



VOEDSELALLERGENEN INVLOED VAN VOEDSELBEWERKING

K. VAN VLIERBERGHE

PhD Student

Instituut voor landbouw-, visserij-
en voedingsonderzoek (ILVO)

Eenheid Technologie en Voeding, domein
productkwaliteit en -innovatie

De enige behandeling van een voedselallergie tot op vandaag is het voedselallergeen uit de voeding elimineren of tot een minimum reduceren. Sommige allergenen worden toch in kleinere hoeveelheden verdragen. Dat kan door een allergoloog en allergiediëtist worden uitgezocht via een persoonlijk voedingsadvies (1). **Uit recent onderzoek blijkt dat de allergeniciteit van een voedingsmiddel kan toenemen of verminderen onder invloed van verwerkingsprocessen** zoals verhitten, mengen en fermenteren.



BEKNOPT

- De bewerking van voedsel kan eiwitstructuren wijzigen. Hierdoor kan de allergeniciteit van een voedingsmiddel toenemen of verminderen. Actueel voedingsonderzoek tracht dit verder in kaart te brengen.
- Voor patiënten kunnen betere detectietechnieken en bijkomende inzichten in de allergeniciteit van diverse bewerkte varianten van voedingsmiddelen bijdragen tot een meer gevarieerde voeding.
- Grote uitdagingen in het allergenenvoedingsonderzoek zijn de moeilijke detectie van allergenen in de voeding, het in kaart brengen van het effect van bewerkingen op eiwitstructuurveranderingen en daaraan gekoppeld het effect op de allergeniciteit. Bijkomende moeilijkheid is dat patiënten vaak zelf niet weten voor welke eiwitten in een voedingsmiddel ze allergisch zijn.

Veel verschillende voedingsmiddelen kunnen een allergische reactie veroorzaken. Hiervan komen slechts een aantal zeer frequent voor, zoals eieren, koemelk, pinda's, schaaldieren, vis, noten, selder en soja. Enkele milligrammen of minder volstaan voor een allergische reactie (25).

REACTIE IMMUUNSTEEEM OP EEN EIWIT

Een voedselallergie is een reactie van het immuunsysteem op een specifiek eiwit in de voeding. Vrijwel alle voedingsmiddelen bevatten eiwitten. De meeste eiwitten zijn in principe ongevaarlijk. Zij worden normaliter door het lichaam gemetaboliseerd en lokken in de meeste gevallen geen immuunrespons uit. Bij allergische personen kan een bepaald eiwit het immuunsysteem toch triggeren zoals een allergeen en dus ten onrechte als een vijandige indringer worden beschouwd. Hierdoor zal het lichaam antilichamen aanmaken om het gesignaleerde

allergeen – in dit geval eiwit – zo snel en efficiënt mogelijk te neutraliseren. Deze reactie resulteert in allerlei lichamelijke klachten (bv. rhinitis, eczeem, astma, diarree), variërend van mild tot zeer ernstig. In sommige gevallen kan een anafylactische shock zelfs de dood tot gevolg hebben (2). Een allergie voor een bepaald voedingsmiddel kan worden veroorzaakt door verschillende eiwitten in het voedingsmiddel. In theorie zijn trouwens alle eiwitten in een voedingsmiddel potentiële allergenen. Voor pinda's bijvoorbeeld zijn er minstens 8 eiwitten gekend die frequent allergische reactie opwekken. Het is vaak niet bekend op welk eiwit men precies allergisch reageert. Dat verschilt bovendien van persoon tot persoon (3).

EIWITHERKENNING VIA HET EPITOOP

De zogenaamde uitschakeling van een eiwit door het immuunsysteem gebeurt door

WERELDWIJD MEER VOEDSEL-ALLERGIEËN

Het aantal voedselallergieën neemt wereldwijd toe, vooral ook in westerse landen. Twee tot 3 % van de wereldbevolking zou allergisch zijn aan een bepaald ingrediënt (5,6). In Europa gaat het om 17 miljoen mensen, een verdubbeling in vergelijking met 10 jaar geleden (7). Het aantal ziekenhuisopnamen ten gevolge van een anafylactische shock door een voedselallergie is de laatste 10 jaar met een factor 7 toegenomen (8).

