten om te zwellen. De volgende morgen werd de kolom gevuld.

50 mg zure peptiden werden, opgelost in Al-lactaatbuffer, opgebracht. Fracties van 2 ml werden opgevangen. De extinctie werd gemeten bij $280\text{ m}\mu$ in de Unicam SP-500 spectrofotometer.

*) DNP = dinitrophenyl. De di-DNP-cystine werd bereid door de heer H. van der Wel, die wij hiervoor gaarne danken.

PATIËNTENTEST MET TARWE-EIWITFRACTIES

1. Inleiding

In Hoofdstuk III werden de eisen waaraan een patiëntentest moet voldoen reeds genoemd. De uitgevoerde tests worden in dit hoofdstuk besproken.

Een nadeel van de patiëntentest is dat het aantal personen waarbij een bepaalde fractie op toxiciteit onderzocht kan worden meestal zeer gering is. Bij een betrekkelijk zeldzaam voorkomende ziekte als de idiopathische steatorrhoe geldt deze beperking in sterke mate. De bereiding van de benodigde hoeveelheid der te onderzoeken fractie is anderzijds zeer omslachtig omdat betrekkelijk grote hoeveelheden van een preparaat op laboratoriumschaal moeten worden bereid.

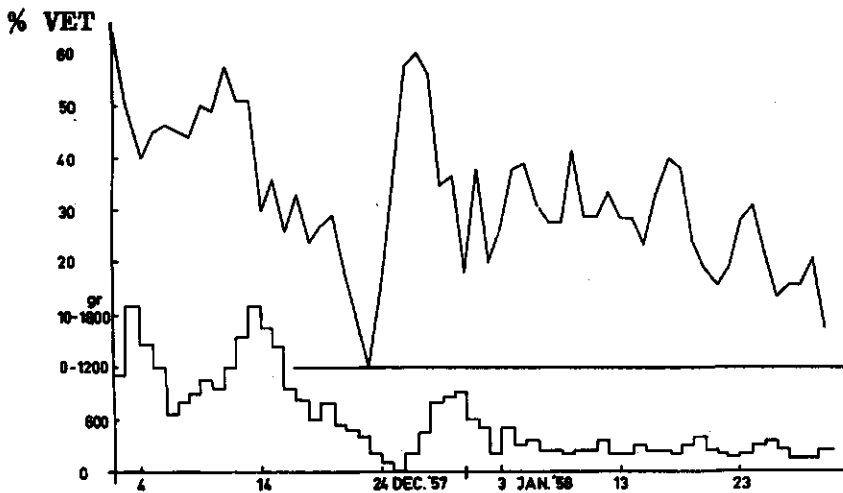
Figuur 9 en 10 tonen aan hoe het percentage niet geresorbeerd vet in de ontlasting daalt wanneer bij 2 verschillende patiënten, lijdende aan idiopathische steatorrhoe, een glutenvrij dieet wordt gegeven. De snelheid van daling is per individu verschillend. Bij de meeste patiënten blijft het percentage niet geresorbeerd vet in de ontlasting, ook bij een lang volgehouden glutenvrij dieet, hoger dan bij normale personen. Bij deze laatsten bedraagt het gemiddeld 5%; bij lijdens aan idiopathische steatorrhoe meestal ruim 10%.

In beide figuren is het gewicht der geproduceerde ontlasting gedurende de proef vermeld. Ook hier zijn individueel grote verschillen.

Hoe groot de vetuitscheiding bij deze patiënten kan zijn, blijkt uit Fig. 9, waar bij de aanvang van het glutenvrij dieet het „glijdende driedagsgemiddelde” 60% bedraagt. Wanneer niet gemiddeld wordt komen er dagen van zelfs nog iets meer dan 100% voor. Op deze dagen wordt er dus meer vet uitgescheiden dan er opgenomen is.

2. Het glutenvrije dieet

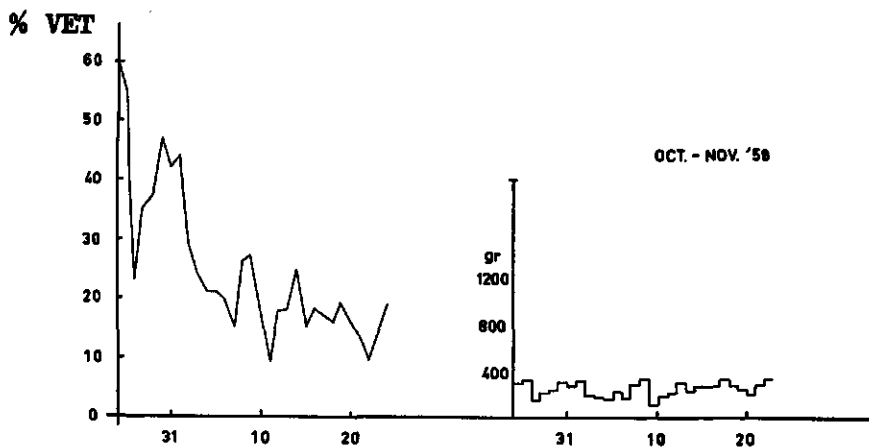
Bij de samenstelling van een glutenvrij dieet dient rekening gehouden te worden met het feit dat er tarwemeel kan voorkomen in voedingsmiddelen of vernaperingen waarin men dit op het eerste gezicht niet verwacht, b.v. in zuurtjes. Het dieet mag uitsluitend componenten bevatten waarvan vast staat dat er geen tarwemeel of tarwegluten in is verwerkt. Verder dient de hoeveelheid vet per dag beneden 100 g te blijven terwijl voor een voldoende hoeveelheid eiwit en calorieën gezorgd dient te worden. Een voorbeeld van een glutenvrij dieet, zoals dit aan



Clin. nr 1391/57

FIG. 9

Afname van het percentage niet geresorbeerd vet bij glutenvrij dieet. De onderste lijn geeft de hoeveelheid faeces aan. De waarden zijn „glijdende driedagsgemiddelden” (zie tekst).



Clin. nr. 1150/58

FIG. 10

Afname van het percentage niet geresorbeerd vet bij glutenvrij dieet. De rechter curve geeft de hoeveelheid faeces aan. De waarden zijn „glijdende driedagsgemiddelden” (zie tekst).

de patiënten waarmede het onderzoek werd uitgevoerd gegeven werd, volgt hieronder.

Voorbeeld van een glutenvrij dieet

- Ontbijt : 150 g glutenvrij wit brood zonder korst.
Margarine van het rantsoen.
50 g mager vleesbeleg uit blik.
Zoet beleg.
Een kopje thee met suiker.
- 10 uur : 1 beker koffie met 30 g melkpoeder.
- 11 uur : 1 beker koffie met 35 g melkpoeder.
- 12 uur : 100 g aardappelen.
100 g zachte groente.
100 g gemalen vlees (biefstuk).
100 g compote.
- 14 uur : Een kopje thee met suiker.
2 glutenvrije lange vingers. *)
1 banaan.
- 16 uur : 1 beker koffie met 30 g Protifar. **)
- 18 uur : 150 g glutenvrij wit brood zonder korst.
Margarine van het rantsoen.
50 g mager vleesbeleg.
Zoet beleg.
140 g tomatensoep.
- 's avonds : 4 vierkante glutenvrije biscuits. *)
2 uitgeperste sinaasappels met suiker.
Thee met suiker.
1 banaan.

