

Nachweis von Parvalbuminen in Störgeweben

Evidence of Parvalbumin in Sturgeon Tissues

Hartmut Rehbein

Max Rubner-Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch, Palmaille 9, 22767 Hamburg
hartmut.rehbein@mri.bund.de

Abstract

Parvalbumins, calcium-binding, heat-stable proteins of considerable allergenic potential, are occurring in high concentration in light muscle of many fish species. Lack of knowledge about parvalbumins in sturgeon tissues prompted us to study the distribution of this type of proteins in light and dark muscle, as well as in swim bladder and skin of Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*, and three other sturgeon species. Results: Light and dark muscle of sturgeons contained water soluble proteins with following properties: (1) Great stability against heating at 70 or 80 °C. (2) Isoelectric points between 3.85 and 5.66. (3) Treatment of proteins separated by isoelectric focusing with the dye "stains all" gave blue protein bands. (4) The molecular mass was about 10 to 14 kDalton. (5) Concentration of acidic, heat-stable proteins was higher in light than in dark muscle. Taken together, these findings gave strong indication for the presence of parvalbumins in muscle tissue of sturgeons. This conclusion was corroborated by immunological tests. However, parvalbumin could not be detected in swim bladder tissue. Skin preparations showed only traces of parvalbumins, possibly resulting from residual muscle tissue.

Kurzfassung

Parvalbumine sind calciumbindende, hitzestabile Proteine mit großem allergenem Potential, die in der hellen Fischmuskulatur in hoher Konzentration auftreten können. Da über das Vorkommen von Parvalbuminen in Störgeweben kaum Daten vorliegen, wurden helle und dunkle Rumpfmuskulatur, Haut und Schwimmblase des Atlantischen Störs, *Acipenser oxyrinchus*, sowie von drei weiteren Störarten auf ihren Gehalt an Parvalbuminen untersucht. In der hellen und dunklen Muskulatur der Störe wurden wasserlösliche Proteine mit folgenden Eigenschaften nachgewiesen: (1) Erhitzen von Extrakten wasserlöslicher Proteine auf 70 oder 80 °C führte nicht zur Denaturierung aller Proteine. (2) Die hitzestabilen Proteine besaßen isoelektrische Punkte im pH-Bereich von 3,85 bis 5,66. (3) Sie ließen sich mit „stains-all“, einem Farbstoff, der mit calciumbindenden, sauren Proteinen reagiert, blau anfärben. (4) Die Molmasse dieser Proteine lag im Bereich von 10 bis 14 kDalton. (5) Die helle Muskulatur enthielt höhere Konzentrationen an hitzestabilen Proteinen als die dunkle Muskulatur. Diese Eigenschaften deuten sehr stark darauf hin, dass es sich um Parvalbumine handelt. Immunologische Untersuchungen haben diesen Befund bestätigt. In der Schwimmblase konnten keine Parvalbumine nachgewiesen werden, während die Hautpräparate Spuren von Parvalbuminen aufwiesen, die wahrscheinlich aus nicht restlos entferntem Muskelgewebe stammten.

Einleitung

Parvalbumine sind relativ kleine, wasserlösliche Proteine, die in hoher Konzentration in der hellen Rumpfmuskulatur zahlreicher Fischarten auftreten, oftmals in mehreren Isoformen mit unterschiedlicher elektrischer Ladung (Arif et al. 2007). Sie binden Calciumionen mit hoher Affinität und sind an der Regulation der Muskelkontraktion beteiligt. Parvalbumine sind sehr hitzestabil und lassen sich auch in gegarten, geräucherten und sterilisierten Fischereierzeugnissen noch nachweisen (Rehbein 2009).

Fischallergien werden überwiegend durch Parvalbumine verursacht (Fæste 2010). Dabei reichen schon sehr kleine Mengen aus, um heftige allergische Reaktion bis

hin zum anaphylaktischen Schock hervorzurufen. Da Parvalbumine verschiedener Fischarten eine teilweise sehr ähnliche Aminosäurezusammensetzung und räumliche Struktur besitzen, treten häufig Kreuzreaktion auf (Lopata und Lehrer 2009). Fischallergikern ist anzuraten, vorsichtshalber zunächst alle Fischarten zu meiden und erst nach entsprechenden Testverfahren bei einem Allergologen eventuell unbedenkliche Erzeugnisse zu verzehren (Weber und Paschke 2010).

