الكشف عن الكلايدين في منتجات الاغذية المعاملة حرارياً باستخدام طريقة الانتشار المناعي

عبدالمجيد حماد السامرائي سلوى ليلو عزيز ضحى داود سلمان
قسم الصناعات الغذائية والتقانات الاحيائية / كلية الزراعة / جامعة بغداد

المستخلص

استخدمت طريقة الانتشار المناعي المزدوج للكشف عن وجود كلايدين الحنطة في بعض الاغذية المطبوخة. اذكر بهذه الطريقة الكشف عن الكلايدين في مزيج مكون من 1% طحين حنطة مع اللحم وسخن لدرجة 121 م لمدة 15 دقيقة ، ولكن لم تتمكن الطريقة من الكشف عن الكلايدين في البسكت الا بعد معاملة مستخلص البسكت مع 1% من الـ Sodium dodecyl sulfate (SDS).

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 36(3) : 141 - 144, 2005 Al-Samarraie *et al.*

DETECTION OF GLIADIN IN SOME COOKED PRODUCTS BY IMMUNO DIFFUSION METHOD

A. M. H. Al-Samarraie S. L. Aziz D. D. Salman
Food Sci. and Biotechnology Dept., College of Agric. Univ. of Baghdad

ABSTRACT

Double immuny diffusion was used to detect of gliadin as indicator of foods. The technique was able to detect the gliadin in mixture of 1% wheat flour with meat which had been heated to 121 C / 15 min , but it was not able to detect gliadin in biscuit unless the extract of biscuit was treated first with 1% sodium dodecyl sulfate (SDS).

المقدمة

مرض حساسية الحنطة Coeliac Disease من الامراض المزمنة التي تصيب الامعاء الدقيقة في الاطفال والكبار على حد سواء (1) ويؤدي هذا المرض الى حدوث اضرار جسيمة في الانسجة المخاطية المبطنة للامعاء الدقيقة مما يسبب سوء عملية الامتصاص (6 ، 15) وينشأ عن عدم تحمل بروتينات الحنطة والسترتيكيلي والشيلم والشعير وبدرجة اقل الشوفان بينما الحبوب الاخرى مثل الرز والذرة فقد ثبت عدم سميتها (8 ، 9 ، 15) ويعد حالياً الغذاء الخالي من الكلوتين (Gluten Free Diet) هو العلاج الوحيد لمرض حساسية الحنطة اختلفت الدول في تحديد نسبة الكلوتين المسموح بتناولها من قبل المرضى ، اذ سمحت الولايات المتحدة الامريكية نسبة 3% من بروتين الحبوب في منتجات الاغذية (1 ، 15). بينما عدت منظمة الصحة العالمية (WHO) المنتوج خالياً من الكلوتين اذا احتوى على 1ملغم / 100 غم محسوباً على اساس الوزن الجاف (9) . وقد استخدمت العديد من الطرائق التحليلية للكشف عن الكلايدين في منتجات الاغذية منها استخدام الهجرة الكهربائية والـ HPLC الا ان هذه التقنيات تحتاج الى اجهزة مكلفة ولا تعطي نتائج دقيقة للاغذية المصنعة والمطبوخة (1 ، 15) مقارنة بطرائق ادق وابسط واكثر تخصصاً وهي التقنيات المناعية والتي منها تقنية الانتشار المناعي (3) والاليزا (ELIZA) سواء باستخدام الاجسام المضادة المتعددة (Poly clonal antibodies) (2 ، 4 ، 10 ، 15) او وحيدة النسيلة (Monoclonal antibodies) (12 ، 13 ، 14). وفي بحث سابق(16) استخدمت طريقة الانتشار المناعي في الكشف عن البرولامينات المستخلصة من بعض الحبوب وتبين ان المصل المضاد لكلايدين الحنطة يمكنه الكشف عن برولامين (هوردين) الشعير ايضاً وفي هذا البحث درست امكانية الكشف بالطريقة نفسها عن برولامينات هذه الحبوب بعد تعريضها الى حرارة عالية اثناء التصنيع .

