

*In vitro* Untersuchungen  
des allergenen Potenzials  
von technologisch verändertem Hühnerei

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Chemie  
der Universität Hamburg

aus dem  
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie  
- Abteilung Lebensmittelchemie -  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Sabine Gremmel  
aus Hamburg

Hamburg 2007



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2003 bis April 2006 unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie der Universität Hamburg angefertigt.

---

---

*Erst zweifeln, dann untersuchen, dann entdecken!*

*Henry Thomas Buckle (1821-62)*

---

---

Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart  
Prof. Dr. M. Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juli 2007

MEINEN ELTERN GEWIDMET

## Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand durch eine enge Zusammenarbeit von Verbraucherforschern, Medizинern, Lebensmittelchemikern und Technologen im Rahmen des EU-Projektes „REDALL“ (Reduced Allergenicity of Processed Food, QLK1-CT-2002-02687).

Die Teilnahme an diesem interessanten Projekt haben mir mein Doktorvater, Herr Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart, sowie die Koordinatorin des Projektes, Frau Dr. Angelika Paschke, ermöglicht und mir damit die Gelegenheit gegeben, diese Arbeit anzufertigen. Dafür und für die kompetente Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken. Herrn Prof. Dr. Markus Fischer möchte ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Für die finanzielle Förderung durch das EU-Projekt REDALL, welche diese Arbeit erst ermöglichte, möchte ich mich herzlich bedanken.

Außerdem gilt mein Dank allen Projektpartnern für die wissenschaftlichen Anregungen und die hilfreichen Gespräche im Rahmen der Projekttreffen. Ein besonderer Dank geht an die technologischen Partner für die Bearbeitung und Bereitstellung der technologisch veränderten Untersuchungsproben sowie an die medizinischen Partner des Projektes für die Bereitstellung der Patientenserien.

Besonders möchte ich mich bei allen Patienten bedanken, welche ihr Blut diesem Projekt für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt haben und ohne die diese Untersuchungen gar nicht möglich gewesen wären.

Herrn Dr. Hartmut Kratzin und seinen Mitarbeitern vom Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen möchte ich für die Durchführung der MALDI-TOF/TOF-Analysen und seine Unterstützung bei der Auswertung der Analyseergebnisse herzlich danken.

Ein besonderer Dank geht an Stefanie Riechers, Annegret Arnhold und Ali-Reza Fardinkia, die mir mit ihrer tatkräftigen Unterstützung geholfen haben.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe der Allergie der Universität Hamburg möchte ich mich für die großartige Zusammenarbeit und Unterstützung, die gute Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit während meiner Promotion bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie und an meinen lieben Freund Frank Hildebrandt. Sie haben stets an mich geglaubt und mich unterstützt.



# Inhaltsverzeichnis

<b>VORWORT</b>	<b>I</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>III</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VII</b>
<b>BILDVERZEICHNIS</b>	<b>XI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>XIII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Ziele des Projektes „REDALL“.....	1
1.2 Arbeitsplan .....	2
<b>2 GRUNDLAGEN</b>	<b>3</b>
2.1 Begriffsbestimmungen.....	3
2.1.1 Lebensmittelallergien und Lebensmittelintoleranzen.....	3
2.1.2 Antikörper, Allergene und Epitope.....	4
2.2 Pathogenese von IgE-vermittelten Lebensmittelallergien.....	6
2.3 Prävalenz .....	8
2.4 Das Hühnerei.....	9
2.5 Hühnerei assoziierte Lebensmittelallergien .....	10
2.5.1 Hauptallergene des Hühnereiklars .....	12
2.5.2 Kreuzreaktionen.....	13
2.5.3 Klinik und Expositionsmöglichkeiten .....	14
2.6 Einfluss technologischer Veränderungen .....	14
2.6.1 Hitzebehandlung .....	14
2.6.2 Enzymatische Behandlung (Kombination mit Hitze & Hochdruck).....	15
2.6.3 Harnstoffbehandlung .....	16
2.6.4 Eiproteine als Additive .....	16

<b>3</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Technologisch verändertes Probenmaterial</b>	<b>17</b>
3.1.1	Vollei zum Einsatz in Fertigprodukten	17
3.1.2	Volleipulver als Additiv in Brät zur Herstellung von Brühwürsten	18
<b>3.2</b>	<b>Humanseren</b>	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>Proteinstandards</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>Proteinextraktionen</b>	<b>21</b>
4.1.1	Extraktion mit NaCl-Lösung	21
4.1.2	Extraktion mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS)	21
4.1.3	Extraktion mit Harnstofflösung	21
4.1.4	Extraktion mit Acetatpuffer	21
4.1.5	Extraktion mit Tween 20	22
<b>4.2</b>	<b>Bestimmung des Proteingehaltes</b>	<b>22</b>
<b>4.3</b>	<b>Gesamtstickstoffbestimmung</b>	<b>22</b>
<b>4.4</b>	<b>Enzymallergosorbent-Test (EAST)</b>	<b>23</b>
<b>4.5</b>	<b>EAST-Inhibition</b>	<b>24</b>
<b>4.6</b>	<b>Elektrophorese</b>	<b>24</b>
4.6.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
4.6.2	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	25
4.6.3	Zweidimensionale (2D)-Elektrophorese	26
<b>4.7</b>	<b>Semidry-blotting</b>	<b>26</b>
<b>4.8</b>	<b>Immunoblot (IB)</b>	<b>26</b>
<b>4.9</b>	<b>Unspezifische Färbungen</b>	<b>28</b>
4.9.1	Silberfärbung	28
4.9.2	Colloidale Coomassie-Brilliant-Blue (CBB)-Färbung	28
4.9.3	Ponceau-Färbung	29
<b>4.10</b>	<b>Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight<sup>2</sup> (MALDI-TOF/TOF)</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>