Aufgrund des großen allergenen Potentials der Parvalbumine zählt Fisch zu den Lebensmitteln, die nach der EU-Richtlinie 2003/89/EG unabhängig von ihrer Konzentration stets im Zutatenverzeichnis aufgeführt sein müssen (EU 2003).

Für die Lebensmittelüberwachung sind Parvalbumine noch aus einem anderen Grunde interessant. Sie bilden bei zahlreichen hellfleischigen Fischen einen wesentlichen Bestandteil des Eiweißmusters, das man mit der zur Speziesidentifizierung eingesetzten Protein-Elektrophorese erhält (Rehbein 2009). Die Abbildung 1 zeigt die Muster der wasserlöslichen Proteine aus der hellen Muskulatur einiger Fischarten mit unterschiedlich stark ausgeprägten Parvalbuminen. Die dazu eingesetzte isoelektrische Fokussierung (IEF) ist eine Variante der Protein-Elektrophorese, bei der in einem Gel zunächst ein pH-Gradient erzeugt wird. Proteine wandern in diesem Gel unter Einwirkung eines elektrischen Feldes in Positionen, die ihrem isoelektrischen Punkt (pI) entsprechen; am pI beträgt die Nettoladung der Proteine „Null“, die Wanderung kommt zum Stillstand und es entsteht ein stabiles, artspezifisches Proteinstmuster.

Störe der Gattungen *Acipenser* und *Huso* umfassen 20 Arten (Tabelle 1), die als Lieferanten des echten Kaviars dienen (De Meulenaer et al. 1996). Die meisten Störbestände sind allerdings so stark von

Überfischung, Umweltverschmutzung und wasserbaulichen Maßnahmen bedroht, dass ihr Handel deutlich eingeschränkt worden ist (BfN 2009). Zwei Störarten, *A. sturio* und *A. brevirostrum*, dürfen aufgrund der Listung in Annex 1 des Washingtoner Artenschutzabkommens kommerziell überhaupt nicht mehr gehandelt werden.

Um den Verlust an Wildbeständen auszugleichen, werden als Kaviarlieferanten geschätzte Störarten wie beispielsweise *Huso huso* (Beluga), *Acipenser gueldenstaedtii* (Osietra) und *A. baeri* zunehmend in Aquakultur produziert. Dabei fallen außer Rogen weitere Störgewebe an, die für die menschliche Ernährung (Filet aus der Rumpfmuskulatur) (Kenari et al. 2009), in der Lebensmittelverarbeitung (Gelatine, Isinglass) (Hao et al. 2009) oder auch bei der Restaurierung von Gemälden (Leim aus der Hausenblase) (Koochekian et al. 2006) genutzt werden. Isinglass ist ein Gelatinepräparat aus der Schwimmblase oder der Haut von Fischen, das zur Klärung von Bier und Wein Verwendung findet (Hickman et al. 2000).

