

Konfitüren, Säfte und Trocknung biologisch angebaute Lebensmittel: Was geschieht mit Allergenen während der Verarbeitung?

Kurze E¹ & Schwab W¹

Keywords: food allergy, plant allergens, cross-reactivity, PR-10, ELISA.

Abstract

Food allergy is an increasing health problem, whereby plant allergens are one of the major source eliciting allergic reactions. Ninety percent of birch pollen allergic patients develop intolerances to fruits and vegetables. Antibodies against Bet v 1, the major birch pollen allergen, cross-react with Bet v 1-homolog proteins present in a variety of fruits and vegetables. Bet v 1 and Bet v 1-homolog proteins belong to the family 10 of pathogenesis-related proteins (PR-10). In plants PR-10 proteins are induced in various stress conditions, e.g. pathogen attack, wounding or environmental factors. The amount of allergens is influenced by pre- and post-harvesting factors, such as cultivar, organic or conventional cultivation and storage conditions as well as different processing methods. The aim of the project is to develop an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to determine the allergen content in fruits (apple, strawberry, plum, tomato) and processed food products (apple juice, strawberry jam). The influence of organic versus conventional farming on the allergen content will be investigated. Furthermore, the effects of different processing techniques will be analyzed.

Einleitung und Zielsetzung

Die Häufigkeit allergischer Reaktionen, insbesondere von Lebensmittelallergien, hat in den letzten Jahren stark zugenommen. 2 % der erwachsenen Bevölkerung und 5-8 % der Kinder unter 3 Jahren sind von einer Immunglobulin E-vermittelten Lebensmittelallergie betroffen (Sancho *et al.* 2006). Das Birkenpollenallergen Bet v 1 zählt zu den Pathogenese-assoziierten Proteinen (*pathogenesis-related* PR), welche von der Pflanze als Abwehrmechanismus bei Pathogenbefall, Verwundung oder Umweltveränderungen gebildet werden. Strukturähnliche Proteine, die Bet v 1-Homologen, kommen in zahlreichen Obst- und Gemüsearten vor. Daher zeigen 90 % der Birkenpollenallergiker allergische Reaktionen nach dem Genuss von rohem Obst (Apfel, Pflaume, Erdbeere, Pfirsich) sowie verschiedenen Gemüsesorten (Tomate, Karotte, Sellerie) (Kleine-Tebbe J & Jakob T 2015). Bei einer Kreuzreaktivität reagieren Antikörper gegen das Birkenpollenallergen Bet v 1 mit strukturähnlichen Pflanzenallergenen anderen Ursprungs, wie z.B. dem Hauptapfelallergen Mal d 1.

PR-10 Proteine besitzen ein Molekulargewicht von 15-18 kDa und sind instabil gegenüber Hitze, Oxidation und proteolytischem Verdau (Sancho *et al.* 2006). Die

² Johann Heinrich von Thünen-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei, Institut für Ökologischen Landbau, Trenthorst 32, 23847, Westerau, Deutschland, stephanie.witten@thuenen.de, karen.aulrich@thuenen.de, www.thuenen.de

male Schussposition auf der Stirn des Rindes ist (bei Kugel- und Bolzenschussbetäubung) leicht oberhalb (1,25 cm – 2 cm) der gedachten und gekreuzten Linien, jeweils zwischen Mitte Hornansatz und gegenüberliegend Mitte Auge (Holleben von *et al.* 2002).

biologische Funktion vieler PR-10 Proteine ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Sinha *et al.* 2014). Jedoch weist die Proteinstruktur eine Kavität auf, in welche hydrophobe Moleküle binden können. Bet v 1 bindet künstliche und natürlich vorkommende hydrophobe Moleküle, wie Cytokinine und Phytosterole (Casanal *et al.* 2013).

Die Bestimmung und Kennzeichnung von Allergenen in Obst und Gemüse ist heute ein immer wichtig werdender Bestandteil der Lebensmittelsicherheit. Faktoren, welche den Allergehalt der Pflanze beeinflussen, sind unter anderem die Obst- bzw. Gemüsesorte, Umweltfaktoren, der Anbau (ökologisch bzw. konventionell) sowie die Verarbeitungstechnik der Lebensmittel. Ziel der Arbeit ist es, den Allergehalt verschiedener roher und verarbeiteter Produkte mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) zu bestimmen und zu bewerten. Dabei wird sowohl zwischen ökologisch und konventionell angebauten Früchten als auch verschiedenen Verarbeitungstechniken der Lebensmittel, wie der Herstellung von Marmeladen, Säften und diversen Trocknungsmethoden, unterschieden.