Per dag wordt 50 g margarine gebruikt.

Berekend eiwit/dag: 92,05 g.

Berekend vet/dag: 72-71 g.

Berekende „koolhydraten” ca. 380 g.

Receptuur glutenvrij brood

*) Vervaardigd en ter beschikking gesteld door de N.V. Verkade te Zaandam.

**) Melkeiwit-preparaat, vervaardigd door N.V. Nutricia-Zoetermeer.

De samenstelling van het in bovenstaand voorbeeld genoemde glutenvrije brood is als volgt :

Boekweitenbloem	250 g
1 ei	50 g
Gist	5 g
Karnemelk	250 g
Water	125 g
Melkpoeder	20 g
	700 g

Bij het bakken vindt indrogen plaats. Bij normaal brood is het percentage gewichtsverlies tengevolge van indrogen tijdens het bakken ongeveer 16%.

3. Het onderzoek der faeces

De faeces der patiënten werd per 24 uur verzameld en gewogen. In een gemiddeld monster werd het aantal grammen hogere vetzuren per 100 g faeces volgens de methode van Van de Kamer bepaald. Hieruit werd het percentage niet geresorbeerd vet berekend. In verband met de darmlediging wordt in de grafieken in navolging van Van de Kamer het „glijdend driedagsgemiddelde” aangegeven.

4. De bij de test toe te dienen hoeveelheid van de betreffende fractie

Voor de beoordeling van het bij een test verkregen resultaat is het van groot belang te weten hoe de dosering der onderzochte fracties is geweest.

In Tabel 7 geven we een overzicht van de bereide fracties en van de verkregen gemiddelde opbrengst dezer fracties. In de laatste kolom vermelden we welke dosis stof vergeleken moet worden met de 24 gram gluten, die per dag voorkomen in het menu van een normaal persoon. Wij hebben hierbij het cijfer voor tarwe eiwitfractie V en tarwe eiwitfractie VI gelijk gesteld aan dat van tarwe eiwitfractie IV omdat de theoretische opbrengst voor beide fracties 100% van tarwe eiwitfractie IV bedraagt.

TABEL 7

Tarwe-eiwitfractie	Gemiddelde opbrengst	Verhouding der opbrengsten:	Theoretisch overeenkomende hoeveelheden:
Gliadine	40% der gluten	10 g	10 g
Tarwe eiwitfractie II	40% der gliadine	4 g	4 g
Tarwe eiwitfractie III	10% der gliadine	1 g	1 g
Tarwe eiwitfractie IV	40% t.o.v. II	1,6 g	1,6 g
Tarwe eiwitfractie V	50% t.o.v. IV	0,8 g	1,6 g
Tarwe eiwitfractie VI	50% t.o.v. V	0,4 g	1,6 g

In Tabel 8 geven we een overzicht van de in de verschillende tests gegeven dosering.

TABEL 8

Dosering	Geteste fractie
0,5 g en 1,0 g/dag	III
4,5 g en 13,5 g/dag	II
13,5 g/dag	II
1,1 g en 1,8 g/dag	IV
1,3 g/dag	IV
0,5 g en 1,0 g/dag	IV
350 mg en 600 mg/dag	V
200 mg/dag	VI
200 mg/dag	VI

Voor de beoordeling der tests is het van belang dat de dosering der fracties niet uitgaat boven de hoeveelheid tarwegluten in een normaal dagmenu.

De dosis bij het testen van fractie II is hoger dan in de laatste kolom van tabel 7 is berekend. Dit houdt in dat bij deze test het resultaat niet in kwantitatieve zin op de overige uitkomsten betrokken mag worden. In die gevallen waar de in tabel 8 gegeven dosering belangrijk lager is dan in de laatste kolom van tabel 7 is voorgeschreven, is steeds een positief resultaat verkregen.

Hoewel de conclusie uit deze laatstbedoelde tests op deze wijze vaststaat, is de kwantitatieve zijde van het effect slechts als benadering aan te geven.

5. Het testen van tarwe eiwitfractie III

Fractie III, verkregen na onder verminderde druk indampen van de rest der in water oplosbare fractie, ontstaan door inwerking van pepsine en vervolgens trypsine op gliadine, werd bij een patiënt, lijdende aan idiopathische steatorrhoe, getest en negatief bevonden.

Van 8-21 februari 1958 kreeg deze patiënt (No. 1) een glutenvrij dieet. De eiwitbalans schommelde rond zeer licht negatief en het percentage niet geresorbeerd vet lag tussen 3,5 en 5,0%.

Van 21 februari-3 maart werd 0,5 g fractie III per dag toegediend.

De stof was bij de bereiding van het glutenvrije brood aan het deeg toegevoegd. Het percentage niet geresorbeerd vet bleef constant. De N-balans werd negatief (tot 6 g per dag).

Van 3-19 maart kreeg de patiënt 1,0 g fractie III per dag. De toediening geschiedde als voorheen. Het percentage niet geresorbeerd vet bleef constant 3% en de N-balans schommelde rond het N-evenwicht.

De test werd niet langer voortgezet.

6. Het testen van tarwe eiwitfractie II

Fractie II verkregen door precipitatie met aceton van de in water oplosbare fractie, ontstaan door inwerking van pepsine en trypsine op gliadine, werd bij twee patiënten, lijdende aan idiopathische steatorrhoe, getest en toxisch bevonden.

De eerste patiënt was dezelfde als waarbij de tarwe eiwitfractie III getest werd.

Van 19-24 maart 1958 werd aan deze patiënt (No. 1) glutenvrij dieet gegeven als overgang naar het testen der fractie II.

Van 24 maart-18 april werd 4,5 g fractie II per dag gegeven. Tot 27 maart werd deze hoeveelheid bij de bereiding van het glutenvrije brood aan het deeg toegevoegd. Deze wijze van toedienen kon vanaf die datum geen verdere doorgang vinden aangezien de patiënt het brood geheel of gedeeltelijk weigerde te gebruiken. Vanaf 28 maart-1 april werd $2\frac{1}{4}$ gram met het brood genuttigd en de overige $2\frac{1}{4}$ gram in gelatine capsules gegeven. Vanaf 1 april werd geen fractie aan het glutenvrije brood toegevoegd. De 4,5 g fractie II per dag werd in gelatine capsules toegediend.

Het percentage niet geresorbeerd vet schommelde in deze periode tussen de 3 en $4\frac{1}{2}\%$ terwijl het aan het einde dezer periode verder steeg. De N-balans vertoonde enige sterke schommelingen maar bewoog zich uiteindelijk rond de waarde van stikstof-evenwicht. Enkele dezer schommelingen werden door technische onvolkomenheden veroorzaakt.

Van 18-24 april werd 13,5 g fractie II per dag toegediend. Het percentage niet geresorbeerd vet bleef even beneden de 5%. De N-balans was in evenwicht.

Op 24 en 25 april steeg het percentage niet geresorbeerd vet tot 15%, welke stijging doorging in de periode van 26-30 april, waarin 8 g gluten/dag in capsules werd toegediend om de gluten-gevoeligheid der patiënt te controleren. Gezien de langzame reactie

van deze patiënt werd de voortgezette stijging van het percentage niet geresorbeerd vet niet aan de juist gegeven gluten doch aan de eerder gegeven fractie II toegeschreven.