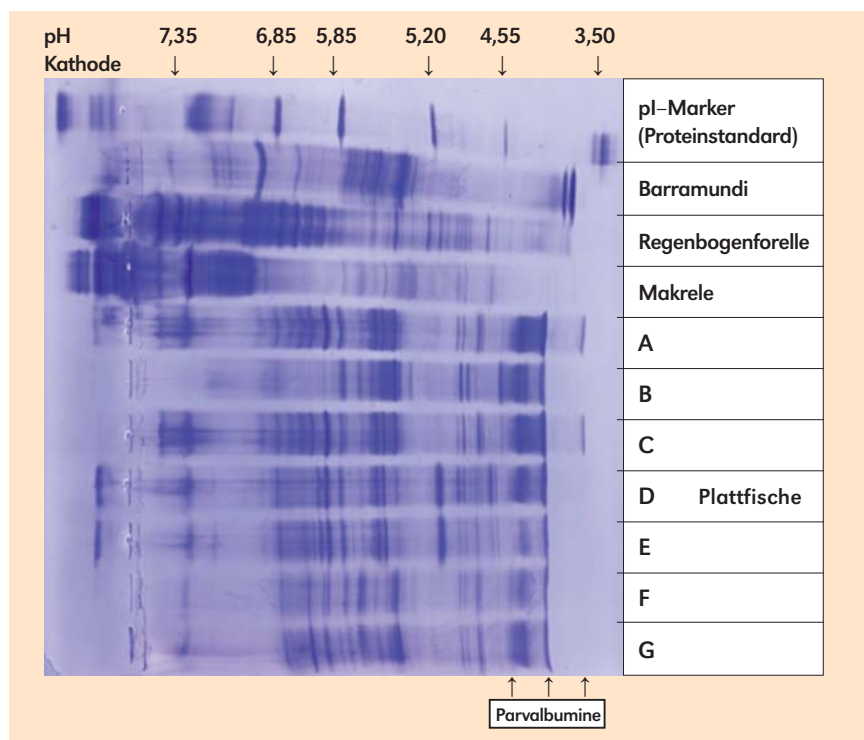


Abbildung 1: Wasserlösliche Proteine aus der hellen Muskulatur von Fischen nach Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung (IEF; Servalyt-Precote® 3-10) und Anfärbung mit Coomassie-Farbstoff. Barramundi (*Lates calcarifer*), Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Makrele (*Scomber scombrus*), A-C: Plattfische aus dem Nordpazifik. Die Parvalbuminbanden liegen im pH-Bereich von 3,50 bis 5,20; sie sind gut ausgeprägt bei Barramundi und Plattfischen, aber nur schwach bei Regenbogenforelle und Makrele.

Figure 1: Pattern of water soluble proteins of light muscle of different fish species obtained by IEF with Servalyt-Precote® 3-10 and Coomassie staining. Barramundi (*Lates calcarifer*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and mackerel (*Scomber scombrus*), A-C: flatfishes from the North Pacific. Parvalbumin bands are located in the pH range from 3.50 to 5.20. Barramundi and flatfishes expressed strong parvalbumin bands, whereas rainbow trout and mackerel showed only faint bands in the anodic part of the gel.

Tabelle 1: Störarten der Gattungen *Acipenser* und *Huso*. Die in dieser Arbeit untersuchten Arten sind durch Fettschrift hervorgehoben.

Table 1: Sturgeons of the genera *Acipenser* and *Huso*. Species analysed in this study are indicated by bold type.

Lateinischer Name	Deutscher Name*	Englischer Name	Bemerkung
<i>A. gueldenstaedtii</i>	Osietra	Russian sturgeon	Osietra-Kaviar
<i>A. persicus</i>		Persian sturgeon	Osietra-Kaviar
<i>A. sturio</i>	Ostsee-Stör	Baltic sturgeon	Handelsverbot
<i>A. stellatus</i>	Sevruga	Stellate sturgeon	Sevruga-Kaviar
<i>A. nudiventris</i>	Ship-Stör	Ship sturgeon	
<i>A. naccarii</i>	Mittelmeer-Stör	Adriatic sturgeon	
<i>A. ruthenus</i>	Sterlet	Sterlet	
<i>A. baeri</i>	Sibirischer Stör	Siberian sturgeon	Osietra-Kaviar
<i>A. schrencki</i>		Amur sturgeon	
<i>A. mikadoi</i>		Sakhalin sturgeon	
<i>A. dabryanus</i>		Yangtze sturgeon	
<i>A. sinensis</i>		Chinese sturgeon	
<i>A. o. oxyrinchus</i>		Atlantic sturgeon	
<i>A. o. desotoi</i>		Gulf sturgeon	
<i>A. brevirostrum</i>		Shortnose sturgeon	Handelsverbot
<i>A. fulvescens</i>		Lake sturgeon	
<i>A. transmontanus</i>	Amerikanischer Stör	White sturgeon	
<i>A. medirostris</i>		Green sturgeon	
<i>H. huso</i>	Beluga-Stör	Beluga	Beluga-Kaviar
<i>H. dauricus</i>		Kaluga sturgeon	

* aus der Liste der zulässigen Handelsnamen (Fischetikettierungsgesetz; www.ble.de)

Über das Vorkommen von Parvalbuminen in Störgeweben und daraus hergestellten Erzeugnissen ist bisher wenig bekannt. Kürzlich wurde Parvalbumin erstmalig aus Störmuskel (*Acipenser*, Spezies unbekannt) isoliert (Weber et al. 2009). Mit einem immunologischen Testverfahren wurde Parvalbumin außerdem in Isinglass nachgewiesen (Weber et al. 2009).

