

ALLERGENITÄT UND NACHWEISBARKEIT VON HASELNÜSSEN IN MODELL-LEBENSMITTELN

Albert Nemes¹, Caroline Leidinger¹, Angelika Petrasch², Mathias Kinner², Christof Ebner³, Margit Cichna-Markl¹

¹ *Institut für Analytische Chemie, Universität Wien, Währinger Straße 38, 1090 Wien*

² *Department für Lebensmittelwissenschaften und –technologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, 1190 Wien*

³ *Ambulatorium für Allergie und Klinische Immunologie, Reumannplatz 17, 1010 Wien*

E-Mail: albert.nemes@gmail.com

Schlüsselwörter: Allergenität, Haselnuss, Modell-Lebensmittel, Immunoblotting, Real-time PCR

EINLEITUNG

Die Haselnuss (*Corylus avellana*) wird wegen ihres besonderen Geschmacks häufig in Backwaren und Süßigkeiten verwendet. Die Menge an Haselnüssen in diesen Produkten wird oft als Qualitätsmerkmal herangezogen. Etwa 0,1-0,5% der europäischen Bevölkerung leiden jedoch an einer Haselnussallergie.

Es sind bereits einige allergene Proteine der Haselnuss identifiziert worden. Cor a 1 (18 kDa), ein PR10-Protein, und Cor a 2 (14 kDa), ein Profilin, weisen eine hohe Strukturhomologie zu Birkenpollenallergenen auf. Zu den Haselnussallergenen ohne Homologie zu Pollenproteinen zählen das Lipidspeicherprotein Cor a 8 (9 kDa), das 11S Globulin-ähnliche Samenspeicherprotein Cor a 9 (40 kDa) und das Vicilin Cor a 11 (48 kDa) [1-4].

Studien haben gezeigt, dass die Verarbeitung von Lebensmitteln einen Einfluss auf ihre Allergenität haben kann. Wenn es als Folge der Verarbeitung zu einer Inaktivierung

oder Zerstörung von Epitopen kommt, sinkt die Allergenität; führen die Verarbeitungsprozesse hingegen zu einer Bildung oder zum besseren Zugang von Epitopen, kann die Allergenität steigen [5, 6]. Eine Studie, in der die Allergenität von verschiedenen Haselnussprodukten untersucht wurde, hat gezeigt, dass die IgE-Bindungsaktivität der Proteine aus den Produkten verglichen zu den Proteinen aus der nativen Haselnuss reduziert, ihr allergenes Potential jedoch nicht eliminiert war [7].

Zum Schutz von Lebensmittelallergikern wurde die Haselnuss von der Europäischen Kommission in die Liste der kennzeichnungspflichtigen Lebensmittelzutaten aufgenommen [8]. Die Einhaltung der Kennzeichnungspflicht muss mit geeigneten Analysemethoden überprüft werden. Prozesse, die bei der Verarbeitung von Lebensmitteln angewendet werden, können die Nachweisbarkeit von Allergenen jedoch beeinflussen, z.B. indem die Löslichkeit und damit die Extrahierbarkeit des Analyten (Protein bzw. DNA) reduziert ist [9].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, haselnusshaltige Lebensmittel unter genau definierten Bedingungen herzustellen und den Einfluss der Verarbeitung von Haselnüssen sowohl auf ihre Allergenität als auch auf ihre Nachweisbarkeit mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) zu untersuchen.

EXPERIMENTELLES

Herstellung der Modell-Lebensmittel

Die Haselnüsse wurden im Backofen bei Ober- und Unterhitze bei 180 °C für 21 min geröstet und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit dem Alexanderwerk zerkleinert. Die Mandeln wurden bei gleicher Temperatur für 15 min geröstet und anschließend gleich behandelt.

Zur Herstellung von Krokant (Haselnussanteil laut Rezeptur 25%) wurden 375 g Zucker karamelisiert und mit 125 g gerösteten, zerkleinerten Nüssen vermischt. Das Krokant wurde auf einem befetteten Backpapier ausgewalkt und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit dem Alexanderwerk zerkleinert.

Zur Herstellung des Haselnussgetränks (Haselnussanteil laut Rezeptur 25%) wurden 1500 g Wasser auf 55 °C erhitzt und mit 500 g gerösteten, zerkleinerten Nüssen mit

dem Ultra-Turrax vermischt. Anschließend wurde die Mischung für 5 min auf 90 °C erhitzt. Danach wurde der Slurry auf Raumtemperatur abgekühlt, zentrifugiert (10 min, 3500 rpm) und der Überstand (= Haselnussgetränk) abdekantiert.