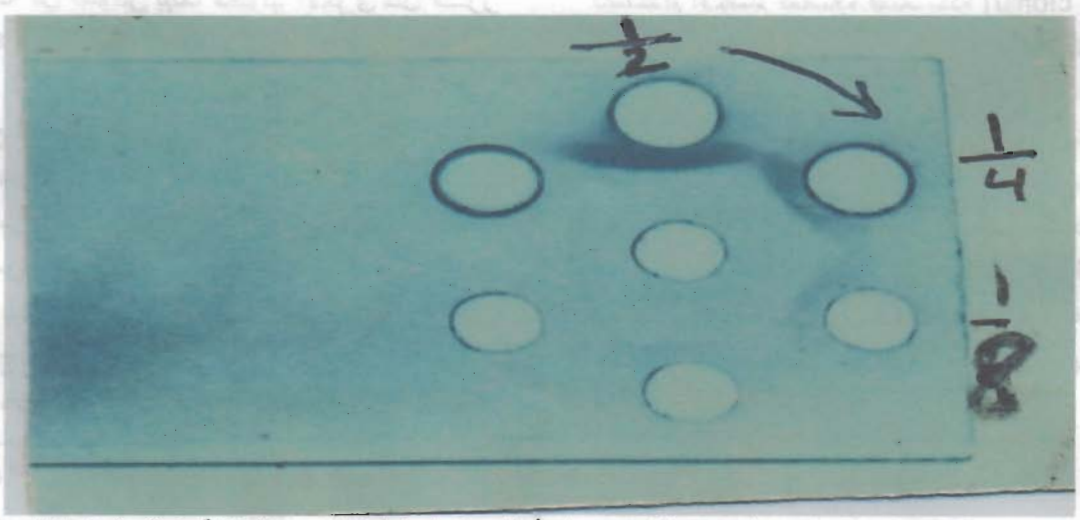
*تاريخ استلام البحث 2004/7/10 ، تاريخ قبول البحث 2005/5/14

المواد وطرائق العمل

استخلص كلايدين الحنطة باستخدام الايثانول 70% بعد ازالة الالبومينات والكلوبيولينات بـ 0.15 مولار كلوريد الصوديوم ، والكلوتنيين بـ 1% حامض الخليك وفق ما ذكره Ayob وزملاؤه (2) وقدر البروتين بطريقة بايوريت (5)، واجريت عملية حقن لاثنين من الارانب من النوع النيوزلندي بكلايدين الحنطة وبتركيز ابتدائي 1.5 ملغم / مل ونهائي 7.5 ملغم / مل خلال مدة الحقن التي استمرت ثلاثة اسابيع تخللتها ثلاثة ايام استراحة في الاسبوع وكانت الزيادة في التركيز بمقدار 0.5 ملغم ماعدا الحقنة الاخيرة التي كانت الزيادة فيها بمقدار 1 ملغم / مل وكان الانموذج يحقن بعد خلطه مع مستحلب الليستين : برافين (1 : 9) وبعد اسبوع من اخر حقنة سحب الدم من الوريد الاذني للارانب وفصل المصل كما ذكره Garvey وزملاؤه (5) ، ثم اجري فحص الانتشار المناعي المزدوج للكشف عن عيارية المصل المضاد وللكشف عن نسب الكلايدين الداخلة في منتجات اللحوم الممزوجة بطحين الحنطة والمعاملة بدرجات حرارة (80 ، 100 ، 121) م° ولمدة 15 دقيقة. وقد تم استخلاص الكلايدين بالايثانول وفق ما ذكره Ayob وزملاؤه (2) فبعد خلط الطحين مع اللحم بنسب (1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5)% اخذ 12 غم من المزيج واضيف له 48 مل ماء ثم عرضت النماذج الى درجات الحرارة المذكورة انفاً وبعد تبريدها اخذ 1.5 غم من الخليط وذوب في 8.5 مل من الكحول الاثيلي 70% وبعد المزج لمدة 30 دقيقة اصبحت النماذج جاهزة للكشف عنها بفحص الانتشار المناعي المزدوج . كما استخدم الفحص ذاته للكشف عن كلايدين البسكت والذي استخلص بخلط 20 ملغم من البسكت المطحون مع 70 مل من كحول الايثانول 70% وبعد المزج لمدة 30 دقيقة اخذ الرائق واجري الفحص حيث حضر هلام الاكار باذابته في دارىء الفوسفات الملحي وبنسبة 1% وكان pH المحلول (7.2) وسخن الى درجة حرارة (90 م°) ثم برد الى درجة حرارة (57 م°) قبل صبه على شرائح زجاجية ثم ثقب الهلام بالمثقب المجهز من شركة LKB السويدية ووضع (10 مايكروليتر) من المصل او المحلول البروتيني في كل حفرة من الحفر الخاصة بها بعدها تركت الشرائح الزجاجية في غرفة رطبة Humid Chamber لمدة 24 ساعة تكونت خلالها الخطوط الترسيبية البيضاء بعدها بللت ورقة ترشيح ووضعت على الشريحة ثم وضعت فوقها خمس اوراق ووضع فوقها ثقل مقداره 1 كغم واستبدلت الاوراق باخرى جديدة عدا ورقة الترشيح الاولى واعيد الضغط حتى جفاف الهلام تماماً عندها صبغت الشريحة باستخدام صبغة Comassei Brilliant Blue R250 (0.05%) مذابة في محلول مكون من الايثانول – حامض الخليك – ماء (50-5-45) لمدة 15 دقيقة بعدها غسلت الشريحة باستخدام محلول الغسل المكون من الايثانول وحامض الخليك والماء بنفس نسب محلول التصبيغ.