De glutentoeiening werd op 30 april gestaakt. Het percentage niet geresorbeerd vet daalde daarna tot 3-4,5%, met uitzondering van een top op 5 mei van 9,5%. Van 30 april-14 mei kreeg de patiënt een glutenvrij dieet.

Deze eerste test van de fractie II werd als een vertraagde zwak positieve reactie beschouwd.

7. De tweede test der tarwe eiwitfractie II

De tweede test van het acetonprecipitaat werd uitgevoerd bij patiënt 2, opgenomen eind nov. 1957 en sedert die datum met een glutenvrij dieet behandeld. Het percentage niet geresorbeerd vet in de ontlasting daalde in deze periode tot even boven de normale waarde (zie Fig. 9).

Van 31 juli t/m 5 aug. 1958 werd 13,5 g acetonprecipitaat per dag aan deze patiënt toegediend. Het precipitaat werd bij de bereiding van het glutenvrije brood aan het deeg toegevoegd. Het percentage niet geresorbeerd vet steeg op 1 augustus tot 32,0% en bereikte op 4 aug. een waarde van 228,4%. Op deze laatste datum werd de proef gestopt en werd opnieuw glutenvrij dieet toegediend. Het percentage niet geresorbeerd vet in de ontlasting daalde geleidelijk en bereikte eind augustus een waarde van 12-15%.

Aan de patiënt werd 4 g sulfaguanidine per dag toegediend, met uitzondering van de periode van 8-25 augustus.

Uit de sterke reactie van deze patiënt op de tarwe eiwitfractie II concluderen wij dat deze fractie de toxische component of componenten uit de gliadine bevat.

Van sulfaguanidine is bekend dat deze de vetresorptie bevordert. De onderzochte patiënt reageerde dus ondanks het toedienen van sulfaguanidine sterk positief, d.w.z. met vermindering van de vetresorptie.

8. Het testen der tarwe eiwitfractie IV

Deze fractie, de zure peptide fractie, werd in totaal 3 maal op toxiciteit getest, n.l. 2 maal achtereenvolgend bij patiënt 2 en nog eenmaal bij patiënt 3.

Eerste test der tarwe eiwitfractie IV

Van 15 september t/m 18 september 1958 werd deze fractie aan patiënt 2 toegediend. Op 15, 16 en 17 september werd per dag 1,1 g gevriesdroogde zure peptiden toegediend terwijl op 18 sep-

tember 1,8 g van deze zure peptiden werd gegeven.

Het percentage niet geresorbeerd vet vertoonde op 19 september een top van 34%, was hierna weer lager en steeg geleidelijk tot 43% op 28 september. Hierna volgde een snelle daling tot op 10 oktober een waarde van 10% werd bereikt.

De N-balans werd van 13 september tot 12 oktober bij patiënt 2 bepaald en leverde een gelijkmatig beeld op, met kleine schommelingen rond de toestand van stikstof evenwicht.

Met ingang van 18 september kreeg de patiënt een glutenvrij dieet. De zure peptiden werden opgelost in sinaasappelsap met suiker en zo toegediend. De helft van het sinaasappelsap werd 's morgens om 10 uur genuttigd, de andere helft te 14 uur. Tot 24 september werd 4 g sulfaguanidine per dag aan de patiënt toegediend.

In een volgende test werd nagegaan hoe de reactie der patiënt op het preparaat is, wanneer de sulfaguanidine geheel wordt weggelaten.

Tweede test der tarwe eiwitfractie IV

In deze test (Fig. 11) was het de bedoeling gedurende maximaal 5 dagen, ingaande 30 oktober 1958, 1,3 g der tarwe eiwitfractie IV aan patiënt 2 toe te dienen.

4.35 g gevriesdroogde zure peptiden werden toegevoegd aan een gedialyseerde oplossing van zure peptiden. In deze laatste oplossing kwamen 3,6 g zure peptiden voor. Van de verkregen heldere, lichtgele oplossing, in totaal bevattend 7,95 g zure peptiden, bedroeg het volume 600 ml. De licht zuur smakende vloeistof werd in 6 gelijke hoeveelheden verdeeld in flesjes gedaan en bij -30°C bewaard.

De toediening der fractie aan de patiënt geschiedde door de bovenbeschreven oplossing te mengen met sinaasappelsap, waaraan ter versterking van de smaak wat sinaasappelpoeder werd toegevoegd.

Nadat op 30 oktober 1958 's morgens te 10 uur 50 ml zure peptide-oplossing aan de patiënt was toegediend ontstond onmiddellijk een vetachtige ontlasting. In verband met de inmiddels opgetreden buikklachten werd 's middags slechts 25 ml zure peptide-oplossing genuttigd. De buikklachten bleven aanhouden, waarbij 11 maal een vetontlasting optrad. In totaal werd op deze dag 1,0 g zure peptide ingenomen.

Reeds op 30 oktober 1958 steeg het percentage niet geresorbeerd vet in de ontlasting tot 81,1%, waarna het daalde en vervolgens

weer steeg tot 50%. Vanaf 3 november werd 2 g sulfaguanine per dag toegediend. Het percentage niet geresorbeerd vet daalde vervolgens, tot op 15 november de gemiddelde waarde van 15% werd bereikt (zie Fig. 11). Op 11 november werd de sulfaguanine toediening gestopt.

In deze tweede test is gebleken dat door het weglaten der sulfaguanine de positieve reactie van patiënt 2 op de tarwe eiwitfractie IV versterkt is.

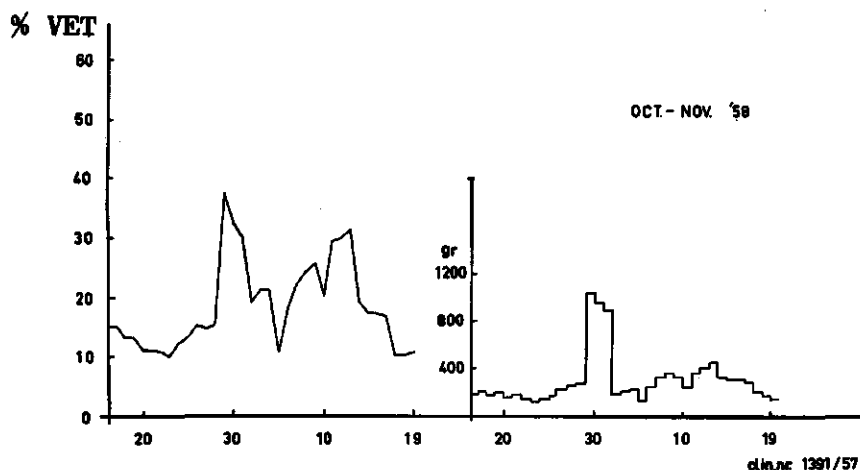


FIG. 11

TWEEDE TEST TARWE-EIWITFRACTIE IV.

Links: percentage niet geresorbeerd vet. Rechts: hoeveelheid faeces.
De waarden zijn „glijdende driedagsgemiddelden” (zie tekst).

Derde test der tarwe eiwitfractie IV

Patiënt 3 werd 24 oktober 1958 in balans genomen. Aanvankelijk werden alleen de maaltijden op het laboratorium genuttigd. De verzamelde faeces werden op het laboratorium onderzocht.

De patiënt werd van 1 december tot 24 december opgenomen. In de hiernavolgende periode werden weer alleen de maaltijden op het laboratorium genuttigd.