Die Haselnuss-Mandelgetränk (laut Rezeptur 12,5% Haselnuss- und 12,5% Mandelanteil) wurde wie das Haselnussgetränk hergestellt und zur Produktion des Nusskuchens verwendet. 200 g Butter wurden schaumig gerührt und schrittweise mit 200 g Zucker, 15 g Vanillezucker, 4 Eidotter und 1 Esslöffel Rum versetzt. Anschließend wurde abwechselnd Mehl (insgesamt 500 g) mit Backpulver (15 g) und das Haselnuss-Mandelgetränk (125 g) zum Teig zugegeben. Das Eiweiß von 4 Eiern wurde steif geschlagen und unter den Teig gehoben. Der Teig wurde bei 180 °C Ober- und Unterhitze für 40 min gebacken.

Zur Herstellung von Nougatcreme (Haselnussanteil laut Rezeptur 35%) wurden 1928 g Nüsse, 1350 g Zucker, 800 g Magermilchpulver und 5 g Kochsalz abgewogen und im Bär Varimixer vermischt. Die weiteren Zutaten (735 g Kakaobutter, 638 g Sonnenblumenöl und 2,5 g Lecithin) wurden erwärmt und mit den restlichen Zutaten vermischt. Das Gemisch wurde für 5 min gerührt, die Rohmasse in eine Kugelmühle überführt und 45 min gemahlen. Die Temperatur wurde auf unter 50 °C gehalten.

Protein- und DNA-Extraktion

Zur Isolierung der Proteinfraction wurden die Lebensmittel zunächst entfettet, danach mit Hilfe des Ultra Turrax in PBS-Puffer homogenisiert und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Extrakt wurde zentrifugiert und der Überstand filtriert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradfordassay bestimmt. Die DNA wurde mit der CTAB-Methode extrahiert und die Konzentration und Reinheit durch Messung der Extinktion bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) bestimmt [10].

Immunoblotting

Die in den Extrakten enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,2 μm) geblottet. Die transferierten Proteine wurden entweder mit Amido Black gefärbt oder zur Immunfärbung mit Seren von zwölf Haselnuss- bzw. Nussallergikern inkubiert. Zur Detektion wurde ein in einer Ziege

hergestellter Anti-Human IgE Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase markiert war, verwendet.

PCR Analyse

Zum Nachweis der Haselnuss in den Produkten wurde eine real-time PCR Methode eingesetzt, bei der ein 109 bp langer Abschnitt des für das Allergen Cor a 1 codierenden Gens amplifiziert wurde [10].

ERGEBNISSE

Immunoblotting

Abbildung 1 zeigt die geblotteten und mit Amido Black gefärbten Proteine von Extrakten der nativen Haselnuss, der gerösteten Haselnuss und verschiedener Haselnussprodukte.