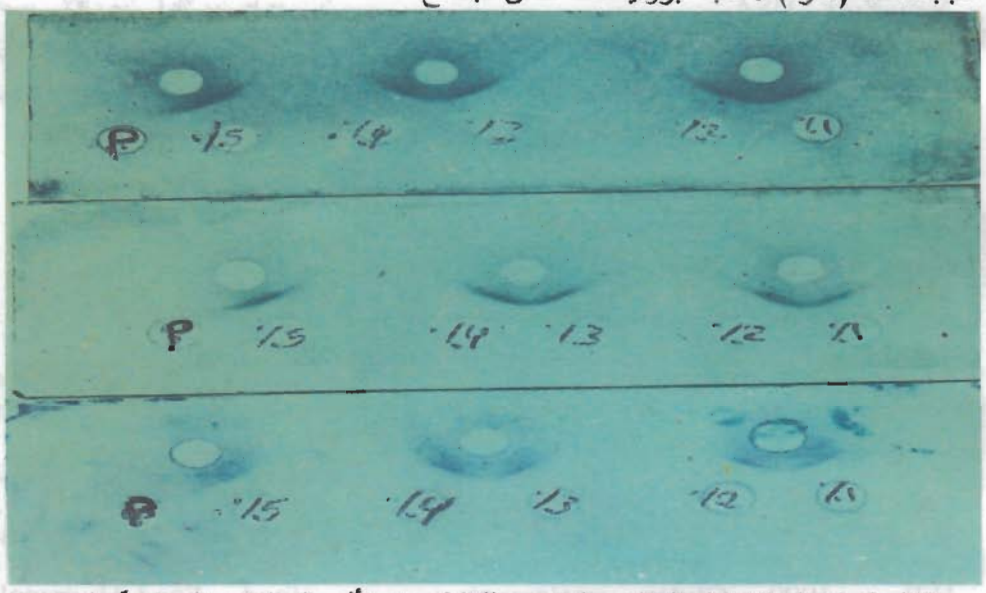
النتائج والمناقشة

يوضح شكل (1) نتائج اختبار الانتشار المناعي المزدوج لتقدير عيارية المصل المضاد لكلايدين الحنطة ويلاحظ ظهور فعالية المصل حتى تخفيف (8/1) وهي فعالية متوسطة ولكن يمكن استخدامها في اجراء الفحوص المناعية .



