

AGATA KURZAWSKA, DANUTA GÓRECKA,
DOROTA PIASECKA-KWIATKOWSKA, KRZYSZTOF DZIEDZIC

ZAWARTOŚĆ GLUTENU W KLĄCZU PAŁKI WODNEJ WĄSKOLISTNEJ (*TYPHA ANGUSTIFOLIA*)

Streszczenie

Jedynym sposobem leczenia osób cierpiących na celiakię jest eliminacja z diety produktów zawierających białka glutenowe. Poszukiwane są nowe źródła pożywienia niezawierające białek glutenowych, do których może należeć pałka wodna (*Typha ssp.*). Z jej kłaczy można pozyskać mączkę, będącą surowcem do wypieku placków chlebowych i ciastek.

Celem pracy było określenie zawartości frakcji glutenowej, powodującej reakcję chorobową u osób cierpiących na celiakię, w mączce pozyskanej z kłaczy pałki wodnej wąskolistnej.

Materiał do badań stanowiły kłacze pałki wodnej wąskolistnej (*Typha angustifolia*), pobrane w okresie zimowym (styczeń 2009 r.) z trzech różnych zbiorników wodnych: stawu położonego w Puszczy Zielonce (k. Poznania), stawu hodowlanego oraz jeziora w Osiecznej (k. Leszna).

Test na obecność glutenu prowadzono metodami immunoenzymatycznymi, wykorzystując produkty firmy R-Biopharm: Cocktail Solution® oraz kit gliadynowy Ridascreen® Gliadin R7001 (AOAC 120601). Zawartość białka ogółem oznaczono metodą Kjeldahla, wykorzystując aparaturę Foss Tecator. Zawartość białka w gliadynowych ekstraktach oznaczono fotometrycznie z wykorzystaniem odczynnika Bradford.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że mączka z kłaczy pałki wodnej wąskolistnej nie zawiera peptydów wywołujących celiakię i może być stosowana w produktach przeznaczonych dla osób na nią cierpiących. Zawartość białka ogółem w mączce z kłaczy pałki wodnej była zmienna w zależności od miejsca zbioru rośliny. Zawartość białka w ekstraktach mączki z kłaczy pałki wodnej nie była skorelowana z zawartością białka ogółem w samej mączce.

Słowa kluczowe: pałka wodna wąskolistna (*Typha angustifolia*), kłacze, gluten, Ridascreen® Gliadin R7001

Wprowadzenie

Dotychczas nie opracowano metody wykorzystania pałki wodnej w celach spożywczych. Często postrzegana jest jako surowiec zbędny, wymagający raczej usunię-

Mgr inż. A. Kurzawska, prof. dr hab. D. Górecka, mgr inż. K. Dziedzic, Katedra Technologii Żywności Człowieka, dr D. Piasecka-Kwiatkowska, Katedra Biochemii i Analizy Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań

cia z najbliższego otoczenia. Wymagania klimatyczne tej rośliny ograniczają się do odpowiednio wysokiego nawodnienia podłoża, dlatego najchętniej porasta tereny podmokłe (mokradła, rowy melioracyjne, doły potorfowe) oraz brzegi zbiorników wodnych. Uzyskiwany przez nią przyrost biomasy, zarówno części nadziemnych, jak i podziemnych, jest bardzo wysoki. Rozpatrując pałkę wodną jako potencjalną roślinę uprawną, określić ją można jako surowiec łatwo dostępny, tani i wydajny [10].

Wykorzystanie pałki wodnej sprowadza się obecnie do zdobienia ogrodów lub oczyszczania zbiorników wodnych. Znane są również przykłady jej wykorzystania jako surowca użytkowego, a nawet budowlanego. Pałka wodna wykazuje też właściwości lecznicze (moczopędne, antyseptyczne, przeciwzapalne, ściągające oraz przeciwkrwotoczne). Najistotniejszą, pod względem żywieniowym, zaletą pałki wodnej jest jej wartość odżywcza. Jadalne są wszystkie części morfologiczne, jednak najbardziej odżywcze są kłacza (szczególnie w okresie zimowym) oraz kolby (w okresie letnim). Kłacza można spożywać na surowo lub ugotowane. Można także wycisnąć z nich sok lub w wyniku gotowania otrzymać "galaretkę"; wysuszone i sproszkowane można stosować jak mączkę do pieczenia ciastek czy chleba [9].