Methoden

Die rekombinanten PR-10 Proteine wurden in *Escherichia coli* synthetisiert und affinitätschromatografisch gereinigt. Die Messung des Allergehaltes in rohen und verarbeiteten Früchten erfolgte mittels indirektem kompetitivem ELISA (Sancho *et al.* 2006). Dazu wurde das Protein auf der Polystyroloberfläche einer 96-Well-Mikrotiterplatte immobilisiert. Von den zu untersuchenden Fruchtproben wurden Proteinextrakte hergestellt, welche das Allergen von Interesse in unbekannter Konzentration enthielten. Das rekombinante Protein mit bekannter Proteinkonzentration wurde als Referenz zur Erstellung einer Standardkurve verwendet. Das freie Allergen der Probe bzw. das Referenzprotein konkurriert mit dem immobilisierten Protein auf der Oberfläche um die Bindungsstellen des spezifischen Detektorantikörpers (Abb.1). Durch Waschschrte wurden nicht an die Oberfläche gebundenen Komponenten entfernt. Mit Hilfe eines sekundären Antikörpers, welcher mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP *horseradish peroxidase*) markiert war, kann die Reaktion durch Umsetzung des Substrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) kolorimetrisch detektiert werden.

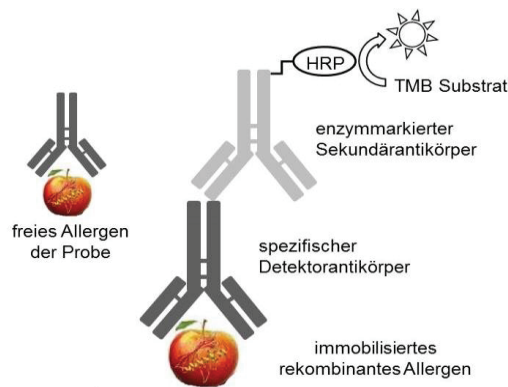


Abbildung 1: Bestimmung des Allergehaltes in Früchten und verarbeiteten Lebensmittel mittels indirektem kompetitivem ELISA

Ergebnisse

Zur Detektion der PR-10 Proteine wurde ein indirekter kompetitiver ELISA etabliert und optimiert. Abbildung 2 zeigt die Standardkurve für das Mal d 1 zur Bestimmung des Allergengehaltes in Äpfel bzw. Apfelsaft, welche mit dem rekombinanten Protein erstellt wurde. Durch die Konkurrenzreaktion zwischen immobilisiertem und freiem Protein um die Bindungsstellen am Antikörper sinkt das Absorptionssignal mit steigenden Konzentrationen an freiem Mal d 1. Die Konzentrationen an immobilisiertem Mal d 1 sowie an spezifischem Detektorantikörper bleiben gleich.

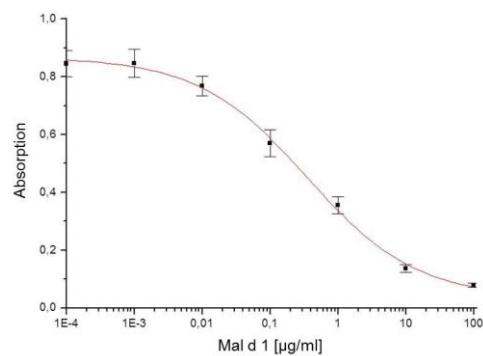


Abbildung 2: Standardkurve für den indirekt kompetitiven ELISA zur Bestimmung des Mal d 1-Gehaltes

Der Apfelsaft wurde aus ökologisch angebauten Früchten aus Estland mit drei verschiedenen Methoden (Wasserpresse, Beltpresse, Rackpresse) hergestellt. Alle Säfte wurden vor der Messung des Allergengehaltes mittels ELISA dialysiert, um kleine Substanzen wie Zuckermoleküle oder Polyphenole zu entfernen. Abbildung 3 zeigt die Abnahme des Allergengehaltes nach der Dialyse. Abbildung 4 stellt die Mal d 1-Konzentration der Apfelsäfte der Sorten Krista und Kramerli tuvioun dar, welche mit unterschiedlichen Pressmethoden hergestellt wurden.