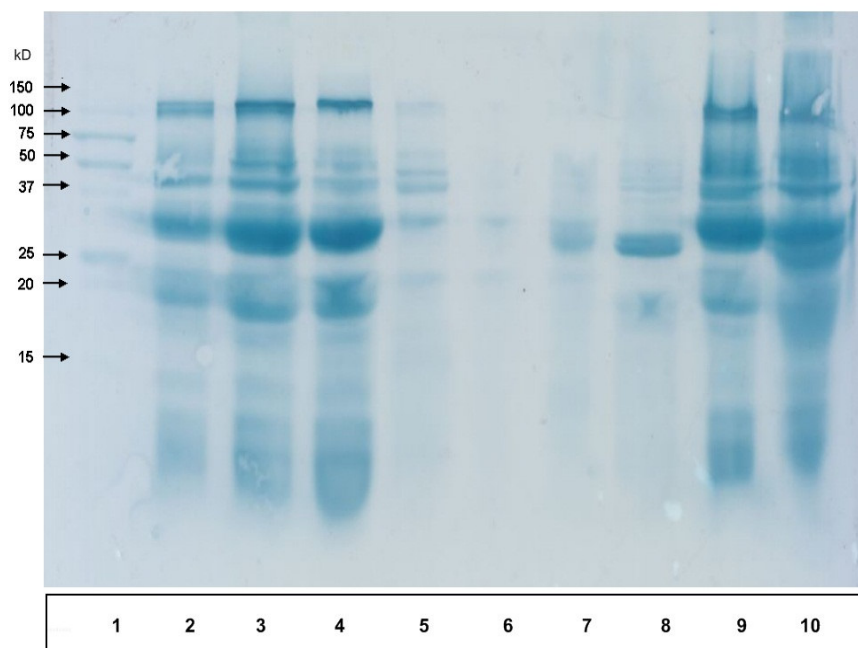


Abb. 1: Blot von Proteinextrakten der nativen Haselnuss, der gerösteten Haselnuss und verschiedener Haselnussprodukte, gefärbt mit Amido Black. (1 Proteinmarker; 2 native Haselnuss; 3 geröstete Haselnuss (Proteinkonz. 10,8 mg/mL); 4 Haselnussgetränk (Proteinkonz. 11,3 mg/mL); 5 Nusskuchen (Proteinkonz. 1,4 mg/mL); 6-8 Negativkontrollen (Proteinkonz. 1,0-2,2 mg/mL); 9 Krokant (Proteinkonz. 10,4 mg/mL); 10 Nougatcreme (Proteinkonz. 26,6 mg/mL)).

Bei der nativen Haselnuss lagen die markanten Proteinbanden bei 10-12, 16, 18, 23, 25-33, 36 40, 49 und 55 kDa. Bei der gerösteten Haselnuss, dem Haselnussgetränk, dem Krokant und der Nougatcreme unterschied sich das Bandenmuster nicht wesentlich. Aufgrund der geringeren Proteinkonzentration des Extrakts wurden beim Nusskuchen deutlich schwächere Banden erhalten.

Abbildung 2 zeigt einen im Rahmen der Arbeit erhaltenen Immunoblot, der durch Inkubation mit dem Serum eines Nussallergikers (der auch gegen Haselnüsse allergisch ist) erhalten wurde.

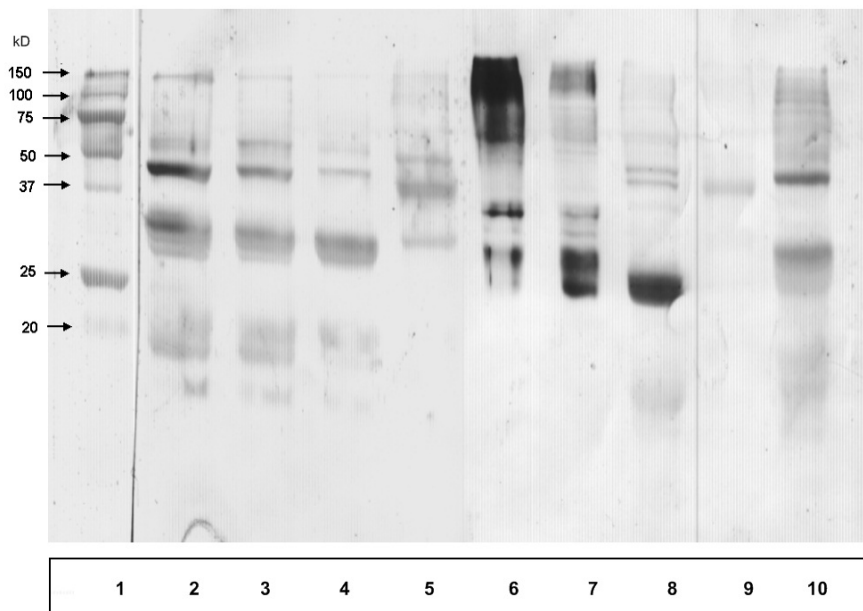


Abb. 2: Immunoblot von Proteinextrakten der nativen Haselnuss, der gerösteten Haselnuss und verschiedener Haselnussprodukte. 1 Marker; 2 native Haselnuss; 3 geröstete Haselnuss; 4 Haselnussgetränk; 5 Nusskuchen; 6-8 Negativkontrollen; 9 Krokant; 10 Nougatcreme.

Die Immunoblots der Proteinextrakte des Haselnussgetränks und des Krokants waren denen von nativen und gerösteten Haselnüssen sehr ähnlich. Die Intensität der beim Krokant erhaltenen Banden war deutlich schwächer, außerdem fehlten die Banden der Proteine mit einem Molekulargewicht < 20 kDa. Auch beim Nusskuchen kam es zu einem Intensitätsverlust der Banden der Proteine mit kleineren Molekulargewichten. Diese Ergebnisse weisen auf eine Veränderung der Epitope der niedermolekularen allergenen Haselnussproteine im Krokant und im Nusskuchen hin. Verglichen zur

nativen Haselnuss ist die IgE-Bindungsaktivität der Haselnussproteine im Nusskuchen und im Krokant reduziert, aber nicht eliminiert.