Celiakia jest to enteropatia pokarmowa o charakterze autoimmunologicznym, określana również jako zespół złego wchłaniania. W wyniku spożycia produktów zawierających gluten powstają zmiany w błonie śluzowej jelita czczego, na skutek czego dochodzi do zaburzeń procesów trawienia i upośledzenia wchłaniania, a w efekcie do znacznych niedoborów wielu składników pokarmowych i ogólnego wyniszczenia organizmu [3]. Stwierdzono, że szkodliwość prolamin zbóż zależy od ich struktury, czyli rodzaju i kolejności aminokwasów zawartych w łańcuchach polipeptydowych. Toksyczne peptydy z A-gliadyny zawierają przynajmniej jeden z czterech motywów sekwencji aminokwasowych (PSQQ, QQQP, QQPYP, QPYP) [5]. Jedynym sposobem leczenia osób cierpiących z powodu celiakii jest eliminacja z diety chorych produktów zawierających toksyczne białka glutenowe, a więc większości produktów zbożowych [13]. Prowadzi to do ograniczenia asortymentu produktów spożywczych przeznaczonych dla tej grupy osób. Znaczna część żywności przetworzonej, pomimo braku zadeklarowanych przez producenta składników zawierających białka glutenowe, jest zanieczyszczona mąkami glutenowymi [11]. Jest to najczęściej efektem wykorzystania tych samych linii produkcyjnych do przygotowania wielu produktów spożywczych. W związku z powyższym, rozpoczęto produkcję żywności przeznaczonej dla osób chorych na celiakię, opatrzonej graficznym znakiem przekreślonego kłosa (lub napisem „gluten-free”). Żywność ta jest jednak często monotonna pod względem smaku. Poszukiwane są nowe źródła pożywienia, które poszerzyłyby ofertę produktów bezglutenowych. Rośliną, która stanowić może potencjalne źródło białka bezglutenowego jest pałka wodna. Z jej kłacza otrzymać można mączkę, stanowiącą surowiec do produkcji tego rodzaju żywności.

Celem pracy było określenie zawartości frakcji glutenowej, powodującej reakcję chorobową u osób cierpiących na celiakię, w mączce pozyskanej z kłaczy pałki wodnej wąskolistnej.

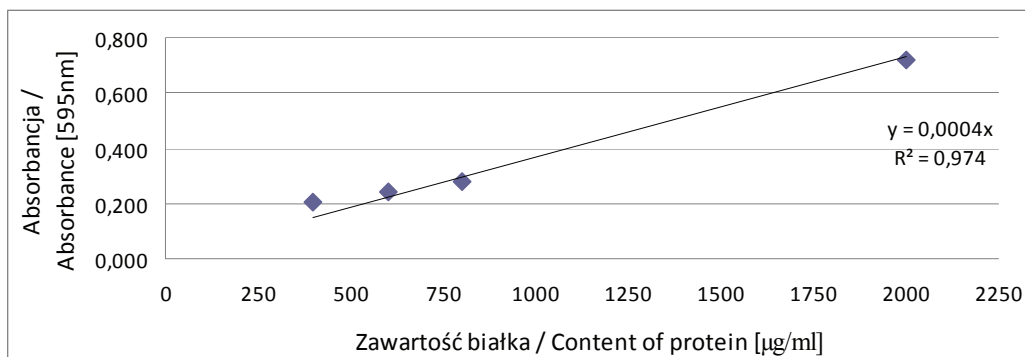
Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły kłacza pałki wodnej wąskolistnej (*Typha angustifolia*), pobrane w okresie zimowym (styczeń 2009 r.) z trzech odmiennych środowiskowo zbiorników wodnych: stawu położonego w Puszczy Zielonce (k. Poznań), stawu hodowlanego w Osiecznej (k. Leszno) oraz jeziora w Osiecznej (k. Leszno).