Wir haben daher in Zusammenarbeit mit zwei immunologischen Arbeitsgruppen (A.L. Lopata, Melbourne, Australien; C. Fæste, Oslo, Norwegen) Untersuchungen zum Nachweis und zur Charakterisierung von Parvalbuminen in Stören bekannter Herkunft durchgeführt.

Tabelle 2: Proteingehalt der wässrigen Extrakte aus Geweben von *A. oxyrinchus*. (Mittelwerte von zwei Fischen); erhitzter Extrakt: 10 min bei 80 °C.

Table 2: Content of water soluble proteins of tissues of *A. oxyrinchus* (mean value of two fish); heating of extract: 10 min at 80 °C.

Gewebe	Proteingehalt (mg/ml)
Helle Muskulatur, Rohextrakt	9,0
Helle Muskulatur, erhitzter Extrakt	3,9
Haut, Rohextrakt	2,0
Haut, erhitzter Extrakt	1,8
Schwimmblase, Rohextrakt	0,9

Material und Methoden

Fischproben

Die Firma Desietra in Fulda stellte helle und dunkle Muskulatur, Schwimmblasen und Haut der Störarten *A. gueldenstaedtii* (Russischer Stör), *A. baeri* (Sibirischer Stör) und *A. ruthenus* (Sterlet) zur Verfügung. Zu Beginn der Untersuchungen wurden bei Häuten und Schwimmblasen die anhaftenden Gewebereste entfernt. Von der Firma Holstenstör (Kiel) wurden uns zwei Sibirische Störe überlassen. Zwei Exemplare des Atlantischen Störs, *A. oxyrinchus*, stammen aus dem Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei (Berlin). Filets von Barramundi (*Lates calcarifer*) und pazifischen Plattfischen (u.a. *Limanda aspera*) wurden aus dem Handel bezogen, eine Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) und Makrele (*Scomber scombrus*) wurden als Ganzfisch beschafft.

Analysemethoden

Die wasserlöslichen Proteine aus der hellen und dunklen Muskulatur, sowie aus Haut und Schwimmblase wurden unter Anwendung der isoelektrischen Fokussierung (IEF) in Servalyt-Precote® 3-10 - Gelen, der Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und immunologischer Nachweisverfahren (ELISA; Immunoblotting) untersucht (Rehbein und Kündiger 1984; Fæste und Plassen 2008; Beale et al. 2009).

Die Anfärbung von Proteinen in IEF-Gelen mit „stains-all“ und die Aufnahme von „stains-all“-Spektren erfolgte nach Girija und Rehbein (1988).

Ergebnisse und Diskussion

Muskulatur und Haut

Aus der hellen Muskulatur, der Haut und der Schwimmblase von Stören ließen sich mit Wasser unterschiedlich große Proteinmengen extrahieren. Die Gehalte der löslichen Proteine sind beispielhaft für die Gewebe des Atlantischen Störs, *A. oxyrinchus*, in Tabelle 2 angegeben; für die anderen Störarten wurden ähnliche Werte gemessen (Rehbein und Lopata 2010). Am meisten Protein (9 mg/ml) war aus der hellen Muskulatur des Störs extrahierbar, während die Werte für Haut und Schwimmblase nur 1 bis 2 mg Protein/ml Extrakt betragen.

Ein Teil der wasserlöslichen Proteine erwies sich als thermostabil; dazu gehörte auch eine Proteinbande mit dem pI-Wert 4,92, wie die Abbildung 2 verdeutlicht. Dieses Protein war auch im Hautextrakt nachweisbar, stammt dort jedoch sehr wahrscheinlich aus Muskelgewebe, das bei der Präparation der Haut nicht restlos entfernt worden war. Der niedrige pI-Wert und die Thermostabilität dieses Proteins sind Hinweise