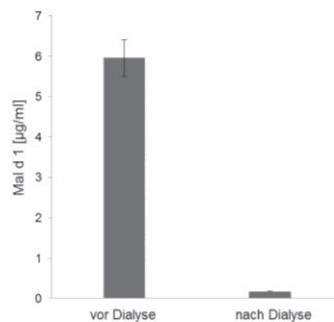


Abbildung 3: Mal d 1-Gehalt in µg/ml in Apfelsaft der Sorte Krista vor und nach der Dialyse

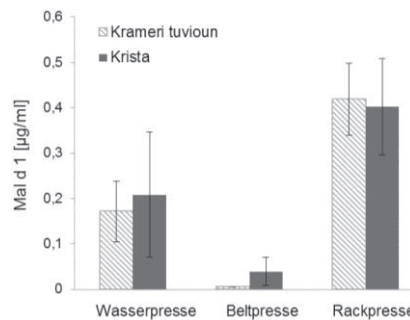


Abbildung 4: Mal d 1-Gehalt in µg/ml in Apfelsaft der Sorten Krista und Kramerli tuvioun hergestellt mit drei verschiedenen Pressmethoden

Diskussion

Die Entwicklung eines indirekten kompetitiven ELISA zur Bestimmung des Allergengehaltes in Äpfeln wurde bereits von Sancho *et al.* (2006) beschrieben. Der Mal d 1-Gehalt ist sortenabhängig. Auch die Lagerbedingungen der Früchte nach der Ernte haben einen entscheidenden Einfluss auf den Gehalt an Mal d 1.

Die Ergebnisse des indirekten kompetitiven ELISA zur Bestimmung des Mal d 1-Gehaltes in Apfelsaft zeigen, dass in allen untersuchten Apfelsaftproben nach der Dialyse ein geringerer Gehalt des Hauptapfelallergens Mal d 1 zu detektieren ist. Durch den Dialyseprozess werden niedermolekulare Substanzen wie Zucker und Polyphenole aus der zu untersuchenden Probe entfernt werden. Es ist bekannt, dass Polyphenole mit Proteinen interagieren was bei der Allergenbestimmung mittels ELISA zu artifiziell erhöhten Allergengehalten führt. Die Entfernung der Polyphenole vor der Bestimmung mittels ELISA ist deshalb essentiell um den realen Allergengehalt zu bestimmen.

Allergenbestimmungen von Apfelsäften, die mittels verschiedener Verfahren gewonnen wurden deuten darauf hin, dass der Herstellungsprozess der Säfte einen entscheidenden Einfluss auf den Allergengehalt hat. Trotz eines Pasteurisierungsschrittes der Säfte bei 85 °C für 1 Minute ist das Hauptallergen Mal d 1 mit der etablierten ELISA-Methode noch nachweisbar.

Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Ergebnisse der Versuche zeigen, dass mit dem indirekten kompetitiven ELISA eine Methode entwickelt wurde, um das Pflanzenallergen Mal d 1 in rohen Früchten bzw. verarbeiteten Lebensmitteln quantitativ zu detektieren. Die Wahl einer geeigneten Methode zur Extraktion von Proteinen aus den Fruchtproben ist sehr entscheidend, um eine korrekte Quantifizierung der Allergen zu gewährleisten.

Danksagung

Wir bedanken uns bei dem Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN) für die finanzielle Förderung im Rahmen des Projektes "Drying, Juices and Jams of Organic Fruit and Vegetables: what happens to Desired and Non-Desired compounds?". Wir danken Roberto Lo Scalzo (CREA-IAA, Italien) und Ulvi Moor (Estonian University of Life Sciences, Estland) für die Bereitstellung der zu untersuchenden Proben.

Literatur

- Casanal A *et al.* (2013) The Strawberry Pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra a Proteins Control Flavonoid Biosynthesis by Binding to Metabolic Intermediates. *Journal of Biological Chemistry* Vol. 288, No. 49: 35322-35332
- Matthes & Schmitz-Eiberger (2009) Apple (*Malus domestica* L. Borkh.) Allergen Mal d 1: Effect of Cultivar, Cultivation System, and Storage Conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 10548-10553.
- Kleine-Tebbe J & Jakob T (2015) *Molekulare Allergiediagnostik*. Springer Berlin Heidelberg
- Sancho *et al.* (2006) Effect of Postharvest Storage on the Expression of the Apple Allergen Mal d 1. *J. Agric. Food Chem.* 54: 5917-5923
- Sinha *et al.* (2014) Current Overview of Allergens of Plant Pathogenesis Related Protein Families. *The Scientific World Journal* 9: 1-19.