---

<b>5.1</b>	<b>Charakterisierung der Patientenserren.....</b>	<b>31</b>
5.1.1	Charakterisierung mittels EAST.....	31
5.1.2	Charakterisierung mittels Immunoblot.....	31
<b>5.2</b>	<b>Proteinextraktionen.....</b>	<b>34</b>
5.2.1	Quantifizierung des Proteingehaltes der Extrakte.....	34
5.2.2	Quantifizierung des relativen allergenen Potenzials der Proteinextrakte.....	36
<b>5.3</b>	<b>Technologisch verändertes Vollei zum Einsatz in Fertigprodukten.....</b>	<b>37</b>
5.3.1	Charakterisierung der Prozessstufen mittels SDS-PAGE.....	37
5.3.2	Bestimmung des relativen allergenen Potenzials mittels EAST-Inhibition.....	40
5.3.3	Untersuchungen mittels MALDI-TOF/TOF.....	41
<b>5.4</b>	<b>Technologisch verändertes Volleipulver als Additiv in Brät zur Herstellung von Brühwürsten.....</b>	<b>52</b>
5.4.1	Charakterisierung der Prozessstufen mittels SDS-PAGE.....	52
5.4.2	Bestimmung des relativen allergenen Potenzials mittels EAST-Inhibition.....	54
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>57</b>
<b>6.1</b>	<b>Charakterisierung der Patientenserren.....</b>	<b>57</b>
<b>6.2</b>	<b>Proteinextraktionen.....</b>	<b>59</b>
<b>6.3</b>	<b>Technologisch verändertes Vollei zum Einsatz in Fertigprodukten.....</b>	<b>63</b>
6.3.1	Voraussetzungen für die MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen.....	63
6.3.2	Untersuchungen des technologisch veränderten Volleies zum Einsatz in Fertigprodukten.....	64
<b>6.4</b>	<b>Technologisch verändertes Volleipulver als Additiv in Brät zur Herstellung von Brühwürsten.....</b>	<b>68</b>
<b>6.5</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>75</b>
<b>8.1</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>75</b>
8.1.1	Proteinextraktionen.....	75
8.1.2	Bestimmung des Proteingehaltes.....	76
8.1.3	Bestimmung des Gesamtstickstoffs.....	76
8.1.4	Enzymallergosorbent-Test (EAST).....	78
8.1.5	EAST-Inhibition.....	81

---

8.1.6	SDS-PAGE.....	83
8.1.7	Isoelektrische Fokussierung (IEF) .....	84
8.1.8	Zweidimensionale (2D)-Elektrophorese .....	86
8.1.9	Semidry-blotting auf NC-Membranen .....	87
8.1.10	Immunfärbung auf NC-Membran .....	88
8.1.11	Silberfärbung.....	89
8.1.12	Colloidale Coomassie-Brilliant-Blue (CBB)-Färbung.....	90
8.1.13	Ponceau-Färbung auf NC-Membran .....	91
8.1.14	Gewinnung der Patientenserum.....	91
<b>8.2</b>	<b>Charakterisierung der Patientenserum.....</b>	<b>92</b>
8.2.1	EAST-Bestimmungen .....	92
8.2.2	Einzelserumbestimmungen.....	93
<b>8.3</b>	<b>Proteinextraktionen .....</b>	<b>93</b>
8.3.1	Quantifizierung des Proteingehaltes der Extrakte.....	93
8.3.2	Quantifizierung des relativen allergenen Potenzials der Proteinextrakte .....	94
<b>8.4</b>	<b>Technologisch verändertes Vollei zum Einsatz in Fertigprodukte.....</b>	<b>95</b>
<b>8.5</b>	<b>Technologisch verändertes Volleipulver als Additiv in Brät zur Herstellung von Brühwürsten .....</b>	<b>96</b>
<b>8.6</b>	<b>Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmittel, Zubehör .....</b>	<b>97</b>
8.6.1	Chemikalien .....	97
8.6.2	Geräte .....	98
8.6.3	Verbrauchsmittel und Zubehör .....	99
<b>9</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>101</b>

# Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
AP	alkalische Phosphatase
APZ	antigenpräsentierende Zelle
ASU	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren
B <sub>0</sub>	ohne Inhibitor
B <sub>u</sub>	unspezifische Bindung
BfEL	Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel
bidest.	bidestilliert
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
CA	Conalbumin
CBB	Coomassie-Brilliant-Blue
CDR	Complementary Determining Region
CV	Variationskoeffizient
DBPCFC	doppeltblinder placebo-kontrollierter Expositionstest
DONS	Dioctylnatriumsulphosuccinat
EAACI	Europäische Akademie für Allergologie und klinische Immunologie
EACA	6-Aminohexansäure
EAST	Enzymallergosorbent-Test
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymelinkedimmunosorbent-Assay
F <sub>ab</sub>	Antigenbindungsstelle
F <sub>c</sub>	kristallines Fragment
Gal d 1	Ovomucoid
Gal d 2	Ovalbumin
Gal d 3	Conalbumin
Gal d 4	Lysozym

---

Gal d 5	$\alpha$ -Livetin (Hühner-Serumalbumin)
GM	Gewichtsmarker
HRP	Meerrettichperoxidase
IB	Immunoblot
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEFM	IEF-Marker
Ig	Immunglobulin
IUIS	International Union of Immunological Societies
k.A.	keine Angaben
kDa	Kilodalton
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LfL	Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft
LOAEL	lowest observed immuno-allergic effect level
LY	Lysozym
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
N	Negativkontrolle
NC	Nitrocellulose
NSB	nichtspezifische Bindung
OA	Ovalbumin
OD	Optische Dichte
OM	Ovomucoid
P	Positivkontrolle
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PNPP	p-Nitrophenylphosphat

---

pI	isoelektrischer Punkt
PMF	Peptide Mass Fingerprint
RAST	Radioallergosorbent-Test
RT	Raumtemperatur
S. C.	Sequenzübereinstimmung (Sequence coverage)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Skt	Skalenteile
SL	Stammlösung
TCA	Trichloressigsäure
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TOF	Time-Of-Flight
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan



## Bildverzeichnis

Bild 2.1:	Einteilung der Unverträglichkeitsreaktionen nach der Empfehlung der EAACI [BRUIJNZEEL-KOOMEN et al. 1995].....	3
Bild 2.2	Aufbau von Antikörpern [MICROSOFT 2004, modifiziert].....	5
Bild 2.3:	Vereinfachte Darstellung der Sensibilisierungsphase [LICHTENSTEIN 1993]	7
Bild 2.4:	Vereinfachte Darstellung der Manifestationsphase [LICHTENSTEIN 1993]....	7
Bild 2.5:	Schematischer Aufbau eines Hühnereies.....	9
Bild 2.6:	Proteine des Eiklars.....	11
Bild 3.1:	Verarbeitungsprozess des Volleies .....	17
Bild 3.2:	Verarbeitungsprozess des Volleipulvers in Brät durch die BfEL.....	18
Bild 4.1:	Prinzip des EAST [MOHRING 2000, modifiziert] .....	23
Bild 4.2:	Prinzip des IB [MOHRING 2000, modifiziert] .....	27
Bild 4.3:	Prinzip der Silberfärbung [AMERSHAM BIOSCIENCES 1997].....	28
Bild 5.1:	Immunoblot von Vollei unter Verwendung der Einzelseren (P = Positivkontrolle, N = Negativ-kontrolle, rote Kennzeichnung = im Pool verwendete Einzelseren) .....	32
Bild 5.2:	Proteingehalte der Extrakte im Vergleich zum Kontrollwert .....	35
Bild 5.3:	EAST-Inhibition der Extraktionslösungen und des Kontrollwertes .....	36
Bild 5.4:	SDS-PAGE und Silberfärbung der Prozessstufen des Volleies.....	38
Bild 5.5:	Westernblot und Immunfärbung mit Humansenenpool der Prozessstufen des Volleies .....	39
Bild 5.6:	EAST-Inhibition der Prozessstufen des Volleies.....	40
Bild 5.7:	Visualisierung von Eiproteinen: (1) Methode nach NEUHOFF et al. (1988), (2) Methode nach LANNE & PANFILOV (2004), (3) Methode nach NEUHOFF et al. (1988) mit zweitem Fixier-schritt nach LANNE & PANFILOV (2004)..	41
Bild 5.8:	2D-Elektrophorese und colloidale CBB-Färbung der Prozessstufe 1 des Volleies, im Vergleich dazu die Ergebnisse der Prozessstufen 3 und 9 (links von oben nach unten kleiner dargestellt) .....	43
Bild 5.9:	2D-Elektrophorese und Immunoblot der Prozessstufe 1 des Volleies, im Vergleich dazu die Ergebnisse der Prozessstufen 3 und 9 (links von oben nach unten kleiner dargestellt) .....	44

---

Bild 5.10:	2D-Elektrophorese und colloidale CBB-Färbung der Prozessstufe 3 des Volleies, im Vergleich dazu die Ergebnisse der Prozessstufen 1 und 9 (links von oben nach unten kleiner dargestellt).....	46
Bild 5.11:	2D-Elektrophorese und Immunoblot der Prozessstufe 3 des Volleies, im Vergleich dazu die Ergebnisse der Prozessstufen 1 und 9 (links von oben nach unten kleiner dargestellt) .....	47
Bild 5.12:	2D-Elektrophorese und colloidale CBB-Färbung der Prozessstufe 9 des Volleies, im Vergleich dazu die Ergebnisse der Prozessstufen 1 und 3 (links von oben nach unten kleiner dargestellt).....	49
Bild 5.13:	2D-Elektrophorese und Immunoblot der Prozessstufe 9 des Volleies, im Vergleich dazu die Ergebnisse der Prozessstufen 1 und 3 (links von oben nach unten kleiner dargestellt) .....	50
Bild 5.14:	SDS-PAGE und Silberfärbung der Prozessstufen des Volleipulvers in Brät .....	52
Bild 5.15:	Immunfärbung der Prozessstufen des Volleipulvers in Brät.....	53
Bild 5.16:	EAST-Inhibition der Prozessstufen des Volleipulvers in Brät.....	55
Bild 8.1:	Proteinmarker Mark12 (Invitrogen®) .....	84
Bild 8.2:	IEF-Marker: SERVA Liquid Mix 3 – 7 .....	86
Bild 8.3:	Immunoblot des Serenpools und Silberfärbung von Standardproteinen.....	93



# Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Symptome der Lebensmittelallergie .....	8
Tabelle 2.2:	Eigenschaften wichtiger Eiklarallergene [KREFT et al. 1995].....	11
Tabelle 2.3:	Kreuzreaktionen der Proteine des Hühnereis .....	13
Tabelle 3.4:	Parameter der Proteinstandards .....	20
Tabelle 4.1:	Einteilung der EAST-Klassen .....	24
Tabelle 5.1:	Allergenbanden der Einzelseren im Immunoblot .....	33
Tabelle 5.2:	Zusammensetzung des Poolserums.....	33
Tabelle 5.3:	Proteinextraktionen .....	35
Tabelle 5.4:	C <sub>50</sub> -Werte der EAST-Inhibition der Extraktionen des Volleies .....	36
Tabelle 5.5:	C <sub>50</sub> -Werte der EAST-Inhibition der Prozessstufen des Volleies.....	40
Tabelle 5.6:	Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen der Prozessstufe 1 des Volleies .....	45
Tabelle 5.7:	Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen der Prozessstufe 3 des Volleies .....	48
Tabelle 5.8:	Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen der Prozessstufe 9 des Volleies .....	50
Tabelle 5.9:	C <sub>50</sub> -Werte der EAST-Inhibition der Prozessstufen des Brät .....	55
Tabelle 6.1:	Konzentrationen verschiedener Reagenzien, die zu Störungen der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) führen können .....	61
Tabelle 6.2:	Vergleich der Arbeitsschritte zweier Proteinfärbe-methoden mit colloidalem CBB .....	63
Tabelle 8.1:	EAST-Klassen der Patientenseren .....	92
Tabelle 8.2:	Proteinextraktionen, Bestimmung nach BRADFORD (1976).....	93
Tabelle 8.3:	Proteinbestimmung nach § 64 LFBG, ASU Nr. L 06.00-7.....	94
Tabelle 8.4:	EAST-Inhibition der Proteinextrakte .....	94
Tabelle 8.5:	EAST-Inhibition der Prozessstufen des Volleies zum Einsatz in Fertigprodukten .....	95
Tabelle 8.6:	EAST-Inhibition der Prozessstufen des Volleipulvers als Additiv in Brät .....	96
Tabelle 8.7:	Verwendete Chemikalien .....	97

Tabelle 8.8: Verwendete Geräte .....	98
Tabelle 8.9: Verwendete Verbrauchsmittel und Zubehör.....	99