شكل (1) اختبار الانتشار المناعي المزدوج لتقدير عيارية المصل المضاد لكلايدين الحنطة. تمثل الحفرة المركزية المستخلص الكحولي للكلايدين وتمثل الحفر المحيطة المصل المضاد بعد تخفيفه تخفيفات متوالية

وعند خلط نسب مختلفة من طحين الحنطة مع اللحم بالنسب (1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5)% ثم معاملة هذه النتائج بالتسخين الى 80 ، 100 ، 121 م ولمدة 15 دقيقة (شكل 2) ، ولما كانت الدرجات الحرارية العالية تسبب مسخاً (دنترة) لاغلب البروتينات فأن نجاح اختبار الانتشار المناعي في الكشف عن نسبة 1% يدل على بقاء بعض بروتينات الحنطة غير متأثرة مثل ω-gliadin الموجودة ضمن تركيب الكلايدين والذي يمتاز بتحمله للحرارة العالية (7) .

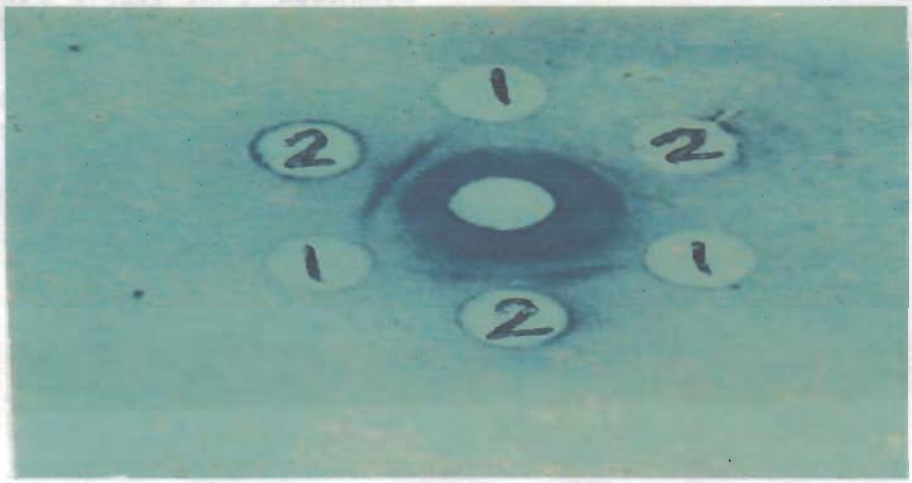


شكل 2. اختبار الانتشار المناعي المزدوج للكشف عن تأثير المعاملات الحرارية ولمدة ربع ساعة في الفعالية المستضدية لكلايدين الحنطة في نماذج اللحم الممزوجة مع الطحين بنسب مختلفة .

المصل المستخدم للكشف محضر من كلايدين الحنطة غير المعامل حرارياً

أ- تمثل مستخلص لحم مطبوخ خال من الطحين

اجريت تجربة اخرى على أنموذج بسكويت تجاري للكشف عن الكلايدين فيه فلوحظ عدم ظهور خط ترسيبي في هلام الاكار وهذا يعود الى المسخ الحراري (الدنترة) للبروتينات لشدة حرارة شوي البسكويت اذ تصل الى (180 – 220 م) فتغير التركيب البنائي لبروتينات الكلايدين ومن ثم عدم تفاعلها مع المصل المضاد لكلايدين الحنطة غير المعاملة حرارياً، لذلك اجريت تجربة استرجاع طبيعة بروتين الكلايدين Renaturation باضافة الـ SDS لمستخلص البسكويت وتسخينه بدرجة الغليان مدة 3 دقائق فلوحظ (كما في الشكل 3) ظهور خطوط ترسيبية وهذا يعود الى عمل الـ SDS والذي يرتبط بالبروتين ويتوزع عليه مما يسبب تنافراً بين الشحنات السالبة للـ SDS ويؤدي الى امتداد الجزيئة البروتينية وجعلها بشكل سلاسل مستقيمة واظهار بعض محدداتها المستضدية بعد ان كانت بشكل متكتل نتيجة المعاملة الحرارية (11).



