

# Analys av makadamianöt i livsmedel

Monica Ferm, Martin Sandberg och Ingrid Malmheden Yman, Livsmedelsverket, Uppsala

Makadamianöt, även kallad Queenslandnöt, har fått sitt namn efter Johan Macadam (1827-1865), verksam som kemist i Australien. Tre olika arter dominerar: *Macadamia integrifolia*, *M. ternifolia*, *M. tetraphylla*. De hör till familjen *Proteaceae* och är inte släkt med andra nötter och fröer. Nötterna växer på höga träd som odlas i Australien, Nordamerika, Centralamerika, Sydafrika och på Hawaii. Nöten, som är rik på fleromättat fett, används som snacks (saltade) och i kex, kakor, glass och choklad. Ur nöten pressas olja och utvinns mjöl. Nöten kan användas till sylt och till smaksättning av kaffe.

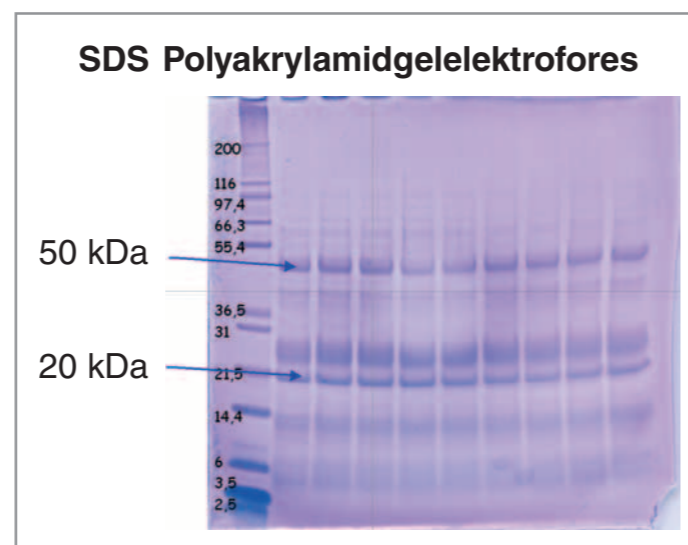


Allergiska reaktioner, t.o.m. svåra anafylaktiska reaktioner, har rapporterats från Australien, USA, Tyskland och Schweiz. Mellan en och tio nötter uppges vara den dos som orsakat reaktioner. Även rapporter om reaktioner mot rostade nötter finns. Ett protein med storleken 17 kDa har identifierats som det dominerande allergenet. Totalt har rapporterats elva individer med allergi mot makadamianöt. Av dessa reagerade två dessutom positivt vid hudtest mot hasselnöt. En av de elva var allergisk mot ett flertal nötter och även jordnöt. En ökande konsumtion i Europa kan leda till ett ökat antal allergiker. Därför ingår makadamianöt bland de nötter som alltid måste anges enligt märkningsdirektivet 2003/89/EG. Bestämmelserna är införlivade i Livsmedelsverkets föreskrifter om märkning och presentation av livsmedel, LIVSFS 2004:27. Mot denna bakgrund har Livsmedelsverket ansett det angeläget att sätta upp metoder för detektion av makadamianöt.

## Metoder

### Antiserum

Från fint malda, icke rostade makadamianötter extraherades fettet med aceton, därpå isolerades proteinerna genom extraktion med Tris/glycinbuffert, 1mM DTE, pH 8,7 vid 40°C. Efter centrifugering, filtrering och precipitation, dialyserades proteinerna och frystorkades. Proteinfraktionen uppvisade flera band på SDS polyakrylamidgel med ett dominerande band på 20 kDa, ett med storleken 50 kDa samt ett diffusare band med storleken 28 kDa. Proteinfraktionen användes för immunisering av kaniner för produktion av antiserum mot makadamianöt.