# 1 Einleitung

Lebensmittelallergien sind immunologisch bedingte Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Lebensmittel bzw. Lebensmittelinhaltsstoffe. Die meisten Lebensmittelallergien sind dem Sofort-Reaktionstyp (Typ I) zuzuordnen und werden durch Antikörper der Klasse IgE vermittelt. Sie äußern sich in Symptomen wie Hautausschlag, Schwellungen im Mund- und Rachenbereich, Schnupfen, Augenbindehautentzündung, Asthma, Nesselfieber, Quincke-Ödem, vielfältige Magen-Darm-Störungen bis hin zum anaphylaktischen Schock, welcher tödlich enden kann. Die Lebensmittelallergien haben in den letzten Jahrzehnten deutlich in ihrer Bedeutung zugenommen. Um die Verbraucher vor allergischen Reaktionen zu schützen, stehen die Bestimmung und Reduktion des allergenen Potenzials von Lebensmitteln im Mittelpunkt dieser Arbeit. Gegenstand dieser Untersuchungen sind die bereits relativ gut charakterisierten Allergene des Hühnereiklars, welche mit zu den häufigsten Auslösern von Lebensmittelunverträglichkeiten sowohl bei Kindern [BERNHISEL-BROADBENT et al. 1994; CRESPO et al. 1995] als auch bei Erwachsenen [NØRGAARD & BINDSLEV-JENSEN 1992; WÜTHRICH 1993] zählen.

Im Rahmen des EU-Projektes „REDALL“ (Reduced Allergenicity of Processed Food, QLK1-CT-2002-02687) wurden Technologien zur Herstellung von Handelsprodukten angewandt und getestet, um unter anderem Eiprodukte in ihrem allergenen Potenzial zu reduzieren und sie für den Verbraucher verträglicher zu machen. Dieses Ziel wurde erreicht durch eine enge Zusammenarbeit der Projektpartner, die sich aus Verbraucherschern, Medizinern, Lebensmittelchemikern und Technologen zusammensetzen.

## 1.1 Ziele des Projektes „REDALL“

Die epidemiologische Zielsetzung dieses Projektes war das Erlangen von Kenntnissen über die Verbreitung von Lebensmittelallergien in der europäischen Bevölkerung (Skandinavien, Zentraleuropa, Mittelmeergebiet und Osteuropa) mittels Verbrauchermumfragen. Dabei sollten speziell regionale Unterschiede der Allergisierung und die Häufigkeit von schweren allergischen Reaktionen betrachtet werden.

Die technologische Zielsetzung war die Entwicklung von Strategien zur Reduzierung des allergenen Potenzials von Lebensmitteln, welche Ei- und Milchallergene enthalten und ein potenzielles Risiko für Allergiker darstellen.

Die analytische Zielsetzung war die Identifizierung und Untersuchung des allergenen Potenzials der technologisch verarbeiteten Produkte sowie der Vergleich des allergenen Potenzials von nativen (Hühnerei und Milch) und technologisch veränderten Produkten mittels *in vitro* und *in vivo* Tests.

## 1.2 Arbeitsplan

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der analytischen Untersuchung von technologisch durch Hitze- und Hochdruckbehandlung sowie durch enzymatische Hydrolyse veränderten Eiprodukten mittels *in vitro* Tests.

Gegenstand der Untersuchungen waren Zwischen- und Endprodukte eines Prozesses von technologisch verändertem *Vollei zum Einsatz in Fertigprodukten* sowie von technologisch verändertem *Volleipulver als Additiv in Brät zur Herstellung von Brühwürsten*.

Untersucht wurden dabei die Auswirkungen der technologischen Veränderungen auf das allergene Potenzial der vier Hauptallergene des Eiklars: Conalbumin (CA), Ovalbumin (OA), Ovomuroid (OM) und Lysozym (LY).

Unter Verwendung elektrophoretischer und immunologischer Verfahren wie Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Isoelektrische Fokussierung (IEF), 2-dimensionale (2D)-Elektrophorese und Immunoblot (IB) wurden im Rahmen dieser Arbeit die vier Hauptallergene des Eiklars der zu untersuchenden Lebensmittelproben voneinander getrennt und anschließend mittels geeigneter allergenspezifischer und -unspezifischer Färbemethoden visualisiert. Zur Identifizierung von eventuell durch die technologische Behandlung der Lebensmittel auftretenden Allergenfragmenten bot sich eine Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight<sup>2</sup> (MALDI-TOF/TOF)-Analyse an. Um eine relative Quantifizierung des allergenen Potenzials technologisch veränderter und nativer Lebensmittelproben vorzunehmen, fand die Enzymallergosorbent-Test (EAST)-Inhibition Anwendung.

Für die quantitative und qualitative Allergenanalytik war neben den genannten Untersuchungsmethoden die im Vorfeld durchgeführte Aufarbeitung zur Abtrennung der Hauptallergene von der jeweiligen Matrix von Interesse. Für dieses Ziel wurde zunächst die Anwendbarkeit unterschiedlicher Extraktionsverfahren im Hinblick auf die Allergenanalytik getestet. Verschiedene gängige Proteinextraktionsverfahren wurden auf ihre Anwendbarkeit in der Allergenanalytik überprüft.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Begriffsbestimmungen

#### 2.1.1 Lebensmittelallergien und Lebensmittelintoleranzen

Die Bezeichnung „Allergie“ (griechisch: allos abgeändert; ergon Reaktion) wurde von dem Wiener Kinderarzt VON PIRQUET (1906) geprägt. Sie kann heute definiert werden als spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit [RING 1988]. Sie entsteht nach wiederholtem Kontakt mit Allergie auslösenden Stoffen, den Allergenen. Manche Krankheitsbilder anderer Unverträglichkeitsreaktionen gegen Lebensmittel können die Symptomatik einer allergischen Erkrankung weitgehend imitieren, ohne dass der Mechanismus der allergischen Reaktion zugrunde liegt.

Die Europäische Akademie für Allergologie und klinische Immunologie (EAACI) teilt die objektiv nachweisbaren Lebensmittelunverträglichkeiten nach pathogenetischen Gesichtspunkten in toxische und nicht-toxische Reaktionen ein (Bild 2.1).