Materiał pobrano w liczbie minimum 10 sztuk zdrowych kłaczy z przynajmniej 2 różnych stanowisk danego zbiornika. Po oczyszczeniu kłacza zliofilizowano, a następnie zmielono w celu otrzymania mączki.

Z mączek, otrzymanych z kłacza poszczególnych pałek wodnych wąskolistnych, ekstrahowano frakcję białkową za pomocą mieszaniny ekstrakcyjnej o nazwie Cocktail Solution® (Firma R-Biopharm) [6]. Ze względu na trudności w ekstrahowaniu gliadyn z badanego materiału zmodyfikowano podaną przez producenta metodę. Przyczyną trudności była zbyt duża lepkość mieszaniny, co uniemożliwiało jej swobodny przepływ, dlatego zmieniono proporcję mieszaniny ekstrakcyjnej w stosunku do naważki badanego materiału. Uwzględniono to następnie w trakcie wykonywania rozcieńczeń gotowych ekstraktów, w rezultacie czego w teście ELISA stosowano ekstrakt o stężeniu zgodnym z zaleceniem producenta. Z powodu małej stabilności ekstraktów tj. szybkiego wypadania białka z roztworu, ekstrakcję prowadzono bezpośrednio przed oznaczeniami immunoenzymatycznymi. Opisaną metodę poprzedzono badaniami wstępnymi, w trakcie których ekstrakcję przeprowadzono metodą klasyczną, tj. za pomocą wodnego roztworu etanolu (80 %). W efekcie uzyskano około dwu i półkrotnie wyższą wydajność ekstrakcji niż w przypadku ekstrakcji mieszaniną Cocktail Solution®. Nie zdecydowano się pozostać przy tej formie ekstrakcji ze względu na to, że rekomendowana przez producenta procedura jest standaryzowana wobec AOAC Research Institute (licencja nr 120601) [6].

Zawartość białka w ekstraktach z mączki pałki wodnej oznaczano zmodyfikowaną metodą Bradford [2]. Metoda ta polega na zmianie zabarwienia odczynnika Bradford w przypadku wytworzenia się w nim kompleksu białkowego. W tym celu ekstrakt mieszało z odczynnikiem Bradford w proporcji 5 : 200, a następnie po 5 min dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali 595 nm. Zmianę barwy mierzono spektrofotometrycznie, a wynik końcowy obliczano na podstawie krzywej wzorcowej zależności absorbancji od zawartości białka (rys. 1).



Rys. 1. Krzywa wzorcowa oznaczenia zawartości białka metodą Bradford

Fig. 1. Standard curve to determine content of total protein using a Bradford method

Białko ogółem oznaczano metodą Kjeldahla, wykorzystując aparaturę Foss Tecator (2006 Digestor; 2200 Kjeltec Auto Distillation).

Zawartość białek glutenowych, wywołujących reakcję chorobową u osób cierpiących z powodu celiakii, określono immunochemicznie za pomocą kanapkowego, bezpośredniego testu ELISA, przy użyciu zestawu odczynników do oznaczenia zawartości gliadyn Ridascreen® Gliadin R7001 (Firma R-Biopharm). Oznaczenie to bazuje na reakcji monoklonalnych przeciwciał z toksycznymi peptydami. Interpretacji wyników dokonywano na podstawie krzywej wzorcowej, wyznaczonej ze standardów dostarczonych przez producenta. Badanie przebiegało zgodnie z opracowaną przez producenta metodą, która jest standaryzowana wobec AOAC Research Institute (licencja nr 120601). Zgodnie z sugestią, nie ma konieczności zastosowania wszystkich dostępnych w zestawie standardów, dlatego w badaniu wykorzystano cztery o najmniejszej zawartości glutenu [6].

Wyniki i dyskusja

Zawartość białka ogółem w 100 g materiału doświadczalnego, a także frakcji gliadyn w 1 ml ekstraktu przedstawiono w tab. 1.