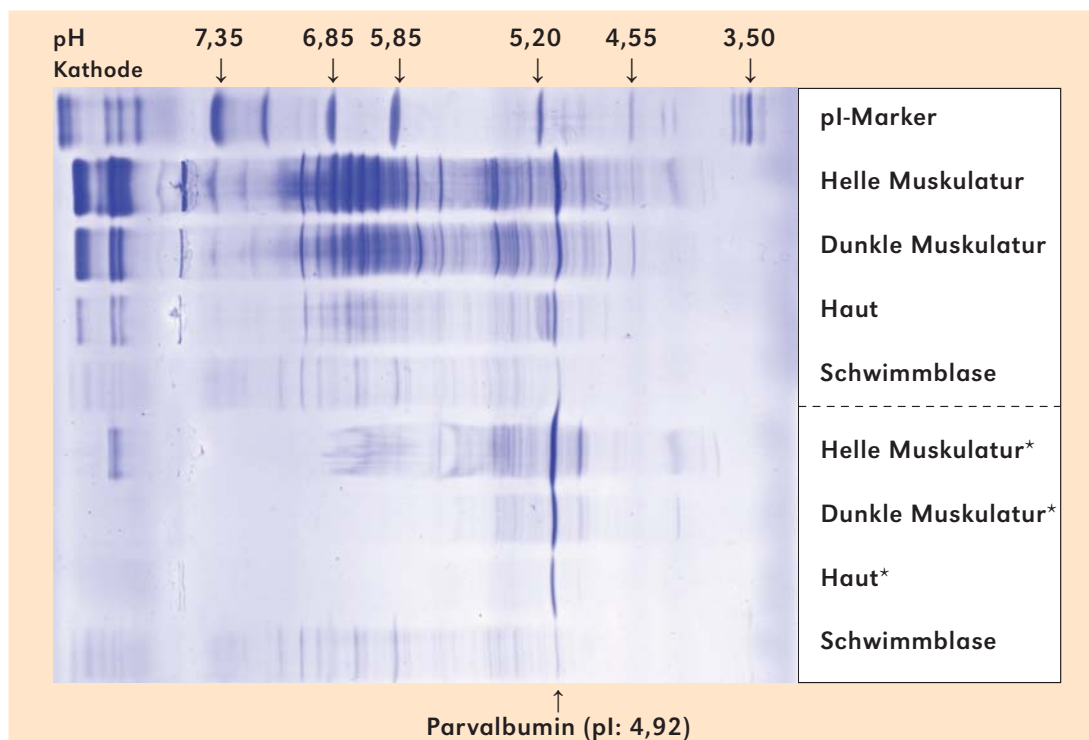


Abbildung 2: IEF wasserlöslicher Proteine in Gewebe-Extrakten des Atlantischen Störs. Rohe und erhitzte (10 Min. bei 80 °C) Extrakte wurden auf ein Servalyt-Precote® 3-10 aufgetragen. Erhitzte Extrakte sind mit einem (*) gekennzeichnet.

Figure 2: IEF of water soluble proteins extracted from different tissues of Atlantic sturgeon. Raw or heated (10 min. at 80 °C; indicated by a “*”) extracts were run on Servalyt-Precote® 3-10.

dafür, dass das Protein zur Klasse der Parvalbumine gehört. Ein weiteres Indiz dafür lieferte die blaue Anfärbung dieses Proteins mit „stains-all“ (Abbildung 3), einem Farbstoff, der in spezifischer Weise mit calciumbindenden Proteinen reagiert (Campbell et al. 1983; Caday et al. 1986).

Ähnlich wie hier für den Atlantischen Stör beschrieben, konnten wir hitzestabile Proteine mit pI-Werten von 3,85 bis 5,66 in der Muskulatur des Russischen Störs, Sibirischen Störs und des Sterlet nachweisen; die Molmassen dieser Proteine lagen im Bereich von 10 bis 14 kD. Die Proteine reagierten zudem mit parvalbumin-spezifischen Antikörpern bei der Untersuchung mit Immunoblotting (Rehbein und Lopata 2010); allerdings wurden sie nicht von einem ELISA detektiert, der auf einem Antikörper gegen Kabeljau-Parvalbumin basierte (Fæste 2008).

Schwimmbläse

Störe können durch Erzeugung verschiedener Laute miteinander kommunizieren (Johnston und Phillips 2003). Die Art dieser Laute lässt darauf schließen, dass sie auch bei Stören mit Hilfe einer speziellen Muskulatur durch Schwingungen der Schwimmbläse erzeugt werden.

Wir fanden allerdings bei der Präparation der Schwimmbläsen der vier Störarten weder auf der Außenseite noch im Innenraum der Schwimmbläsen Hinweise auf das Vorkommen lauterzeugender Muskulatur. Diese Art der Muskulatur wird auch als Trommelmuskel bezeichnet; in einigen Fischarten enthält der Trommelmuskel sehr große Mengen an Parvalbumin, während die Konzentration in anderen Fischen deutlich geringer ist (Schoenman et al. 2010). Man hat daher geprüft, ob Isinglass, das aus der

Schwimmbläse von Stören und anderen Fischarten hergestellt wird, Reste an Parvalbumin enthält, die Fischallergikern beim Konsum von Wein oder Bier gefährlich werden könnten. Während die EFSA zu dem Schluss kam, dass das nicht der Fall ist (EFSA 2007a, b), haben Weber et al. (2009) Parvalbumin in Isinglass von verschiedenen Fischarten durch ein sensitives immunologisches Nachweisverfahren (ELISA) gefunden.