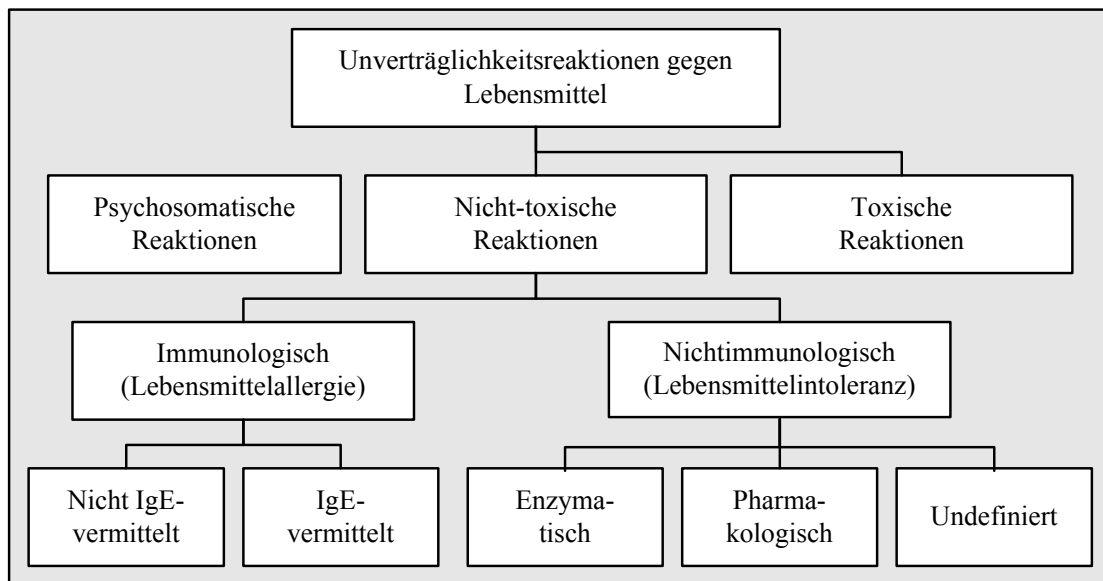


Bild 2.1: Einteilung der Unverträglichkeitsreaktionen nach der Empfehlung der EAACI [BRUIJNZEEL-KOOMEN et al. 1995]

Psychosomatische Reaktionen müssen vom Begriff Lebensmittelallergie oder -intoleranz abgegrenzt werden, da die vermeintliche krankhafte Rolle von Lebensmitteln oder Lebensmittelzusatzstoffen (Additiva) sich mit keiner wissenschaftlichen Methode untermauern lässt [ORTOLANI et al. 1999].

Zu den toxischen Reaktionen gehören z.B. Vergiftungserscheinungen nach Genuss nicht essbarer Pilze oder Durchfälle und Erbrechen nach Genuss verdorbener Speisen infolge bakterieller Toxine.

Alle nicht-toxischen Reaktionen betreffen Personen mit einer erhöhten individuellen Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Lebensmittelbestandteilen [VIETHS 1996].

**Lebensmittelintoleranzen** sind nichtimmunologische Reaktionen auf Lebensmittel. Pathogenetisch werden enzymatische, pharmakologische und unbekannte Intoleranz erzeugende Mechanismen unterschieden. Die häufigste enzymatische Intoleranz ist der genetisch bedingte Lactasemangel (Durchfälle und Bauchkrämpfe nach Milchgenuss). Als Folge verschiedener entzündlicher Darm- und Bauchspeicheldrüsenerkrankungen können aber auch erworbene enzymatische Intoleranzen entstehen. Pharmakologische Intoleranzen treten bei empfindlichen Personen nach Genuss von Lebensmitteln mit hohem Gehalt an Histamin oder anderen pharmakologisch wirksamen Substanzen auf. Der Terminus „Undefiniert“ in Bild 2.1 bezeichnet solche Unverträglichkeitsreaktionen, bei denen kein immunologischer Auslösemechanismus nachweisbar ist und deren Ursachen bisher nicht exakt geklärt werden können. Am bekanntesten sind hier die sogenannten pseudoallergischen Reaktionen. Sie können das Symptombild einer Lebensmittelallergie weitgehend imitieren, sind jedoch im Allgemeinen stärker dosisabhängig und werden nicht durch eine Sensibilisierung des Immunsystems ausgelöst. In den Positionspapieren der EAACI wird jedoch empfohlen, diesen Begriff der pseudoallergischen Reaktion nicht mehr zu verwenden [BRUIJNZEEL-KOOMEN et al. 1995; ORTOLANI et al. 1999].

Bei **Lebensmittelallergien** treten krankhafte Symptome nach der Lebensmittelaufnahme als Folge von immunologischen Mechanismen auf, die die Bildung von allergenspezifischen Antikörpern oder von sensibilisierten T-Effektorzellen induzieren. Der Allergie gegen Lebensmittel liegt somit eine fehlgeleitete Reaktion des körpereigenen Immunsystems zugrunde, die in den meisten Fällen auf der Aktivität allergenspezifischer Antikörper der Immunglobulinklasse E (IgE, siehe 2.1.2) beruht. Die Symptome können dabei durch kleine oder mäßige Mengen des betreffenden Lebensmittels ausgelöst werden, verschwinden nach dessen Elimination und können reproduzierbar durch eine erneute Exposition wieder ausgelöst werden. Alle bisher identifizierten und näher charakterisierten Lebensmittelallergene sind natürliche Inhaltsstoffe von Lebensmitteln, nämlich Proteine oder Glykoproteine. Prinzipiell sind alle Lebensmittel, die solche Stoffe enthalten in der Lage, Allergien auszulösen [VIETHS 1996].

### 2.1.2 Antikörper, Allergene und Epitope

Substanzen, die spezifische Immunreaktionen auslösen, werden als Antigene (Antisomatogen = Antikörperbildner) bezeichnet. Voraussetzung für eine Immunantwort ist, dass das Antigen vom Organismus als fremd erkannt wird. Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 4000 Da werden nur erkannt, wenn sie an ein Trägerprotein (Carrier) gekoppelt werden [AULEPP & VIETHS 1992]. Fremdsubstanzen, die allein

keine Immunantwort stimulieren, wohl aber an Antikörper binden können, werden als Haptene bezeichnet [TAYLOR et al. 1987].

**Antikörper** sind Glycoproteine, die vom Organismus zum Schutz vor Fremdstoffen gebildet werden. Sie werden von B-Lymphocyten synthetisiert und in das Serum abgegeben (siehe 2.2). Jedes Antikörpermolekül besteht aus mindestens einer Grundeinheit. Diese ist wiederum aus vier Polypeptidketten - zwei identischen schweren (H- für „heavy“) und zwei identischen leichten (L- für „light“) Ketten - aufgebaut, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Innerhalb des Moleküls besitzen die beiden „Arme“ ( $F_{ab}$ ) dieselbe Struktur und bilden die Antigenbindungsstelle (Bild 2.2).