Zawartość białka ogółem w mączkach kłacza pałki wodnej wąskolistnej, pochodzącej z różnych zbiorników wodnych różniła się znacząco. Ponad dwukrotnie większą zawartością białka ogółem cechowało się kłacze pałki pobranej z jeziora w Osiecznej (13,16 %) w porównaniu z kłaczem pałek pobranych ze stawu w Puszczy Zielonce (4,19 %) i w Osiecznej (6,67 %). Może się to wiązać z wyższą klasą czystości wody pochodzącej z jezior niż stawów oraz mniejszym stopniem zamulenia zbiornika. Skuteczność ekstrakcji białka z trzech mączek kłaczy pałki wodnej była zbliżona i wyniosła 135 - 140 µg białka w 1 ml uzyskanych ekstraktów. Porównując wyniki zawartości białka ogółem z ilością białka wyekstrahowanego, stwierdzono brak korelacji między

odnośnymi wynikami. Przyczyną może być fakt, że udział białek glutenowych w białku klącza pałki wodnej nie jest cechą gatunkową danej rośliny. Może się to wiązać również z ograniczoną skutecznością zastosowanej ekstrakcji w przypadku badanego surowca, co sugerować mogą zbliżone wyniki zawartości białka w uzyskanych ekstraktach. Porównując jednak zawartość białka, pozyskanego z mączki klącza pałki wodnej szerokolistnej, ekstrahowanego zgodnie z metodyką zastosowaną w danym badaniu, która wahała się od 82,5 do 408,3 $\mu\text{g/ml}$ [8], twierdzenie o ograniczonej skuteczności tej ekstrakcji nie ma uzasadnienia.

Tabela 1

Zawartość białka ogółem w mące z klącza pałki wodnej wąskolistnej oraz białka w ekstrakcie mączki. Content of total protein in the flour made from rhizomes of narrow-leaved cattail and content of protein in the extract of flour

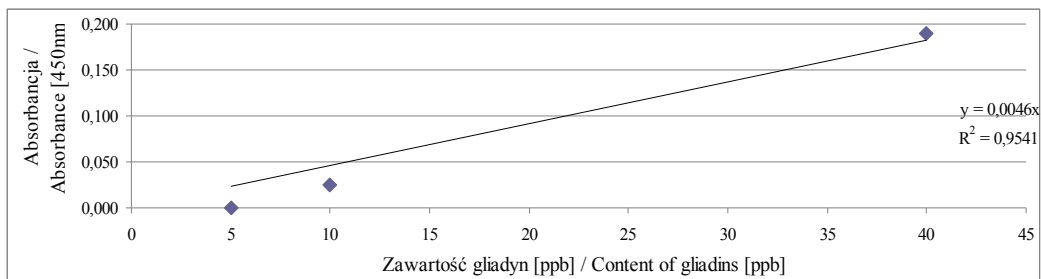
Miejsce zbioru rośliny Place of harvesting the plant	Białko ogółem [g/100vg] ($\bar{X} \pm \text{SD}$) Total protein	Białko w ekstrakcie [$\mu\text{g/ml}$] ($\bar{X} \pm \text{SD}$) Protein in extract
Staw w Puszczy Zielonce Pond in the Zielonka Forest	4,19 \pm 0,04 a	140,0 \pm 38,3 a
Jezioro w Osiecznej Lake in Osieczna	13,16 \pm 0,61 c	136,3 \pm 38,3 a
Staw hodowlany w Osiecznej Fish breeding pond in Osieczna	6,67 \pm 0,19 b	134,6 \pm 20,6 a

Objaśnienia./ Explanatory notes:

\bar{X} – wartość średnia z trzech pomiarów / mean value of three measurements; SD – odchylenie standardowe / standard deviation; a,b,c – wartości średnie w kolumnach oznaczone odmiennymi indeksami różnią się od siebie statystycznie istotnie ($\alpha = 0,05$) / mean values in the same columns, denoted by different letters, vary statistically significantly among themselves at $\alpha = 0.05$.