Op het glutenvrij dieet daalde het percentage niet geresorbeerd vet in de ontlasting van 54 tot ca. 12% (zie Fig. 12). De algemene toestand van de patiënt verbeterde voorts belangrijk.

Van 3-9 december werd 0,5 g zure peptiden per dag toegediend en van 9-11 december 1,0 g. Deze peptiden waren afkomstig van dezelfde oplossing als die, welke in de voorgaande test aan patiënt 2 waren toegediend.

De toediening geschiedde op dezelfde wijze als in de voorgaande test. Het percentage niet geresorbeerd vet steeg op 9 december tot 50% en bereikte na enkele schommelingen op 15 december een waarde van 86%. De toestand der patiënt was tamelijk slecht. Met ingang van 16 december werd 4 g sulfaguanidine per dag toegediend, waarna het percentage niet geresorbeerd vet geleidelijk daalde tot eind december de gemiddelde waarde van 12% werd bereikt (zie Fig. 12).

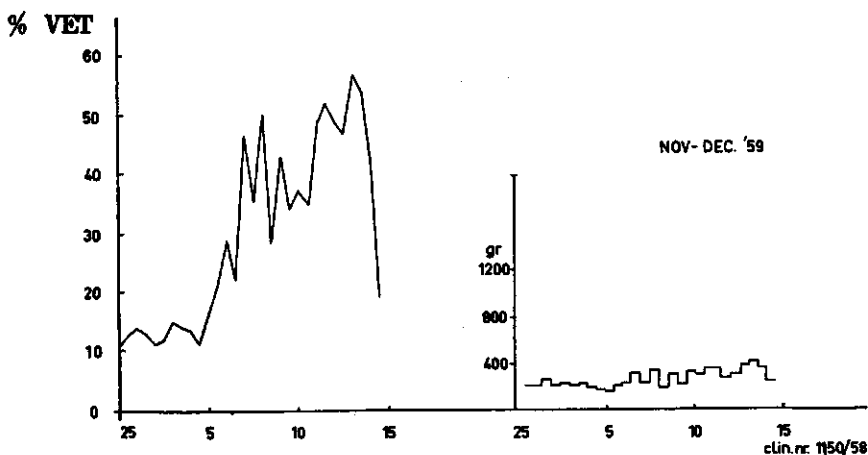


FIG. 12

DERDE TEST TARWE-EIWITFRACTIE IV.

Links: percentage niet geresorbeerd vet. Rechts: hoeveelheid faeces.

De waarden zijn „glijdende driedagsgemiddelden” (zie tekst).

Uit deze test concluderen we dat het resultaat der beide tests bij patiënt 2 er door is bevestigd.

9. Het testen van tarwe eiwitfractie V

Deze fractie werd tweemaal achtereenvolgend bij patiënt 3 getest. De eerste maal was de dosis 350 mg/dag, de tweede maal 600 mg/dag.

Eerste test der tarwe eiwitfractie V

Nadat patiënt 3 van 17 december tot 7 januari 1959 4 g sulfaguanidine per dag kreeg toegediend schommelde het percentage niet geresorbeerd vet in de ontlasting eind januari 1959 tussen de 10 en 15%.

De porties 1 t/m 11 der met permierenzuur geoxideerde zure peptiden werden gemengd en in hoeveelheden van 350 mg afgewogen. Per dag werd deze hoeveelheid opgelost in twee porties sinaasappelsap toegediend.

Het percentage niet geresorbeerd vet in de ontlasting vertoonde enkele pieken van 30%, n.l. op 2, 8 en 15 februari, waarna weer een daling intrad. De patiënt gevoelde zich gedurende deze proef niet geheel wel.

Aangezien de toegediende dosis met permierenzuur geoxideerde zure peptiden aan de lage kant geweest was, werd de proef bij dezelfde patiënt met een hogere dosis geoxideerde zure peptiden herhaald.

Tweede test der tarwe eiwitfractie V

Na bovenstaande proef met geoxideerde zure peptiden bij patiënt 3 was het percentage niet geresorbeerd vet in de ontlasting weer tot 10 à 15% gedaald.

Van 9 t/m 12 maart 1959 en op 14 en 15 maart werd 600 mg geoxideerde zure peptiden per dag aan de patiënt toegediend. Voor deze proef werden gebruikt de porties geoxideerde zure peptiden 12 t/m 20. De geoxideerde zure peptiden werden in deze proef op dezelfde wijze als in de voorgaande test opgelost in twee glazen sinaasappelsap toegediend. Het percentage niet geresorbeerd vet steeg op 10 maart tot 51%, het daalde daarna tot ca. 25% en bereikte op 16, 18 en 21 maart waarden van 36, 39 en 42% waarna een daling volgde.

In Fig. 13 zijn de „glijdende driedagsgemiddelden” uitgezet. Hierdoor is de hoogst bereikte waarde hier lager, n.l. 34%.

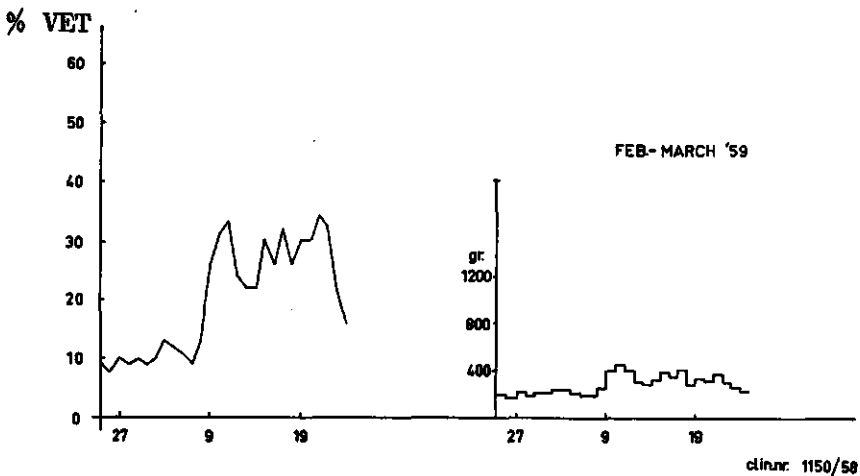


FIG. 13

TWEEDE TEST TARWE-EIWITFRACIE IV.

Links: percentage niet geresorbeerd vet. Rechts: hoeveelheid faeces.
De waarden zijn „glijdende driedagsgemiddelden” (zie tekst).

Met deze test werd bewezen geacht dat de met permierenzuur geoxideerde zure peptiden hun toxische werking nog niet hadden verloren.

10. Het testen der tarwe eiwitfractie VI

Deze fractie, verkregen door tarwe eiwitfractie V met broom te behandelen, werd getest bij 2 patiënten. Ook werd deze fractie nog aan een controle patiënt, niet lijdende aan idiopathische steatorrhoe, gegeven.

Eerste test der tarwe eiwitfractie VI

Van 30 november t/m 12 december 1959 werd aan patiënt 3 per dag 200 mg der fractie toegediend. Het preparaat werd in de compote gemengd.

Het percentage niet geresorbeerd vet, dat te voren rond 15% schommelde, ging op 5 december stijgen. Op 14 december werd in de „gemiddelde 3 dagscurve” een waarde van ruim 55% bereikt (zie Fig. 14).