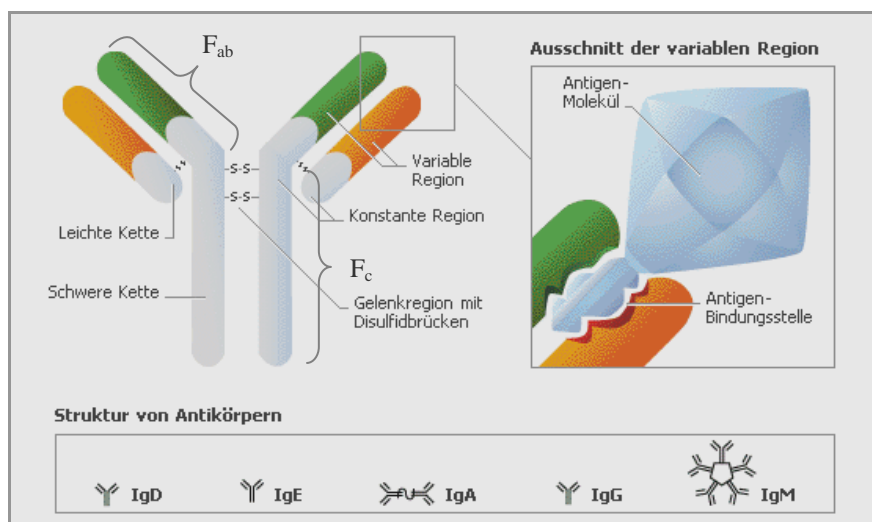


Bild 2.2 Aufbau von Antikörpern [MICROSOFT 2004, modifiziert]

Die Aminosäuresequenzen der Antigen bindenden Stellen verschiedener Antikörpermoleküle und die davon abgeleiteten dreidimensionalen Strukturen weisen starke Differenzen auf. Sie werden als variable Regionen bezeichnet und bestimmen die Antikörperspezifität. Jeder der  $F_{ab}$ -Anteile der L- und H-Ketten trägt CDR- („Complementary Determining Region“) Schleifen (nicht dargestellt). Drei Schleifen jeder Kette bilden zusammen die Antigenbindungsstelle. Diese Struktur schafft im Antikörpermolekül eine Nische, in die die komplementäre Struktur des Antigenepitops hineinpasst [STAINES et al. 1997]. Die Affinität zwischen Antigen und Antikörper hängt ab von der Verteilung der verschiedenen Aminosäuren an den Bindungsstellen mit speziellen Ladungen oder anderen Eigenschaften, die für eine nichtkovalente Bindung zwischen Antigen und Antikörper sorgen. So treten z.B. Wechselwirkungen über aromatische Reste (van-der-Waals-Kräfte) und Wasserstoffbrücken auf [AIGNER & NEUMANN 1997]. Der „Stamm“ (kristallines Fragment,  $F_c$ ) des Moleküls kann kein Antigen binden. Er zeigt beim Vergleich verschiedener Antikörper weniger Variabilität und wird als konstante Region bezeichnet. Trotzdem gibt es einige strukturelle Unterschiede in diesen Regionen der Antikörpermoleküle, welche – völlig unabhängig von der Antigen-spezifität – der Einteilung in bestimmte Ig-Klassen dienen. Das in Kapitel 2.1.1 beschriebene IgE ist eines von fünf Ig-Isotypen (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) des

Organismus. Diese unterscheiden sich in Bezug auf Molekulargewicht, Ladung, Aminosäuresequenz, Kohlenhydratanteil sowie ihrer Aufgabe im Organismus voneinander [JANEWAY & TRAVERS 1995; KREFT et al. 1995; ROITT et al. 1995].

**Allergene** sind Antigene, die bei sensibilisierten Individuen die Produktion von spezifischen IgE-Antikörpern induzieren und dadurch eine allergische Reaktion hervorrufen können. Die meisten Lebensmittelallergene weisen Molekulargewichte von 10 bis 70 kDa [SAMPSON 1991; LEHRER et al. 1996] selten bis zu 100 kDa [AULEPP & VIETHS 1992; AALBERSEE 2000] auf. Natürliche Substanzen, die allergenes Potenzial besitzen, enthalten meist mehrere Allergene. Als Hauptallergene werden solche Allergene bezeichnet, gegen die mehr als 50 % der getesteten (auf ein bestimmtes Agens allergischen) Patienten spezifische IgE-Antikörper aufweisen. Die übrigen Allergene werden entsprechend als Nebenallergene bezeichnet [JANKIEWICZ et al. 1997].

Ein **Epitop** ist das Fragment des Antigens, das von dem Antikörpermolekül erkannt wird und mit diesem eine Bindung eingeht. Ein Proteinepitop kann auf zwei verschiedene Arten aufgebaut sein: als sequenzielles (kontinuierliches) oder konformationelles (diskontinuierliches) Epitop. In einem sequentiellen Epitop sind alle beteiligten Aminosäuren Teil einer einzigen Sequenz, während beim konformationellen Epitop die beteiligten Aminosäuren durch die Faltung der Peptidkette zueinander gebracht werden. Antikörper erkennen Epitope nur, wenn sie auf der Oberfläche des Moleküls lokalisiert sind. Im Inneren lokalisierte Aminosäuren werden nicht erkannt. Eine von außen induzierte Veränderung der Proteinstruktur kann neue Epitope (Neoepitope) hervorbringen. Auf- oder Umfaltungen der Proteinkette können zu einem Freilegen von potenziell immunogenen Sequenzen oder Konformationen führen. Eine Möglichkeit der Bildung neuer Allergene (Neoallergene) ist hierdurch theoretisch gegeben [CAPONI & MIGLIORINI 1999].