Mogelijke verklaringen

- Een groter bewustzijn en meer sensibilisatie rond voedselallergieën bij professionals en het grote publiek. Mensen zijn meer alert en raadplegen sneller een arts bij verdachte klachten. In combinatie met betere onderzoekstechnieken, resulteert dit in meer positieve diagnoses.
- Onze eetgewoonten zijn de laatste 20 jaar sterk veranderd. Er zijn meer 'nieuwe' voedingsmiddelen in onze voeding gekomen, zoals noten en zaden (9,10). Een notenallergie is een van de meest voorkomende voedselallergieën.
- Door de verhoogde omgevingshygiëne wordt ons immuunsysteem minder geconfronteerd met allergene eiwitten. Er wordt onderzocht of dit kan leiden tot een verhoogde gevoeligheid voor allergische reacties.

een heel specifieke binding van een antilichaam op een welbepaald deel van het eiwit, namelijk het epitoom. Een eiwit kan meerdere epitopen bevatten. Dit procédé is het best te vergelijken met een sleutel-en-slotmechanisme. Er zal alleen maar een allergische reactie optreden als deze specifieke match plaatsvindt en als het epitoom beschikbaar is voor het antilichaam.

EEN VOEDSELINTOLERANTIE IS GEEN VOEDSELALLERGIE

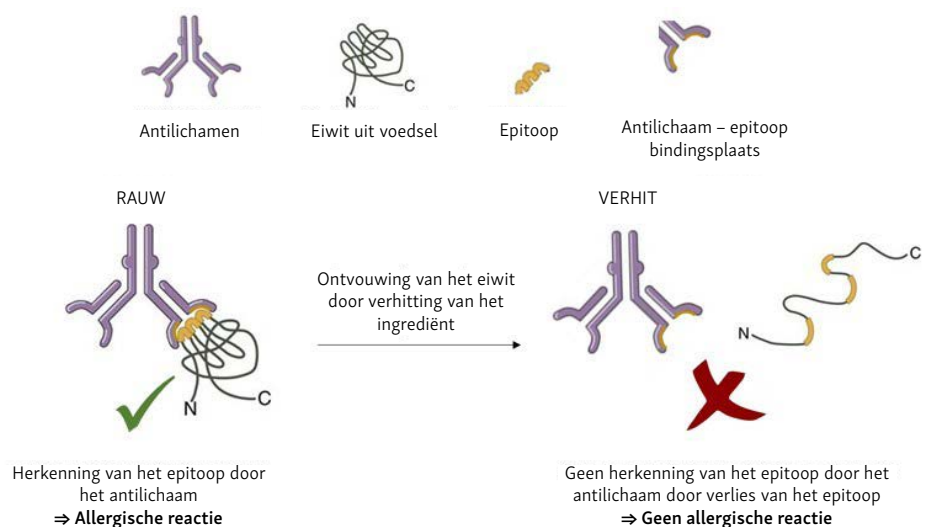
In tegenstelling tot een voedselallergie, verloopt een voedselintolerantie niet via herkenning van het immuunsysteem (4). Een voedselintolerantie is meestal te wijten aan een tekort aan bepaalde verteringsenzymen waardoor sommige voedingsbestanddelen niet of onvoldoende worden verteerd of gemetaboliseerd, bijvoorbeeld een lactose-intolerantie door een tekort aan het enzym lactase. Een overgevoeligheid aan stoffen zoals kleurstoffen, smaakversterkers en parabenen (ook pseudo-allergie genoemd) valt ook binnen de categorie van voedselintoleranties. Dit uit zich vooral in misselijkheid of huidirritatie. Hoewel er nog veel onduidelijkheid is over het precieze onderliggende mechanisme, is het zeker dat het immuunsysteem hierin evenmin een rol speelt. Bij een voedselallergie treedt veel sneller reactie op dan bij een voedselintolerantie. De symptomen komen vrijwel onmiddellijk voor. De ernst van een

voedselintolerantie is doorgaans ook milder van aard en nooit levensbedreigend wat bij een voedselallergie wel het geval kan zijn.

INVLOED VAN VOEDSEL-BEWERKING

Veel voedingsmiddelen die vandaag op de markt zijn, hebben één of meerdere bewerkingsprocessen ondergaan, zoals verhitting, vermenging met andere ingrediënten zoals vetten en fermentatie (11). Deze bewerkings technieken kunnen de eiwitten onder meer degraderen, modificeren en complexen doen vormen (11-13). Hierdoor verandert de structuur van een eiwit en worden sommige epitopen vernietigd, verborgen epitopen plots bereikbaar of ontstaan er nieuwe epitopen (figuur 1). Bijgevolg zal een potentieel allergen eiwit minder of juist beter worden herkend en zal de allergische reactie navenant minder sterk of juist sterker zijn. Bijvoorbeeld, door hazelnoten te verhitten kunnen er

FIGUUR 1 - Effect van verhitting van voedsleiwwitten op allergeniciteit.