Zastosowana metoda oznaczania zawartości glutenu jest obecnie jedną z najskuteczniejszych metod dostępnych na rynku laboratoryjnym. Oficjalną metodą detekcji glutenu w żywności, zaakceptowaną przez AOAC (Association of Analytical Communities) była analiza immunoenzymatyczna [1]. Był to kanapkowy test ELISA, z użyciem przeciwciał monoklonalnych, skierowanych przeciwko ω -gliadynom pszenicy. Zastosowana w badaniu R5 ELISA (uznana przez AOAC w 2006 r.), skierowana jest przeciw sekwencji peptydowej QQPYP, dzięki czemu test jest skuteczny w przypadku nie tylko gliadyny pszenicy, ale i hordeiny żyta i sekaliny ryżu [7]. Wspomniana konfiguracja aminokwasów jest termicznie oporna, dzięki czemu zwiększa się skuteczność testu w przypadku żywności poddanej ogrzewaniu, podczas gdy zdenaturowana ω -gliadyna jest niewykrywalna przez test podstawowy [12].

Zgodnie z sugestią firmy R-Biopharm, producenta zastosowanego testu, celem otrzymania jak najniższego poziomu detekcji wykonywanej analizy zastosowano standardy o najmniejszej zawartości glutenu. Wyniki pomiaru absorbancji wszystkich standardów były niższe od podanych przez producenta, a w przypadku standardu 5 µg/kg, czyli tego o najmniejszej zawartości glutenu były na poziomie próby zerowej. Mogło to być spowodowane zastosowaniem w badaniach zbyt długo przechowywanego zestawu odczynników do oznaczenia zawartości gliadyn (na granicy ważności), co zgodnie z sugestią producenta może spowodować obniżenie wyników pomiarów absorbancji ze względu na obniżenie immunoreaktywności zastosowanych przeciwciał. Z tego względu do interpretacji uzyskanych rezultatów przyjęto powyższe wyniki za równe zero. Czulość testu odnoszącego się do oznaczeń ilościowych wynosi 2,5 mg/kg w przypadku gliadyn, co w przeliczeniu na gluten wynosi 5 mg/kg, gdyż zakłada się, że frakcja gliadynowa stanowi połowę białek glutenowych. Odrzucenie wyniku uzyskanego w przypadku najmniejszego standardu wpłynęło na zmianę czulości metody, dlatego też czulość została wyznaczona przez kolejny najniższy użyty standard, czyli 10 µg/kg. W rezultacie w odniesieniu do oznaczeń ilościowych uzyskano próg detekcji równy 5 mg/kg frakcji gliadynowej i 10 mg/kg białek glutenowych. Zgodnie z zaleceniami Kodeksu Żywnościowego [4] środek spożywczy uznawany jest za bezglutenowy, jeżeli zawiera mniej niż 200 mg/kg glutenu, dlatego taka modyfikacja nie wpłynęła w istotny sposób na czulość wykonanego oznaczenia. Uzyskaną krzywą wzorcową wraz z równaniem prostej opisującym zależność wyników pomiaru absorbancji od stężenia gliadyn przedstawiono na rys. 2.



Rys. 2. Krzywa wzorcowa oznaczenia zawartości białek (gliadyn) w ekstraktach z mączki kłączy pałki wodnej wąskolistnej.

Fig. 2. Standard curve to determine content of protein (gliadins) in flour extracts made from rhizomes of narrow-leaved cattail.

Wyniki pomiaru absorbancji w ekstraktach z mączki kłączy pałki wąskolistnej z zastosowaniem testu Ridascreen® Gliadin były zbliżone do wartości absorbancji próby zerowej i dlatego przyjęto powyższe wyniki za równe zero. Na podstawie prze-

przewodzonych badań stwierdzono, że mączka z klączy pałki wodnej wąskolistnej, niezależnie od warunków wzrostu, nie zawiera peptydów wywołujących celiakię i może być stosowana w produktach przeznaczonych dla osób na nią cierpiących.

Wnioski

1. Przeprowadzone badania z wykorzystaniem zestawu odczynników do oznaczania zawartości gliadyn Ridascreen® Gliadin wykazały, że mączka z klączy pałki wodnej wąskolistnej, niezależnie od warunków wzrostu, nie zawiera peptydów wywołujących celiakię.
2. Zawartość białka ogółem w mączce z klączy pałki wodnej wąskolistnej jest zmienna w zależności od miejsca zbioru rośliny.
3. Mączka z klączy pałki wodnej z jeziora cechowała się ponad dwukrotnie większą zawartością białka ogółem w porównaniu z mączką klączy pałek ze stawów.
4. Zawartość białka w ekstraktach mączki z klączy pałki wodnej wąskolistnej jest nieskorelowana z zawartością białka ogółem w samej mączce.