PCR

Mit Ausnahme des Haselnussgetränks konnte aus allen Modell-Lebensmitteln DNA in ausreichender Menge (Konzentration > 20 ng/µl) und Reinheit ($A_{260}/A_{280} \sim 1,6 - 1,8$) isoliert werden, um sie mittels real-time PCR analysieren zu können. Die erhaltenen Ct-Werte sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Ergebnis der PCR Analyse

Haselnussprodukt	Haselnussanteil [%]	Ct-Wert*
native Haselnuss (Kontrolle)		22,60
Haselnussgetränk	12,5	-
Nusskuchen	2	/
Krokant	25	26,13
Nougatcreme	35	22,95

Erklärung: * Mittelwert aus Doppelbestimmung; - DNA konnte nicht in ausreichender Reinheit und Menge isoliert werden; / Signal überschritt nicht den Schwellenwert

Für die native Haselnuss wurde ein Ct-Wert von 22,60 erhalten. Für die Nougatcreme wurde ein geringfügig höherer Ct-Wert ermittelt, bei Krokant betrug der Ct-Wert 26,13. Im Fall des Nusskuchens wurde kein Fluoreszenzanstieg beobachtet. Das negative PCR Ergebnis ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass für die Herstellung des Kuchens ein Haselnuss-Mandelgetränk verwendet wurde. Es ist anzunehmen, dass der DNA-Extrakt kaum Haselnuss-DNA, sondern DNA von anderen Kuchenbestandteilen enthält.

LITERATUR

- [1] HIRSCHWEHR, R.; VALENTA, R.; EBNER, C.; FERREIRA, F.; SPERR, W. R.; VALENT, P.; ROHAC, M.; RUMPOLD, H.; SCHEINER, O.; KRAFT, D. (1992): Identification of common allergenic structures in hazel pollen and hazelnuts: a

- possible explanation for sensitivity to hazelnuts in patients allergic to tree pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 90: 927-936.
- [2] PASTORELLO, E. A.; VIETHS, S.; PRAVETTONI, V.; FARIOLI, L.; TRAMBAIOLI, C.; FORTUNATO, D.; LÜTTKOPF, D.; CALAMARI, M.; ANSALONI, R.; SCIBILIA, J.; BALLMER-WEBER, B. K.; POULSEN, L. K.; WÜTRICH, B.; SKAMSTRUP HANSEN, K.; ROBINO, A. M.; ORTOLANI, C.; CONTI, A. (2002): Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109: 563-570.
- [2] BEYER, K.; GRISHINA, G.; BARDINA, L.; GRISHIN, A., SAMPSON, H. A. (2002): Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110: 517-523.
- [4] LAUER, I.; FOETISCH, K.; KOLARICH, D.; BALLMER-WEBER, B. K.; CONTI, A.; ALTMANN, F.; VIETHS, S.; SCHEURER, S. (2004): Hazelnut (*Corylus avellana*) vicilin Cor a 11: molecular characterization of a glycoprotein and its allergenic activity. *Biochem. J.* 383: 327-334.
- [5] MALEKI, S. J. (2004): Food processing: effects on allergenicity. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 4: 241-245.
- [6] SATHE, S. K.; SHARMA, G. M. Effects of food processing on food allergens. *Mol. Nutr. Food Res.* 53: 970-978.
- [7] WIGOTZKI, M.; STEINHART, H.; PASCHKE, A. (2001): Determination of the allergenicity of various hazelnut products by immunoblotting and enzyme allergosorbent test inhibition. *J. Chromatogr. B* 756: 239-248.
- [8] DIRECTIVE 2003/89/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 10. November 2003 zur Änderung der Richtlinie 2000/13/EG hinsichtlich der Angaben der in Lebensmitteln enthaltenen Zutaten. *Amtsblatt der Europäischen Union* vom 25. November 2003.
- [9] MILLS, E. N. C.; SANCHO, A. I.; RIGBY, N. M.; JENKINS, J. A.; MACKIE, A. R. (2009): Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Mol. Nutr. Food Res.* 53: 963-969.
- [10] SCHÖRINGHUMER, K.; REDL, G.; CICHNA-MARKL, M. (2009): Development and validation of a duplex real-time PCR method to simultaneously

detect potentially allergenic sesame and hazelnut in food. *J. Agric. Food Chem.* 57:
2126-2134.