## 2.2 Pathogenese von IgE-vermittelten Lebensmittelallergien

Neben toxischen oder pseudoallergischen Reaktionen zählen Lebensmittelallergien zu den häufigsten Lebensmittelunverträglichkeiten. Typische Lebensmittelallergien sind IgE-vermittelte Typ-I- oder auch Soforttyp-Reaktionen [COOMBS & GELL 1963]. Neben diesen Typ-I-Reaktion werden weiterhin die antikörperabhängige zytotoxische Überempfindlichkeit (Typ II) und die Immunkomplexreaktion (Typ III) unterschieden, die ebenfalls antikörpervermittelt ablaufen, allerdings auf die Ig-Klassen G bzw. M zurückgeführt werden. Die Kontaktallergie (Typ IV) hingegen wird in erster Linie durch T-Zellen und Makrophagen vermittelt. Bei dieser Klassifizierung handelt es sich lediglich um eine vereinfachte Darstellung, da sich die Mechanismen der Immunantwort sehr oft überschneiden.

Der Ablauf einer allergischen Reaktion vom Typ I lässt sich in zwei Phasen einteilen: In der Sensibilisierungsphase (Immunantwort, siehe Bild 2.3) kommt es durch Kontakt mit dem Allergen zur Produktion entsprechender Antikörper bzw. Proliferation spezifisch



reaktionsfähiger T-Effektorzellen. Nach dieser Phase ist der Betroffene sensibilisiert, aber nicht erkrankt. In der Manifestationsphase (siehe Bild 2.4) wird beim Sensibilisierten durch erneuten Allergenkontakt eine pathogene Immunreaktion ausgelöst.

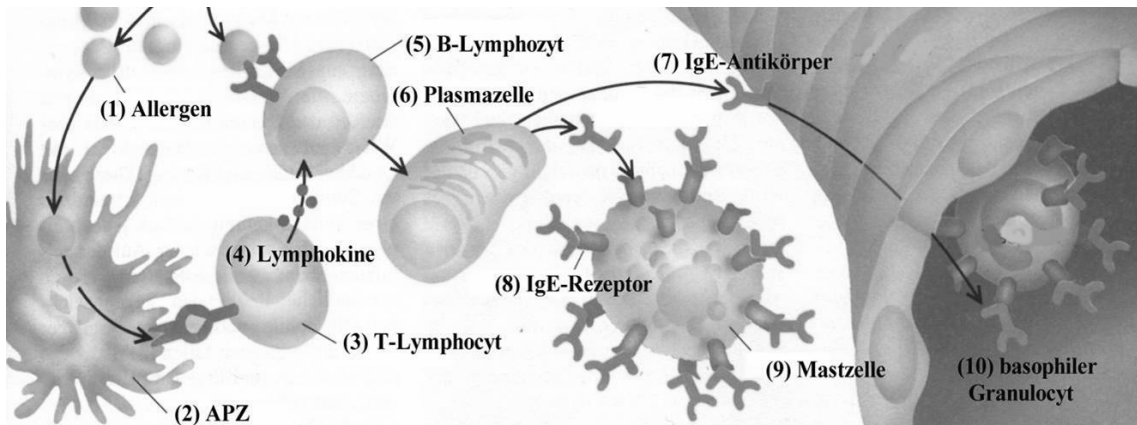


Bild 2.3: Vereinfachte Darstellung der Sensibilisierungsphase [LICHTENSTEIN 1993]

Die Sensibilisierung wird durch Aufnahme und enzymatische Spaltung der Allergene (1) von Makrophagen (2 APZ = antigenpräsentierende Zelle) eingeleitet. Die dabei entstandenen Fragmente werden an der Oberfläche der Makrophagen, welche als antigenrepräsentierende Zellen fungieren, den T-Lymphozyten (3) offeriert. Nach Erkennung der Fragmente kommt es zur Freisetzung von Lymphokinen (4), wodurch eine Ausreifung der B-Lymphocyten (5) zu Plasmazellen (6) erfolgt. Als Konsequenz daraus werden von diesen Zellen IgE-Antikörper (7) abgegeben, wobei die einmal begonnene IgE-Produktion über Monate anhält. Aufgrund ihrer Molekülstruktur sind die IgE-Antikörper in der Lage, sich über einen langen Zeitraum an die hochaffinen IgE-Rezeptoren (8) der Mastzellen (9) und der basophilen Granulozyten (10) zu binden [JANEWAY & TRAVERS 1995].

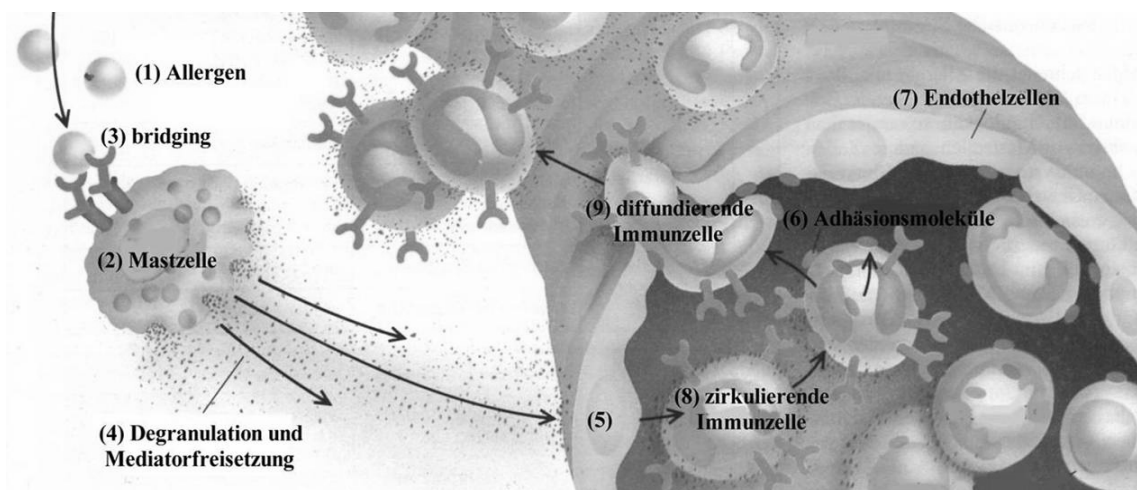


Bild 2.4: Vereinfachte Darstellung der Manifestationsphase [LICHTENSTEIN 1993]

Eine erneute Exposition des Organismus mit dem Allergen (1) hat eine sofortige allergische Reaktion zur Folge. Die Bindung des Allergens führt zur Überbrückung, dem „bridging“ (3) von zwei auf einer Mastzelle (2) lokalisierten IgE-Antikörpern. Als Folge der daraus resultierenden Deformation der Mastzellenoberfläche kommt es durch Degranulation der Mastzelle zur Mediatorfreisetzung (4). Die Mediatoren (z.B. Histamin oder Serotonin) induzieren nach Übergang in die Blutgefäße (5) die Bildung von Adhäsionsmolekülen (6). Diese haften an Mediatoren sowie Endothelzellen (7) und bewirken eine Diffusion (9) von zirkulierenden Immunzellen (8) in das umliegende Gewebe. Die freigesetzten Mediatoren bewirken die typischen klinischen Erscheinungen einer Lebensmittelallergie.