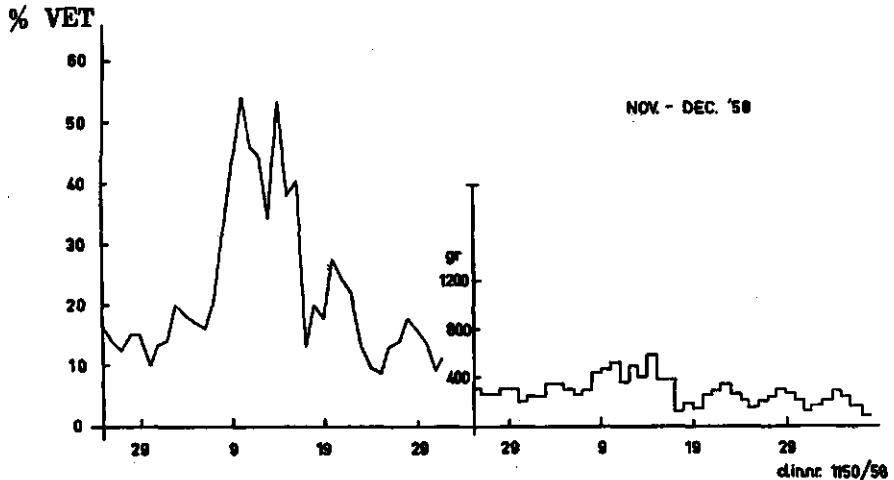


FIG. 14

EERSTE TEST TARWE-EIWITFRACTIE VI.

Links: percentage niet geresorbeerd vet. Rechts: hoeveelheid faeces.

De waarden zijn „glijdende driedagsgemiddelden” (zie tekst).

Tweede test der tarwe eiwitfractie VI

Aan patiënt 2 werd van 23 februari t/m 2 maart 1960 70 mg der fractie per dag toegediend en vervolgens van 3 t/m 17 maart 1960 nog 200 mg per dag. Het percentage niet geresorbeerd vet steeg op 6 maart van de bij deze patiënt tevoren bereikte ge-

middelste waarde van 5 tot 16%. De ontlasting was grijswit en vertoonde duidelijk het beeld van steatorrhoe (zie Fig. 15).

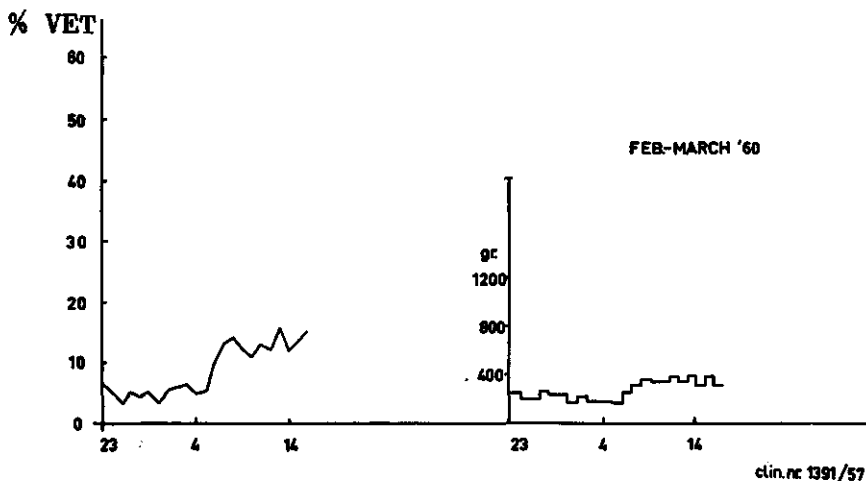


FIG. 15

TWEEDE TEST TARWE-EIWITFRACTIE VI.

Links: percentage niet geresorbeerd vet. Rechts: hoeveelheid faeces.
De waarden zijn „glijdende driedagsgemiddelden” (zie tekst).

Door de uitkomst van deze beide tests konden wij vaststellen dat de tarwe eiwitfractie VI toxisch werkte bij de onderzochte lijdende aan idiopathische steatorrhoe.

Van de tarwe eiwitfractie VI werd de werking ook nog nagegaan bij een controle patiënt, niet lijdende aan idiopathische steatorrhoe doch aan psychogene buikklachten.

Bovendien werden aan deze fractie de toxicologische eigenschappen in dierexperimenten vergeleken met de toxicologische eigenschappen van gliadine.

Controle van tarwe eiwitfractie VI

Aan patiënt 4, lijdende aan psychogene buikklachten, werd van 18 februari-6 maart 1960 200 mg der tarwe eiwitfractie VI toegediend. Zoals Fig. 16 aangeeft toonde de proefpersoon geen enkele reactie op de toediening. Het percentage niet geresorbeerd vet in de ontlasting bleef 2%.

Pharmacologische dierexperimenten

De conclusie van dit door Bijlsma te Utrecht uitgevoerde onderzoek was dat noch tarwe eiwitfractie VI, noch gliadine, praktisch gesproken giftig zijn voor normale muizen. Geen der beide stoffen blijkt histamine vrij te maken.

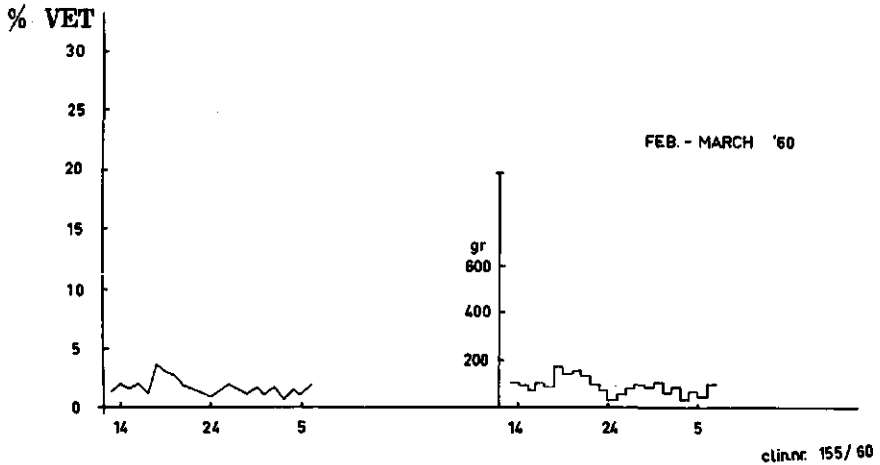


FIG. 16

CONTROLE TEST TARWE-EIWITFRACTIE VI.

Links: percentage niet geresorbeerd vet. Rechts: hoeveelheid faeces.
De waarden zijn „glijdende driedagsgemiddelden” (zie tekst).

HOOFDSTUK VI

DISCUSSIE

In Hoofdstuk I bespreken we, na een kort overzicht over de tot 1954 omtrent de tarwe-eiwitten bekende gegevens, de recente onderzoeken over de niet in water oplosbare gluten-eiwitten. Duidelijk komt naar voren dat uit de vele sedert genoemd jaar verrichte onderzoeken nog geen duidelijke stand van zaken met betrekking tot de structuur dezer tarwe-eiwitten naar voren komt. Door het werk van Rohrllich c.s. en van Jones is twijfel gerezen of het door Hess gemaakte onderscheid tussen „Zwickel-“ en „Haftprotein“ juist is.