Bron: aangepast van <https://clinicalgate.com/immunogenicity-and-antigenicity/>

FIGUUR 2 - 14 potentieel allergene stoffen die verplicht moeten worden vermeld wanneer ze als ingrediënt zijn gebruikt.



Bron: <http://www.flandersfood.com/artikel/2017/02/23/allergenen-voeding-detecteren>

bepaalde epitopen verloren gaan omdat het allergene eiwit zich bij hoge temperatuur ontvouwt en zijn driedimensionale structuur verliest. Op die manier verlaagt de allergeniciteit van hazelnotenpasta voor sommige personen. Dat geldt ook voor gekookte pindanoten. Pindanoten roosteren verhoogt daarentegen hun allergeniciteit omdat er hierdoor verborgen epitopen komen bloot te liggen. Sommige patiënten reageren allergisch op rauwe appels maar niet op appelmoes. Door het verwarmingsproces is het hittegevoelige eiwit, dat de allergische respons uitlokt, gedatureerd. Ook voor eieren ziet men een verminderde allergeniciteit voor extensief verwarmde eieren bij 50 tot 85 % van de allergene patiënten.

VEEL ONDERZOEK IS LOPENDE

De gewijzigde structuren en allergeniciteit van afzonderlijke eiwitten in voedingsmiddelen na verschillende bewerkingsstappen of combinaties hiervan is nog niet volledig in kaart gebracht. Het onderzoek hiernaar en naar de exacte achterliggende mechanismen is een grote uitdaging. Bijkomend obstakel is dat patiënten zelf vaak niet weten aan welk eiwit in een voedingsmiddel ze precies allergisch zijn. Dit onderzoek is echter belangrijk omdat het bijkomende ondersteuning kan bieden in de zoektocht naar meer variatiemogelijkheden voor

mensen met een voedselallergie. Naast de nu al wettelijk verplichte vermelding op het etiket van 14 allergene stoffen (richtlijn 2007/68/EC) (figuur 2) zou de vermelding van het bewerkingsproces bijkomende info kunnen geven over een toegenomen of verminderde allergeniciteit van een voedingsmiddel (14,15). Daarnaast wordt ook meer onderzoek verricht naar meer accurate en sensitieve detectietechnieken voor allergenen in de voeding met het oog op een meer nauwkeurige declaratie van allergenen op het etiket (16,17). Detectiemethoden die gebaseerd zijn op eiwit-antilichaambindingen (zie verder) kunnen bij bewerkte voedingsmiddelen vals negatieve resultaten geven. Door een gewijzigde eiwitstructuur kunnen bindingsplaatsen verloren gaan. De specifiek gekozen antilichamen in de detectiekit kunnen bijgevolg niet meer binden aan hun gematchte epitop, wat de detectie van allergenen bemoeilijkt.

DETECTIE VAN ALLERGENEN IN DE VOEDING

Technieken om allergenen te detecteren, moeten aan verschillende eisen voldoen. De techniek moet zeer specifiek zijn: ze mag enkel het ingrediënt detecteren die de allergene stof bevat en geen andere. Ze moet minieme hoeveelheden kunnen detecteren en dus heel sensitief zijn. Ze moet ook globaal toepasbaar zijn. Dat

DETECTIETECHNIEKEN VOOR ALLERGENEN

(Sporen van) allergenen in voedingsmiddelen kunnen op twee manieren worden gedetecteerd (18,19).

Via het unieke DNA van de allergene stof

- Dit gebeurt door middel van de **'Polymerase Chain Reaction' (PCR)**, een zeer robuuste, gevoelige, semi-kwantitatieve en specifieke techniek die tevens multiplexing toelaat. Deze techniek vereist geavanceerde laboapparatuur en de nodige expertise. Een veelbelovende verbetering van de PCR-methodiek is **'droplet digital'-PCR (ddPCR)**, die kwantitatief is.

Voor de controle op de allergenenwetgeving is PCR een geschikte techniek. Het toont aan of er al dan niet DNA van een allergene stof aanwezig is. Een positief resultaat betekent per definitie echter niet dat het ook een allergische reactie zal veroorzaken, omdat de aanwezigheid van genetisch materiaal niet noodzakelijk de aanwezigheid van een allergeen eiwit impliceert (20-22).