Bei unseren Untersuchungen fanden wir in Extrakten aus der Schwimmbläse von Stören zwar geringe Mengen an wasserlöslichen Proteinen (Rehbein und Lopata 2010; siehe auch Tabelle 2 und Abbildung 2), die jedoch weder auf dem Immunoblot noch beim ELISA eine Reaktion mit parvalbumin-spezifischen Antikörpern zeigten (Fæste 2008).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Störe der Gattung Acipenser Parvalbumine enthalten, die in der hellen Muskulatur in hoher Konzentration vorkommen. Wir fanden bisher aber keine eindeutigen Hinweise für die Existenz von Parvalbuminen in der Schwimmbläse dieser Fische. Bei der Herstellung von Gelatine aus Haut ist aber zu beachten, dass diese Präparate unter Umständen mit Parvalbuminen verunreinigt sein können.

Danksagung

Für die Bereitstellung von Stören danke ich Herrn Dr. U. Ballies und Herrn Dr. J. Gessner sowie der Firma Desietra. Für die sorgfältige Durchführung der Analysen danke ich Frau R. Koch und Herrn R. Kündiger. Frau Dr. C. K. Fæste führte dankenswerterweise immunologische Untersuchungen an einigen Störproben durch.

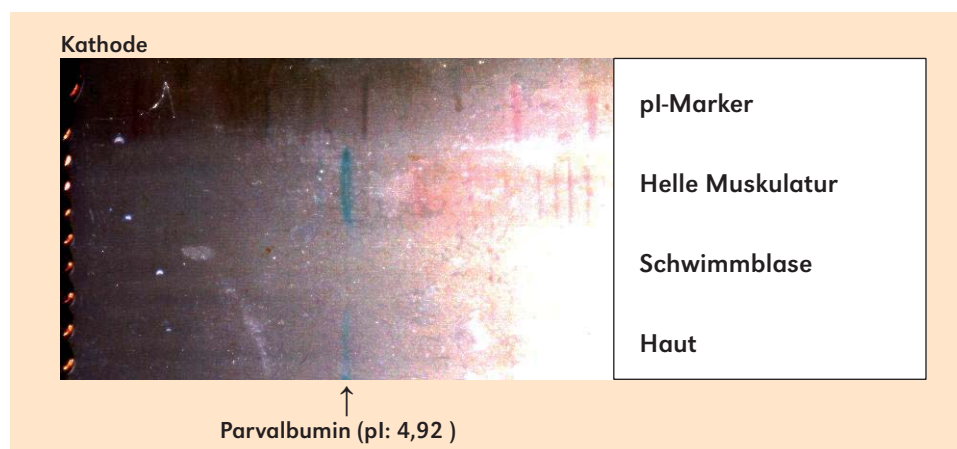


Abbildung 3: Detektion von Parvalbumin in Gewebe-Extrakten des Atlantischen Störs mit „stains-all“ – Färbung. IEF mit Servalyt-Precote® 3-10.

Figure 3: Detection of parvalbumin by „stains-all“ treatment of IEF gels. Extracts of tissues of Atlantic sturgeon were run on Servalyt-Precote® 3-10.