Literatura

- [1] Association of Analytical Communities Official Methods 991.19: Gliadin as a measure of gluten in food. Colorimetric monoclonal antibody enzyme immunoassay methods. First action 1991. Final action 2001. Gaithersburg, MD: AOAC International, 2005.
- [2] Bradford M.: A rapid and sensitive method of the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.
- [3] Ciclitira P.J., Moodie S.J.: Transition of care between pediatric and adult gastroenterology. Coeliac disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2003, **17**, 181-195.
- [4] Codex Alimentarius 19' ed., http://www.codexalimentarius.net/web/procedural_manual.jsp, 2010.
- [5] Darewicz M., Dziuba J.: Dietozależny charakter enteropatii pokarmowych na przykładzie celiakii. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **1 (50)**, 5-15.
- [6] Instrukcja R-Biopharm, Ridascreen® Gliadin R7001, http://www.r-biopharm.com/product_site.php?product_id=252, 2008.
- [7] Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization Food Standards Program: Report of the Twenty-seventh session of the Codex Committee on methods of analysis and sampling. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2006, p. 8.
- [8] Kurzawska A., Górecka D., Kwiatkowska-Piasecka D.: Zawartość glutenu w klączy pałki wodnej szerokolistnej (*Typha latifolia*). Dane niepublikowane.
- [9] Morton J.F.: Cattails (*Typha spp.*) – Weed problem or potential crop. *Economic Botany*, 1975, **29**, 7-29.
- [10] Sculthorpe C.D.: *The biology of aquatic vascular plants*. Arnold, London 1967.
- [11] Storsrud S., Malmheden Yman I., Lenner R.A.: Gluten contamination in oat products and products naturally free from gluten. *Eur. Food Res. Technol.*, 2003, **217**, 481-485.
- [12] Thompson T., Mendez E.: Commercial assays to assess gluten content of gluten-free foods: why they are not created equal. *J. Am. Diet. Assoc.*, 2008, **108**, 1682-1687.

- [13] Wieser H., Koehler P.: The biochemical basis of celiac disease. *Cer. Chem.*, 2008, 85 (1) 1-13.

CONTENT OF GLUTEN IN RHIZOME OF NARROW-LEAVED CATTAIL (*TYPHA ANGUSTIFOLIA*)

S u m m a r y

The only way to treat people suffering from celiac disease is to eliminate products containing gluten proteins from the diet. Researches have been carried out to find new sources of gluten-free food; among them, the cattail (*Typha spp*) can be counted. It is possible to grind its rhizomes and to get a baking flour to make cakes, bread, and biscuits.

The objective of the study was to determine the content of gluten fraction in the flour produced from rhizomes of the narrow-leaved cattail that caused a disease response in persons with the celiac disease.

The experimental material comprised rhizomes of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*), harvested in three water reservoirs during the winter period (January 2009), i.e. in a pond in the Zielonka Forest (the Province of Wielkopolska), in a lake and a fish breeding pond in Osieczna (near Leszno).

The test for gluten was conducted by means of immunoassay methods using the products from an R-Biopharm Company: Cocktail Solution ® and Ridascreen gliadin kit ® Gliadin R7001 (AOAC 120601). The content of total protein was determined by a Kjeldahl method using a Foss Tecator apparatus. The content of Gliadin protein in the extracts was determined photometrically using a Bradford reagent.

Based on the results obtained, it was found that the flour from rhizomes of the narrow-leaved cattail did not contain any peptides that caused celiac disease. Thus, this flour can be used in the products for people suffering from this disease. The content of total protein in the flour varied depending on the place where the plants were harvested. The content of the protein fraction in the flour extracts produced from rhizomes of the narrow-leaved cattail was not correlated with the content of total protein in the flour alone.

Key words: narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*), rhizome, gluten, Ridascreen ® Gliadin R7001 ☒