Via de eiwitten in de allergene stof

- Dit kan op een zeer eenvoudige manier gebeuren aan de hand van een kant-en-klare **'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay' (ELISA)-kit**. Deze techniek is gebaseerd op de eiwit-antilichaambinding. De uitvoering van deze analyse vereist slechts een beperkte labo-uitrusting en weinig expertise.

Ook deze methode wordt momenteel gehanteerd voor controle op de allergenenwetgeving. ELISA-testen missen echter soms voldoende specificiteit omdat kruisreacties met andere, nauwverwante stoffen kunnen optreden. Ze hebben een zeer hoge gevoeligheid, maar houden geen rekening met de effecten van verschillende voedselmatrices en voedselbewerkingstechnieken, die van invloed kunnen zijn op de eiwitten en waardoor ze niet langer detecteerbaar zijn door de ELISA-test. Deze techniek laat ten slotte geen multiplexing toe (20,22,23).

- Een andere techniek die de laatste jaren in opmars is, is de '**Vloeistof Chromatografie Tandem Massaspectrometrie**' (LC-MS/MS) (24). Bij deze techniek worden de eiwitten uit het voedsel geëxtraheerd en gedenatureerd. Vervolgens wordt het eiwit door middel van het enzym trypsine verknipt in peptiden met een lengte van ongeveer 10 tot 20 aminozuren. Na opzuivering van deze peptiden worden ze aan de hand van vloeistofchromatografie gescheiden op basis van hun waterafstotende eigenschappen. De uiteindelijke detectie en identificatie gebeuren via een massaspectrometer.

Deze techniek is zeer specifiek, zowel kwalitatief als kwantitatief en mits verificatie robuust tegen voedselbewerkingstechnieken. Tijdens de analyse worden chromatogrammen gegenereerd die nadien kunnen worden geraadpleegd. Deze techniek is hierdoor zeer transparant en geeft weer wat er precies wordt gemeten. Ze vereist echter geavanceerde laboapparatuur, een relatief lange analysetijd en de nodige expertise om de resultaten te analyseren. Ze laat ook multiplexing toe.

Kandidaat peptiden die gebruikt worden voor detectie moeten specifiek zijn voor de op te sporen allergene stof. Ze worden ook gekozen op basis van hun intensiteit en robuustheid tegen voedselverwerking. Aminozuren kunnen tijdens bewerkingen immers post-translationele modificaties ondergaan die

de massa van het peptide beïnvloeden waardoor het mogelijk niet meer wordt gedetecteerd in de massaspectrometer. Bijvoorbeeld, door een Maillard-reactie kunnen op bepaalde aminozuren suikerafbraakproducten worden geplaatst. Voor de LC-MS/MS-methodiek moeten dus peptiden worden geselecteerd die niet onderhevig zijn aan dergelijke modificaties of wijzigingen in massa. Dat kan door een scan te doen van extracten uit verschillende voedselmatrices die verschillende bewerkingen hebben ondergaan.

Door het ILVO zijn hiervoor verschillende matrices geproduceerd (bv. een UHT-behandelde notendrink) op semi-industriële productielijnen van de Food Pilot (een applicatie- en analysecentrum opgericht door Flanders' FOOD en ILVO). Deze matrices worden gebruikt voor eiwitextractie en eiwitverknipping tot peptiden. Door de verschillende peptideprofielen uit de verschillende matrices via massaspectrometrie te analyseren en te vergelijken, kunnen peptiden worden geselecteerd die in alle matrices worden gedetecteerd en dus robuust zijn tegen voedselbewerkingstechnieken. Aan de hand van deze peptiden wordt vervolgens een methode ontwikkeld om verschillende voedselallergenen in voeding te detecteren.

betekent dat ze allergenen moet kunnen detecteren in verschillende voedingsproducten die verschillende bewerkingen hebben ondergaan. De eiwitstructuur kan immers veranderen door voedselbewerkingen, wat de detectie van eiwitten kan hinderen. Ten slotte moet de detectietechniek bij voorkeur in één analyse meerdere allergenen tegelijk kunnen detecteren (multiplexing). Hoewel er reeds zeer specifieke en sensitieve detectietechnieken bestaan, vormt de globale toepasbaarheid ervan op meerdere voedingsproducten nog vaak een probleem. Bovendien zijn nog niet alle technieken gestandaardiseerd. Het is nochtans belangrijk dat de resultaten van verschillende testen, die op hetzelfde materiaal worden toegepast, kunnen worden vergeleken. Ook dat is nog een belangrijk werkpunt.