Op grond van de met elektroforese verkregen gegevens is anderzijds de conclusie van Rohrllich, dat tarwe-eiwit homogeen zou zijn, bezwaarlijk te handhaven.

Bij verschillende tarwerassen blijkt verschil in de gluten eiwitten op te treden.

Aanvullend analytisch onderzoek, b.v. met röntgendiffractie, zal nodig zijn om de reeds aanwezige informatie verder uit te breiden en af te ronden.

In de in Hoofdstuk II te lezen beschouwing over coeliakie en idiopathische steatorrhoe wordt een overzicht gegeven van de polypeptide-hypothese ter verklaring van de invloed der tarwe-eiwitten bij deze ziekten.

Na de experimentele gegevens, welke deze hypothese over de oorzaak van de coeliakie steunen, te hebben besproken, trachten wij aannemelijk te maken dat coeliakie en idiopathische steatorrhoe metabolisch identiek zijn.

Uitgaande van deze laatste gedachte hebben wij in Hoofdstuk III de proefopzet van het in dit proefschrift beschreven onderzoek geargumenteed.

Evenals Dicke, Shaw, Frazer, Alvey en Krainick hebben wij gliadine als uitgangsstof gekozen. Volgens het Beccari-proces, de inwerking van water op tarwebloem, hebben wij de gliadine uit gluten geïsoleerd.

Ondanks de in Hoofdstuk III behandelde bezwaren gebruikten wij uitsluitend de test met patiënten als criterium voor de toxische werking der eiwitfracties. Het geringe aantal personen, waarbij een bepaalde fractie op toxiciteit getest kan worden is echter een reëel bezwaar. De testen gaan met veel technische moeilijkheden gepaard en konden alleen dank zij de grote medewerking van patiënten en verplegend personeel worden uitgevoerd.

Bij de in Hoofdstuk IV beschreven bereiding der fracties bouwden wij voort op het door Hooghwinkel uitgevoerde oriënterende onderzoek. Variaties in de opbrengst der bereide fracties traden op. Zoals reeds in Hoofdstuk IV werd opgemerkt waren de fracties zeker niet zuiver. Het analytisch onderzoek, met name van de zure peptide-fracties, had slechts de vorm van een oriënterend onderzoek. Het werd uitgevoerd met een preparaat dat meer NaCl als verontreiniging bevatte dan bij de preparaten waarmee de patiëntentests werden uitgevoerd het geval was. De voortzetting van het onderzoek vindt op het laboratorium voor Gastro-enterologie te Leiden plaats.

Ondanks het niet geheel zuiver zijn der preparaten, menen wij, dat de bewijsvoering voor de toxiciteit bij lijdens aan idopathische steatorrhoe voor de door ons als zodanig aangemerkte fracties geleverd is.

Uit de resultaten van ons onderzoek blijkt op de eerste plaats dat de zure peptidefractie, verkregen op de in Fig. 3 (pag. 21) geschetste wijze, voor patiënten lijdende aan idiopathische steatorrhoe toxisch is.

Verder hebben wij gevonden, dat de zure peptidefractie niet volledig homogeen is, maar uit een, waarschijnlijk kleine, groep verwante peptiden bestaat. Deze peptiden bestaan gemiddeld uit ongeveer 35 aminozuren. Dit aantal komt dicht bij het door Rohrlisch en Schulz gevonden. De hoeveelheid basische aminozuren in deze zure peptidefractie is sterk verminderd ten opzichte van die in gliadine. Met de door ons beproefde methodieken, n.l. papierelektroforese en zetmeel-gel-elektroforese is de zure peptidefractie niet verder te splitsen; met gelfiltratie over Sephadex worden, naast een hoofdfractie, drie nevenfracties gevonden.

SAMENVATTING

Uit een bespreking van de literatuur over in water onoplosbare tarwe-gluten-eiwitten blijkt dat deze waarschijnlijk heterogeen zijn, hoewel deze mening niet door alle onderzoekers wordt gedeeld. Er wordt een overzicht gegeven over de toxiciteit van tarwe-eiwitten bij het optreden van de darmziekten coeliakie en idiopathische steatorrhoe. De biochemische achtergrond van deze ziekten wordt besproken. Over de wijze waarop tarwe-eiwit de vetresorptie beïnvloeden kan, is niets met zekerheid bekend. Bij het onderzoek wordt uitgegaan van gliadine, die door pepsine en trypsine tot een polypeptidemengsel wordt afgebroken. In aansluiting op het door anderen verrichte coeliakie-onderzoek, zijn fracties uit dit polypeptidemengsel geïsoleerd en op het veroorzaken van de symptomen van idiopathische steatorrhoe bij lijdens aan deze ziekte onderzocht.

Een door adsorptie aan zuur aluminiumoxide verkregen zure peptide-fractie blijkt deze toxische werking te bezitten. Bij voortgezet onderzoek blijken disulfidebindingen tussen de peptide-ketens geen rol te spelen bij deze toxiciteit. De gebruikte test methode wordt kritisch besproken. Analytisch onderzoek der zure peptide-fractie toonde aan dat deze een mengsel is en gaf informatie over de aminozuur-samenstelling en gemiddelde ketenlengte van deze peptiden.

SUMMARY

The literature on water-insoluble wheat gluten proteins shows that they are probably heterogeneous, although this opinion is not shared by all the investigators. A review is given of the toxicity of wheat proteins in the occurrence of the intestinal diseases: coeliac disease and idiopathic steatorrhoea. The biochemical background of these diseases is described. No definite information is available about the way in which wheat protein may affect the fat absorption.

In the present investigation gliadin was used as starting material which by pepsin and trypsin is broken down to a peptide mixture. In continuation of the investigation of the coeliac disease carried out by other research workers, fractions have been isolated from this peptide mixture and examined for the causation of the symptoms of idiopathic steatorrhoea among sufferers from this disease.

An acid peptide fraction obtained by adsorption to acid aluminium oxide appeared to have this toxic effect. A further investigation showed that disulphide bonds between peptide chains play no part in this toxicity. The test method used is discussed critically. Analysis of the acid peptide fraction showed this to be a mixture and furnished information about aminoacid-composition and mean chainlength of this mixture.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus der Literatur über wasser-unlösliche Weizengluten-Proteine geht hervor, dass letztere wahrscheinlich heterogen sind, obwohl diese Meinung nicht von allen Untersuchern geteilt wird. Über die Toxicität der Weizen-Proteine beim Auftreten der Darmkrankheiten Cöliakie und idiopathische Steatorrhöe wird eine Übersicht gegeben. Die biochemische Grundlage dieser Krankheiten wird besprochen. Es ist nichts bestimmtes bekannt über die Art der Beeinflussung der Fett-Resorption durch die Weizen-Proteine.

Bei der Untersuchung wurde von Gliadin ausgegangen, das durch

Pepsin und Trypsin zu einer Polypeptid-Mischung abgebaut wird. Im Anschluss an die andererseits vorgenommene Cöliakie-Untersuchung sind Fraktionen aus dieser Polypeptid-Mischung isoliert, und auf die Erregung der Symptome der idiopathischen Steatorrhöe bei an diesem Leiden erkrankten Personen untersucht worden. Es stellte sich heraus, dass eine mittels Adsorption an saurem Aluminiumoxyd erhaltene saure Peptid-Fraktion diese Toxizität besass. Eine weitere Untersuchung zeigte, dass Disulfidbindungen zwischen den Peptidketten bei dieser Toxizität keine Rolle spielen. Die angewandte Prüfungsmethode wird kritisch besprochen. Die Analyse der sauren Peptid-Fraktion zeigte dass diese Fraktion eine Mischung ist und ergab Daten über die Aminosäure-Zusammensetzung und mittlere Kettenlänge dieser Peptide.