Literatur

- Arif, S.-H.; Jabeen, M.; Hasnain, A.-U., 2007: Biochemical characterization and thermostable capacity of parvalbumins: the major fish-food allergens. *Journal of Food Biochemistry* 31(1): 121-137.
- Beale, J.E.; Jeebhay, M.F.; Lopata, A.L., 2009: Characterisation of purified parvalbumin from five fish species and nucleotide sequencing of this major allergen from Pacific pilchard, *Sardinops sagax*. *Molecular Immunology* 46(15): 2985-2993.
- BfN, Bundesamt für Naturschutz, 2009: Informationen zum Handel mit Kaviar. <http://www.bfn.de/5904.html>.
- Caday, C.G.; Lambooy, P.K.; Steiner, R.F., 1986: The interaction of Ca²⁺-binding proteins with the carbocyanine dye stains-all. *Biopolymers* 25(8): 1579-1595.
- Campbell, K.P.; MacLennan, D.H.; Jorgensen, A.O., 1983: Staining of the Ca²⁺-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100 with the carbocyanine dye stains-all. *Journal of Biological Chemistry* 258(18): 11267-11273.
- De Meulenaer, T.; Raymakers, C., 1996: Sturgeons of the Caspian Sea and the international trade in caviar. Cambridge, UK: TRAFFIC International, 71 pp.
- EFSA, 2007a: Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to a notification from Brewers of Europe and BFBi on isinglass used as a clarifying agent in brewing pursuant to Article 6 paragraph 11 of Directive 2000/13/EC – for permanent exemption from labelling. *The EFSA Journal* 536(1), 1-10.
- EFSA, 2007b: Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to a notification from WFA and AWRI on fish products (isinglass) used in the manufacture of wine pursuant to Article 6 paragraph 11 of Directive 2000/13/EC – for permanent exemption from labelling. *The EFSA Journal* 533(1), 1-8.
- EU, 2003: EU Directive 2003/89/EC. *Official Journal of the European Union* L 308, 15-18.
- Fæste, C.K., 2008: persönliche Mitteilung.
- Fæste, C.K., 2010: Fish allergen detection. In: Popping, B.; Diaz-Amigo, C.; Hoenicke, K. (Hrsg.): *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 492 pp.
- Fæste, C.K.; Plassen, C., 2008: Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods. *Journal of Immunological Methods* 329(1-2): 45-55.
- Girija, N.; Rehbein, H., 1988: Comparison of parvalbumin patterns from different fish species by isoelectric focusing of muscle extracts. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 91(4): 723-728.
- Hao, S.; Li, L.; Yang, X.; Cen, J.; Shi, H.; Bo, Q.; He, J., 2009: The characteristics of gelatin extracted from sturgeon (*Acipenser baeri*) skin using various pretreatments. *Food Chemistry* 115(1): 124-128.
- Hickman, D.; Sims, T.J.; Miles, C.A.; Bailey, A.J.; de Mari, M.; Koopmans, M., 2000: Isinglass/collagen: denaturation and functionality. *Journal of Biotechnology* 79(3): 245-257.
- Johnston, C.E.; Phillips, C.T., 2003: Sound production in sturgeon *Scaphirhynchus albus* and *S. platyrhynchus* (Acipenseridae). *Environmental Biology of Fishes* 68(1): 59-64.
- Kenari, A.A.; Regenstein, J.M.; Hosseini, S.V.; Rezaei, M.; Tahergorabi, R.; Nazari, R.M.; Mogadassi, M.; Kaboli, S.A., 2009: Amino acid and fatty acid composition of cultured beluga (*Huso huso*) of different ages. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 18(3): 245-265.
- Koochekian, A.; Ghorban, Z.; Yousefi, A., 2006: Production of isin glass from the swim bladder of sturgeon. *Journal of Applied Ichthyology* 22 (Suppl. 1): 419-421.
- Lopata, A. L., Lehrer, S.B. (2009): New insights into seafood allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 9(3): 270-277.
- Rehbein, H., 2009: Protein-based methods. In: Rehbein, H.; Oehlenschläger, J. (Hrsg.): *Fishery Products-Quality, Safety and Authenticity*. Oxford : Wiley-Blackwell, 496 pp.
- Rehbein, H.; Kündiger, R., 1984: Comparison of the isoelectric focusing patterns of sarcoplasmic proteins from red and white muscle of various fish species. *Archiv für Fischereiwissenschaft* 35(1): 7-16.
- Rehbein, H.; Lopata, A.L., 2010: unveröffentlichte Ergebnisse.
- Schoenman, E.R.; Chiaro, J.A.; Jones, A.; Bastin, L.D.; Coughlin, D.J., 2010: A comparative analysis of parvalbumin expression in pinfish (*Lagodon rhomboides*) and toadfish (*Opsanus sp.*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology* 155(1): 91-99.
- Weber, P.; Steinhart, H.; Paschke, A., 2009: Competitive indirect ELISA for the determination of parvalbumins from various fish species in food grade fish gelatins and isinglass with PARV-19 anti-parvalbumin antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(23): 11328-11334.