شكل 3. اختبار الانتشار المناعي المزدوج للمستخلص الكحولي لبسكويت تجاري قبل وبعد استرجاع طبيعة الكلايدين بالـ SDS . المصل المستخدم للكشف حضر من كلايدين الحنطة غير المعامل حراريا

الحفرة (1) : المستخلص الكحولي للبسكويت التجاري

الحفرة (2) : المستخلص الكحولي للبسكويت المسترجع بالـ SDS

نستنتج من هذه النتائج انه بالامكان استخدام هذه التقنيات للكشف عن بروتينات الحبوب المسببة لحساسية الحنطة في الاغذية حتى لو كانت معاملة حراريا الى درجة تؤدي الى مسخ البروتين فيها . كما ان هذه الطريقة قد تتحسس لاقل من 1% من طحين الحنطة في الاغذية التي تم فحصها لكن الدراسة اقتصرت على 1% كحد ادنى.

المصادر

1.Ayob , M.K. 1988. Development of enzyme – Linked Immunosorbent assays (ELISAs) for the detection of food additives , adulterants and contaminants . Ph. D. Thesis . University of Salford. Faculty of Research , North East Institute , Deeside , Clwyd.

2.Ayob , M.K. ; J. Rittenburg , J.C. Allen , and C.J. Smith , 1988. Development of a rapid – Linked Immunosorbent assay (ELISA) for gliadin determination in food Food Hydrocolloids 2 (1) : 39-49.

3.Booth , M.R. and J.A.D. Ewart , 1970. Relationship between wheat proteins. J. Sci. Food Agric. 21 : 187-192.

4.Chirdo , F.G. ; M.C. Anon , and C.A. Fossati , 1988. Development of high – sensetive Enzyme Immunoassays for gliadin quantification using the streptavidin – Biotin amplification system . Food and Agricultural Immunology 10 : 143-155.

5.Garvy , J.S. ; N.E. Gremer , and D.H. Sussdorf , 1977. Method in Immunology , 3rd ed., W., A., Bojamin , INC , Donmills. No. Canada .

6.Hartsook , E.I. (1984). Celiac sprue : sensetivity to gliadin. Cereal Food World 29 (2) : 157.

7.Lasztity , R. 1984. The Chemistry of Cereal Proteins . CRC. Press , INC . Boca Raton Florida . P15 .

8.Nordlee , J.A. and S.A.Taylor , 1995. Immunological Analysis of Food allergens and other proteins . Food Technology 129.

9.Robert , K. Scopes 1982. Protein purification , principle and practice . New York , USA.

10.Rumbo , M. ; F.G. Chirdo , M.C. Anon , and C.A. Fossati , 1997. Immunoblotting of gliadin seperated by PAGE : analysis of electrotransferece condition. Food and Agricultural Immunology 9 : 135-139.

11.Rumbo , M. ; F.G. Chirdo , A.C. Fossati , and M.C. Anon , 1990. Influence of thermal treatment of food on the iummunochemical quantification of gliadin. Food and Agricultural Immunology 8 : 195-203.

12.Skerritt , J.H. 1985. A sensitive monoclonal-antiboy-based test for gluten detection : Quantitative Immunoassay . J. Sci. Food Agric. 36 : 987-994.

13.Skerritt , J.H. ; J.M. Devery , and A.S. Hill , 1990. Gluten intolerance : chemistry , celiac – toxicity , and detection of prolamins in food . Cereal Food World 35 (7) : 638-644.

14.Skerritt , J.H ; J.A. Diment , and C.W. Wrigley , 1985. A sensetive monoclonal antibody – based test for gluten detection : Choice of primary and secondary antibody. J. Sci. Food Agric. 36 : 995-1003.

15.Skerritt , J.H. and R.A. Smith , 1985. A sensitive monoclonal-antibody-based test for gluten detection : studies with cooked or processed food J. Sci. Food Agric. 36 : 980-986.

16-عزيز ، سلاوى ليلو ، عبدالمجيد حماد السامرائي ، وضحى داود سلمان ، . (2005). الكشف عن كلايدين الحنطة و العلاقة المناعية لبعض بروتينات الحبوب بطريقة الانتشار المناعي . (تحت النشر).