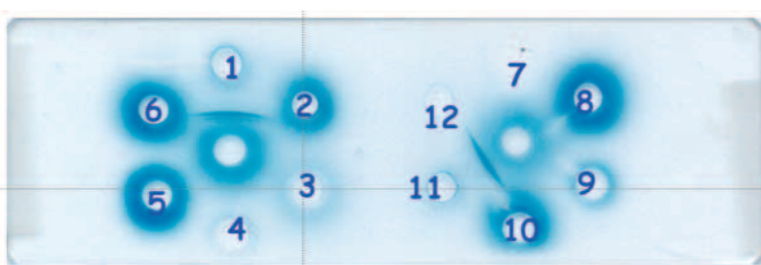


### Immunodiffusion

Specificiteten hos antiserat testades i immunodiffusion mot flera andra nötter. 5 g nötter extraherades med 5 ml Tris/glycinbuffert, pH 8,7, i ultraljudsbad, 2 tim. Extraktet centrifugerades och filtrerades innan 4,5 µl av respektive extrakt applicerades i brunnarna i en 1% agarosgel. Efter diffusion och lakning av icke precipiterande proteiner ur gelen, färgades den med Amidosvart.

Av de testade nötterna gav endast makadamianöt upphov till en precipitationslinje med antiserum mot makadamianöt.

I brunnarna i mitten har antiserum mot makadamiaprotein applicerats

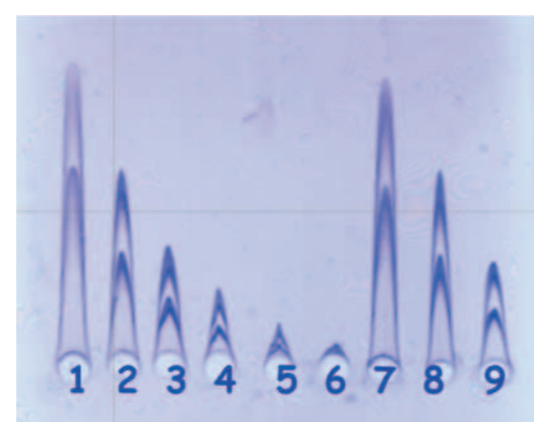


- |                   |                  |
|-------------------|------------------|
| 1. Makadamianöt   | 7. Valnöt        |
| 2. Hasselnöt      | 8. Cashewnöt     |
| 3. Paranöt        | 9. Kastanj       |
| 4. Pekannöt       | 10. Mandel       |
| 5. Pistaschmandel | 11. Makadamianöt |
| 6. Aprikoskärnor  | 12. Kokosnöt     |

### Raketimmunoelktrofores

Kvantifiering av makadamianöt gjordes med raketelktrofores. En spändningsserie av extrakt av makadamianöt applicerades i brunnarna i en agarosgel innehållande 25 µl antiserum. Efter elektrofores färgades gelen med Commassie blått.

Makadamianötprotein ned till en koncentration av 30 µg/g (ppm) kunde mätas. Även i choklad och kakor kan motsvarande nivå av makadamianötprotein mätas.