LITERATUUR-OPGAVE

1. W. K. DICKE, Een onderzoek naar de nadelige invloed van sommige graan-soorten op de lijder aan coeliakie; Diss. Utrecht 1950.
2. J. H. VAN DE KAMER, H. A. WEIJERS, W. K. DICKE, *Acta Paediat.* **42**, 223 (1953).
3. „Het brood in de Nederlandse voeding”, Commissie voedingswaarde brood, 1961, p. 97.
4. BECCARI, *De Bononiensi Scientiarum et artium Instituto atque Academia Commentarii 1745*, II, deel I, p. 122.
5. M. J. BLISH, *Advances in protein Chem.* **2**, 337 (1945).
6. J. C. GROSSKREUTZ, *Cereal Chem.* **38**, 336 (1961).
7. E. WALDSCHMIDT-LEITZ, *Chemie der Eiweisskörper*, 1957, p. 138.
8. G. A. H. ELTON, J. A. D. EWART, *J. Sci. Food Agric.* **13**, 62 (1962).
9. T. B. OSBORNE, *The proteins of the wheat kernel*, 1907.
10. TADDEI, *Annals of Philosophy*, XV, 390 (1820).
11. GUTHRIE, *Agric. Gazette of New South Wales*, Sept. 1896.
12. R. W. JONES, N. W. TAYLOR, F. R. SENTI, *Arch. Biochem. Biophys.* **84**, 363 (1959).
13. H. C. BUNGENBERG DE JONG, Symposium on proteins; uitgave der sectie Colloïdchemie van de Ned. Chem. Ver. (1938), 161.
14. H. C. BUNGENBERG DE JONG, *Kolloïd-Z.* **128**, 164 (1952).
15. G. W. SCHWERT, F. W. PUTNAM, D. R. BRIGGS, *Arch. Biochem.* **4**, 371 (1944).
16. K. HESS, *Kolloïd-Z.* **136**, 84 (1954).
17. K. HESS, E. HILLE, *Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch.* **115**, 212 (1961).
18. K. HESS, *Industr. alim. agr.* **78**, 221 (1961).
19. M. ROHRLICH, G. ADLER, O. KRAMM, *Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch.* **102**, 85 (1955).
20. M. ROHRLICH, H. J. SCHLÜSSLER, *Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch.* **108**, 405 (1958).
21. M. ROHRLICH, W. B. TH. SCHULZ, *Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch.* **113**, 364 (1960).
22. M. ROHRLICH, R. RASMUS, *Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch.* **103**, 89 (1956).
23. E. J. COHN l.c., G. A. FRISTAM, *Advances in protein Chem.* **5**, 83 (1949).
24. E. WALDSCHMIDT-LEITZ, *Chemie der Eiweisskörper*, 1957, p. 140.
25. E. BILINSKI, W. B. McCONNELL, *Cereal Chem.* **35**, 66 (1958).
26. V. L. KOENIG, *J. Sci. Food Agric.* **14**, 19 (1963).
27. J. J. KELLEY, V. L. KOENIG, *J. Sci. Food Agric.* **14**, 29 (1963).
28. M. PADMOYO, „Das Getreide-Eiweiss. Ein Beitrag zur Kenntnis seines Nährwerts und der Untersuchung desselben durch Papierelektrophorese.” Diss. Bern 1962.
29. A. R. DESCHREIDER, *Industr. alim. agr.* **78**, 243 (1961).
30. J. H. CUSTER, C. A. ZITTLE, *J. Chromatography* **3**, 369 (1960).
31. H. ZENTNER, *Chemistry & Industry* 317 (1960).
32. J. H. WOYCHIK, R. J. DIMLER, F. R. SENTI, *Arch. Biochem. Biophys.* **91**, 235 (1960).
33. J. H. WOYCHIK, J. A. BOUNDY, R. J. DIMLER, *J. Agr. Food Chem.* **9**, 307 (1961).
34. R. W. JONES, G. E. BABCOCK, N.W. TAYLOR, R. R. SENTI, *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 483 (1961).
35. J. H. COATES, D. H. SIMMONDS, *Cereal Chem.* **38**, 256 (1961).

36. J. H. WOYCHIK, J. A. BOUNDY, R. J. DIMLER, *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 477 (1961).
37. J. H. WOYCHIK, *Chem. Eng. News* 39, 44 (1960).
38. O. SMITHIES, *Biochem. J.* 61, 629 (1955).
39. H. C. NIELSEN, G. E. BABCOCK, F. R. SENTI, *Arch. Biochem. Biophys.* 96, 259 (1962).
40. G. A. H. ELTON, J. A. D. EWART, *Nature* 187, 600 (1960).
41. G. A. H. ELTON, J. A. D. EWART, *J. Sci. Food Agric.* 13, 62 (1962).
42. C. B. COULSON, A. K. SIM, *Biochem. J.* 80, 46^P (1960).
43. C. B. COULSON, A. K. SIM, *Z. Lebensm. Unters. u. Forsch.* 117, 31 (1962).
44. R. W. JONES, R. J. DIMLER, *Cereal Chem.* 39, 336 (1962).
45. T. W. LEE, *Biochem. et Biophys. Acta* 69, 159 (1963).
46. J. C. GROSSKREUTZ, *Biochem. et Biophys. Acta* 51, 265 (1961).
47. S. GEE, *On the coeliakie affection*, 1888.
48. H. A. WEIJERS, W. K. DICKE, J. H. VAN DE KAMER, *Kinderziekten II* (1952), p. 527 (uitg. Elsevier, Amsterdam).
49. D. ADLERSBERG, *Am. J. Digest. Diseases* 4, 8 (1955).
50. W. T. COOKE, *Brit. Med. J.* 5091, 261 (1958).
51. A. C. FRAZER, *J. Pediat.* 57, 264 (1960).
52. J. C. S. PATERSON, *Am. J. Med. Sci.* 231, 92 (1956).
53. W. VOLWILLER, *Am. J. Med.* 23, 250 (1957).
54. H. A. WEIJERS, J. H. VAN DE KAMER, *Acta Paediat.* 42, 24 (1953).
55. J. H. VAN DE KAMER, *Vet in faeces. De gehaltebepaling en de bepaling van het moleculair gewicht, in verband met de vetresorptie van de mens.* Diss. Utrecht 1950.
56. S. V. HAAS, *J. Am. Med. Assoc.* 99, 448 (1932).
57. D. H. ANDERSEN, *J. Pediat.* 30, 564 (1947).
58. W. SHELDON, *Arch. Disease Childhood* 24, 81 (1949).
59. C. M. ANDERSON, A. C. FRAZER, J. M. FRENCH, J. W. GERRARD, H. J. SAMMONS, J. M. SMELLIE, *Lancet* 836 (1952).
60. C. ALVEY, C. M. ANDERSON, M. FREEMAN, *Arch. disease Childhood* 32, 434 (1957).
61. C. M. ANDERSON, R. F. LANGFORD, *Brit. Med. J.* 5074, 803 (1958).
62. H. G. KRAINICK, F. DEBATIN, *Monatschr. Kinderheilkunde* 102, 412 (1954).
63. W. SHELDON, *Lancet* 1097 (1955).
64. J. H. VAN DE KAMER, H. A. WEIJERS, *Acta Paediat.* 44, 465 (1955).
65. H. G. KRAINICK, G. MOHN, H. H. FISCHER, *Helv. Paediat. Acta* 14, 124 (1959).
66. C. A. C. ROSS, A. C. FRAZER, J. M. FRENCH, J. W. GERRARD, H. G. SAMMONS, J. M. SMELLIE, *Lancet* 1087 (1955).
67. H. A. WEIJERS, W. K. DICKE, J. H. VAN DE KAMER, *Maandschr. Kinder-geneesk.* 23, 454 (1955).
68. H. A. WEIJERS, J. H. VAN DE KAMER, *Proc. World Congr. Gastroenterology, Washington* 578 (1958).
69. H. G. KRAINICK, *Deut. Med. Wochschr.* 83, 1610 (1958).
70. H. A. WEIJERS, J. H. VAN DE KAMER, *Pediatrics* 25 (1960).
71. B. SHAW, A. C. FRAZER, C. A. C. ROSS, H. G. SAMMONS, *Proc. 3e Int. Biochem. Congress, Brussel* 119 (1955).
72. A. C. FRAZER, R. F. FLETSCHER, C. A. C. ROSS, B. SHAW, H. G. SAMMONS, R. SCHNEIDER, *Lancet* 7097, 252 (1959).
73. H. A. WEIJERS, J. H. VAN DE KAMER, *Acta Paediat.* 48, 17 (1959).