 **MEER INFO**
WWW.NICE-INFO.BE

- **Zoekterm**
Consument wordt beter geïnformeerd over allergenen

Referenties

1. H. Winters. Sluit niet zomaar voedsel uit. *Nutrinews* maart 2016 – ook te raadplegen via www.nice-info.be > *Nutrinews*
2. The immune system: Cells, tissues, function, and disease. Available at: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/320101.php>. (Accessed: 18th May 2018)
3. Masilamani M., Commins S. & Shreffler W. Determinants of Food Allergy. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2012; 32:11–33
4. Food Intolerance Versus Food Allergy | AAAAI. The American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Available at: <https://www.aaaai.org/conditions-and-treatments/library/allergy-library/food-intolerance>. (Accessed: 18th May 2018)
5. Costa J., Mafra I., Carrapatoso I. & Oliveira M. B. P. P. Hazelnut Allergens: Molecular Characterization, Detection, and Clinical Relevance. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2016; 56:2579–2605
6. Kirsch S. et al. Quantitative methods for food allergens: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009; 395: 57–67
7. FAOSTAT. Available at: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. (Accessed: 12th January 2018)
8. Food Allergy & Anaphylaxis, 2012 | EAACI.org. Available at: <http://www.eaaci.org/outreach/public-declarations/2648-food-allergy-anaphylaxis-2012.html>. (Accessed: 18th May 2018)
9. Oliveira I. et al. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 2008; 46:1801–1807
10. Özenç N. & Özenç D. B. Nut traits and nutritional composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) as influenced by zinc fertilization. *J. Sci. Food Agric.* 2018; 95:1956–1962
11. Teodorowicz M., van Neerven J. & Savelkoul H. Food Processing: The Influence of the Maillard Reaction on Immunogenicity and Allergenicity of Food Proteins. *Nutrients* 2017; 9
12. Gerrard J. A. et al. Aspects of physical and chemical alterations to proteins during food processing - some implications for nutrition. *Br. J. Nutr.* 2012; 108 (Suppl 2):S288-297
13. Mills E. N. C., Sancho A. I., Rigby N. M., Jenkins J. A. & Mackie A. R. Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009; 53: 963–969
14. Popping B. & Diaz-Amigo C. European Regulations for Labeling Requirements for Food Allergens and Substances Causing Intolerances: History and Future. *J. AOAC Int.* 2017 - doi:10.5740/jaoacint.17-0381
15. Kim J. S. & Sicherer S. H. Living with Food Allergy: Allergen Avoidance. *Pediatr. Clin. North Am.* 2011; 58: 459–470
16. Allen K. J. et al. Precautionary labelling of foods for allergen content: are we ready for a global framework? *World Allergy Organ. J.* 2014; 7:10
17. DunnGalvin A. et al. Precautionary allergen labelling: perspectives from key stakeholder groups. *Allergy* 2015; 70:1039–1051
18. van Hengel A. J. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 389: 111–118
19. Prado M. et al. Advanced DNA- and Protein-based Methods for the Detection and Investigation of Food Allergens. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2016; 56:2511–2542
20. Costa J., Ansari P., Mafra I., Oliveira M. B. P. P. & Baumgartner, S. Assessing hazelnut allergens by protein- and DNA-based approaches: LC-MS/MS, ELISA and real-time PCR. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014; 406: 2581–2590
21. Herman L., Block J. D. & Viane R. Detection of hazelnut DNA traces in chocolate by PCR. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2003; 38: 633–640
22. Stephan O. et al. Protein quantification, sandwich ELISA, and real-time PCR used to monitor industrial cleaning procedures for contamination with peanut and celery allergens. *J. AOAC Int.* 2004; 87: 1448–1457
23. Poms R. E., Klein C. L. & Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.* 2004; 21: 1–31
24. New L. S., Schreiber A., Stahl-Zeng J. & Liu H.-F. Simultaneous Analysis of Multiple Allergens in Food Products by LC-MS/MS. *J. AOAC Int.* 2018; 101: 132–145
25. Advies 24/2017. Referentiedossissen voor de allergenen die zijn opgenomen in bijlage II van de Verordening (EU) nr. 1169/2011 van 25 oktober 2011. Wetenschappelijk comité van het FAVV - http://www.favv-afsca.fgov.be/wetenschappelijkcomite/adviezen/2017/_documents/Advies24-2017_SciCom2017-01_referentiedossissenallergenen.pdf