I brunnarna har en spändningsserie av makadamiaprotein applicerats

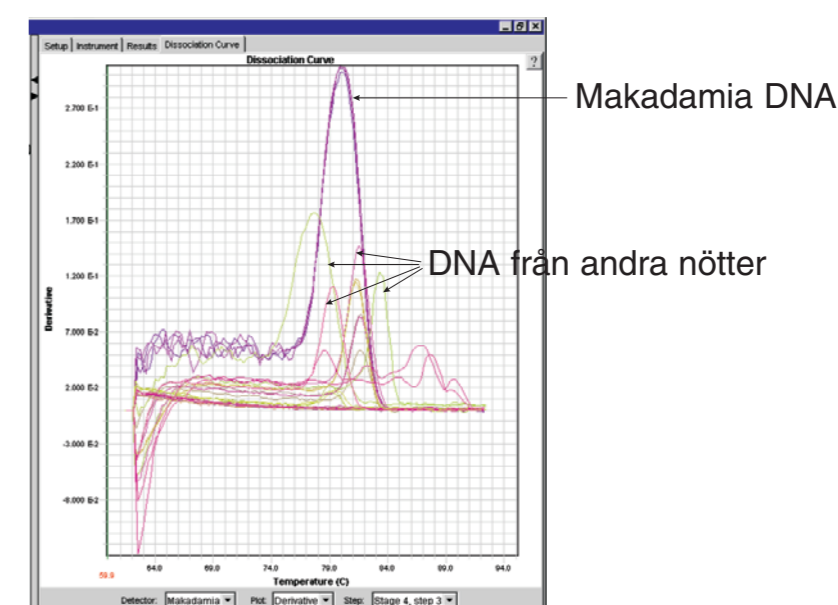
- |            |           |
|------------|-----------|
| 1. 0,1%    | 6. 0,003% |
| 2. 0,05%   | 7. 0,1%   |
| 3. 0,025%  | 8. 0,05%  |
| 4. 0,0125% | 9. 0,025% |
| 5. 0,006%  |           |

### PCR-metoder

Som ett komplement till de immunologiska metoderna har även en specifik DNA-baserad metod utvecklats. Som målsekvens valdes vicilin från *Macadamia integrifolia*. Ingen signifikant homologi förelåg med andra nötter och fröer enligt sökning i databasen BlastN. Två olika primerpar testades för specificitet mot olika nötter. Amplikonlängden var 80 respektive 71 baspar.

#### Smältpunktsanalys

Primerpar 2 testades mot olika nötter:  
Makadamianöt  
Hasselnöt  
Valnöt  
Paranöt  
Mandel  
Aprikoskärnor  
Cashewnöt  
Pistaschmandel  
Pinjenöt

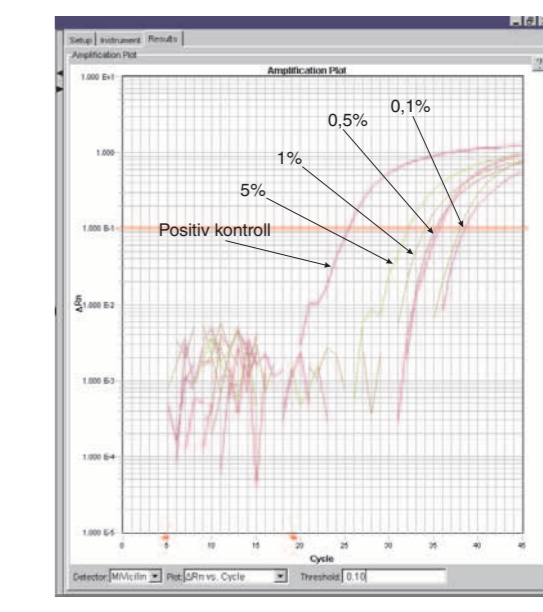


Då olika nötter testades erhöles PCR-produkter som skulle kunna ge falskt positiva resultat. Därför introducerades en probe för att öka specificiteten. Detta gjorde metoden absolut specifik.

I lösning kan 0,004 - 0,002 µg DNA detekteras, vilket motsvarar en koncentration av makadamianöt på 50-100 µg/g. I närvaro av annat DNA detekteras 0,01% DNA från makadamianöt.

En detektionsgräns på 0,1% makadamianöt erhöles då olika blandningar av makadamianöt i choklad analyserades.

#### PCR av makadamianöt i choklad



## Sammanfattning

Makadamianötter liksom produkter där sådana nötter ingår kommer att bli vanligare. Med en ökad konsumtion ökar också risken att fler personer blir allergiska.

Genom att använda antikroppsbaseade immunologiska tekniker och PCR baseade DNA tekniker har specifika metoder etablerats och låga halter av makadamianöt kan påvisas i olika typer av livsmedel.