74. H. A. WEIJERS, J. H. VAN DE KAMER, *Acta Paediat.* 44, 536 (1955).
75. R. GRÜTTNER, R. MELLIN, F. BRAMSTEDT, *Klin. Woch. Schr.* 37, 237 (1959).
76. J. K. VISAKORPI, *Ann. Paediat. Fenn.* 5, 67 (1959).
77. C. Mc. IVER, *Lancet* 2, 1112 (1952).
78. A. J. C. HAEX, J. B. LIPS, *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 99, 102 (1955).
79. J. M. RUFFIN, D. D. CARTER, D. H. JOHNSTON, G. J. BAYLIN, *New Engl. J. Med.* 250, 281 (1954).
80. J. M. FRENCH, C. F. HAWKINS, *Med. Clin. N. Am.* 1586 (1957).
81. M. H. SLEISENGER, *New Engl. J. Med.* 265, 49 (1961).
82. J. W. GERRARD, C. A. C. ROSS, R. ASTLEY, J. M. FRENCH, J. M. SMELLIE, *Quart. J. Med.* 24, 23 (1955).
83. P. A. DI SANT 'AGNESE, *Pediatrics* 11, 231 (1953).
84. W. T. COOKE, A. L. P. PEENEY, C. F. HAWKINS, *Quart. J. Med.* 22, 59 (1953).
85. J. SAKULA, M. Shiner, *Lancet* II, 876 (1957).
86. D. J. FONE, W. T. COOKE, M. J. MEYNELL, D. B. BREWER, E. L. HARRIS, E. V. COX, *Lancet* 933 (1960).
87. C. E. RUBIN et al., *Gastroenterology* 38, 28 (1960).
88. C. E. RUBIN et al., *Gastroenterology* 38, 517 (1960).
89. R. S. HARTMAN, C. E. BUTTERWORTH, R. E. HARTMAN, W. H. CROSBY, A. SHIRAI, *Gastroenterology* 38, 506 (1960).
90. C. E. RUBIN, L. L. BRANDBORG, A. L. FLICK, C. PARMENTIER, P. PHELPS, S. VAN NIEL, *J. Clin. Invest.* 39, 1023 (1960).
91. O. D. KOWLESSAR, R. C. WILLIAMS, D. H. LAW, M. H. SLEISINGER, *New Engl. J. Med.* 259, 340 (1958).
92. A. M. MARKO, J. W. GERRARD, D. BUCHAN-*Can. Med. Assoc. J.* 83, 1324 (1960).
93. G. J. M. HOOGHWINKEL, persoonlijke mededeling.
94. T. L. ALTHUSEN, G. M. GRODSKY, *Gastroenterology* 40, 665 (1961).
95. R. SCHNEIDER, H. BISHOP, B. SHAW, A. C. FRAZER, *Proc. Intern. Congress Gastroenterology, Leiden 1959*, p. 651.
96. A. C. FRAZER, *Ann. Paediat.* 197, 368 (1961).
97. K. T. WIERINGA, Persoonlijke Mededeling.
98. A. H. BLOKSMA, *Getreide und Mehl* 8, 65 (1958).
99. R. FRATER, F. J. R. HIRD, H. J. MOSS, J. R. YATES, *Nature* 4723, 451 (1960).
100. D. W. E. AXFORD, J. D. CAMPBELL, G. A. H. ELTON, *J. Sci. Food Agric.* 13, 73 (1962).
101. *Ann. Rev. Biochem.* 102 (1959).
102. F. SANGER, *Biochem. J.* 44, 126 (1949).
103. S. MOORE, R. D. COOLE, H. G. GUNDLACH, W. H. STEIN, IVth Intern. Congress Biochem. Wenen 1958, Symp. No. VIII, Preprint No. 11.
104. G. TOENNIES, R. P. HOMILLER, *J. Am. Chem. Soc.* 64, 3054 (1942).
105. R. CONSDEN, A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.* 40, 580 (1946).
106. A. J. C. HAEX et al., *Gastro-enterologia* 97, 149 (1962).
107. M. B. VAN HALTEREN, *Nature* 168, 1090 (1951).
108. M. JUTISZ, E. LEDERER, *Nature* 159, 445 (1947).
109. C. FROMAGEOT, M. JUTISZ, E. LEDERER, *Biochim. et Biophys. Acta* 2, 487 (1948).
110. A. P. RYLE, F. SANGER, *Biochem. J.* 60, 535 (1955).

111. C. B. ANFINSEN, *Federation Proc.* 16, 783 (1957).
112. T. S. MA, *Microchem. J.* 3, 425 (1959).
113. A. N. GLAZER, E. L. SMITH, *J. Biol. Chem.* 236, 416 (1961).
114. F. SANGER, *Adv. Protein Chem.* VII, 4 (1952).
115. P. DESNUELLE, „Enzymes, Lectures held at the Conference on Enzymes and their action”, 46 (1959).
116. E. WALDSCHMIDT-LEITZ, *Chemie der Eiweisskörper*, 104 (1957).
117. E. WALDSCHMIDT-LEITZ, E. REICHENEDER, *Z. physiol. Chem.* 323, 124 (1961).
118. J. H. VAN ROON, A. J. C. HAEX, *Tijdschrift voor Gastro Enterologie* 2, 563, (1959).
J. H. VAN ROON, A. J. C. HAEX, W. A. SEEDER, J. DE JONG, *Experientia* 16, 209 (1960).
J. H. VAN ROON, A. J. C. HAEX, *Int. Congress Gastroenterology, Leyden* 635, 647 (1959).
J. H. VAN ROON, A. J. C. HAEX, *Gastroenterologia* 94, 227 (1960).