Diese Symptome können verschiedene Organe betreffen und sind häufig abhängig von der Art des Allergens [YOUNG et al. 1994]. Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über die Symptome von Lebensmittelallergien [BISCHOFF & MANN 1996; BISCHOFF & MANN 2001; SCHÄFER & BREUER 2003].

Tabelle 2.1: Symptome der Lebensmittelallergie

Ort der allergischen Reaktion	Symptome
Haut	Atopisches Ekzem, Urtikaria
Augen	Konjunktivitis
Respirationstrakt	Rhinitis, Asthma
Mund	Lippenschwellung, Rachenschleimhautschwellung, Larynxödem, Angioödem
Gastrointestinaltrakt	Epigastrische Beschwerden, Übelkeit, Erbrechen, Bauchkrämpfe, Diarrhö, Obstipation, Flatulenz
Nervensystem	Kopfschmerzen, Migräne, vegetative Symptomatik
Kreislaufsystem	Hypotomie, Tachykardie, Anaphylaktischer Schock

## 2.3 Prävalenz

Entgegen den Vorstellungen in den Medien und von Laien und Patienten kommen Unverträglichkeitsreaktionen auf Lebensmittel und Additive weniger häufig als vermutet vor [WÜTHRICH 1996]. Im Gegensatz zu den viel häufiger auftretenden Respirationsallergien auf Pollen, Hausstaubmilben, Tierepithelien oder Pilzsporen, von denen 10 - 20 % der Bevölkerung betroffen sind [WÜTHRICH et al. 1995; 1999], sind Unverträglichkeitsreaktionen gegen Lebensmittel relativ selten. Europäische Berichte schätzen die Prävalenz von Lebensmittelallergien auf 0,3 - 7,5 % bei Kindern und auf 1 - 2 % bei Erwachsenen [KAJOSAARI 1982; ESTEBAN 1992; KANNY et al. 2001; DEAN 1997].

Unter Berücksichtigung regional unterschiedlicher Ernährungsgewohnheiten und variierender genetischer Disposition reagieren ungefähr 80 % aller Lebensmittelallergiker auf Erdnüsse, Milch oder Eier [STANLEY & BANNON 1999]. Allerdings tolerieren die meisten betroffenen Kinder mit zunehmendem Alter Milch oder Eier weitgehend.

## 2.4 Das Hühnerei

Vogeleier haben aufgrund ihrer vollwertigen Zusammensetzung und vielseitigen Verwendbarkeit als Lebensmittel für den Menschen eine große Bedeutung. Hühnereier nehmen dabei eine besonders wichtige Stellung ein. Daneben spielen die Eier anderer Vogelarten wie z.B. Gans, Ente, Taube, Kiebitz, Möve oder Wachtel nur eine untergeordnete Rolle. Unter der Bezeichnung „Eier“ versteht man gemäß der geltenden gesetzlichen Bestimmungen (Eier-Vermarktungsnormenverordnung (VO (EWG) 1907/90) vom 26. Juni 1990 (ABl. Nr. L 173 S. 5) in der Fassung vom 21.06.2005 (ABl. Nr. L 172 S. 1)) [MEYER 2006] nur Eier des Haushuhnes (*Gallus domesticus*). Eier stellen eine wichtige Proteinquelle in der menschlichen Ernährung dar. Sie zeichnen sich außerdem durch Bekömmlichkeit und Wohlgeschmack aus. Von technologischem Nutzen in der Lebensmittelindustrie sind besonders die Viskosität, Bindekraft, Emulgier- und Backfähigkeit und das Schaumbildungsvermögen des Hühnereies [KALLWEIT et al. 1988]. Eier werden außerdem für technologische Zwecke, z.B. als Klärmittel für Wein oder als Appreturmittel und in der pharmazeutischen Industrie und Lederindustrie verwendet.

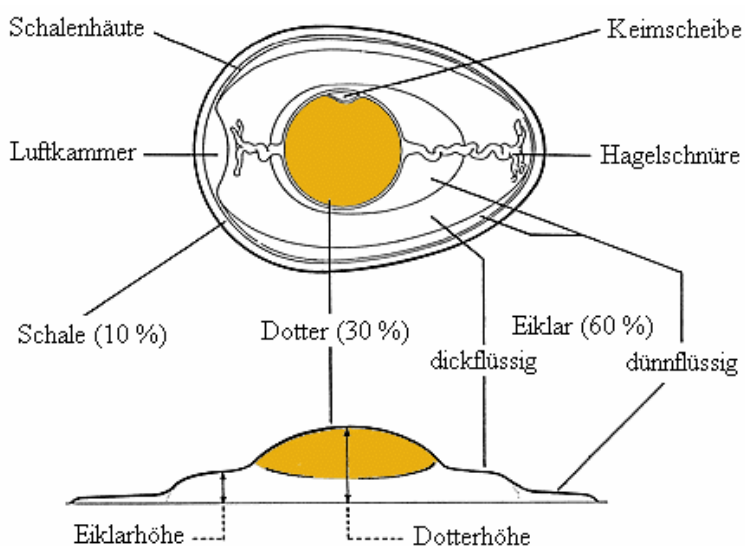


Bild 2.5: Schematischer Aufbau eines Hühnereies

Das Durchschnittsgewicht eines Hühnereies beträgt etwa 58 g. Davon entfallen etwa 10 % auf die Schale, 30 % auf den Dotter und 60 % auf das Eiklar [SCHORMÜLLER 1968]. Die Schale ist 0,2 - 0,4 mm stark, porös und je nach Rasse braun oder weiß. Sie besteht aus einem Protein-Mucopolysaccharid-Gerüst, in das Calciumcarbonat eingelagert ist. Innen ist die Schale mit einer zweischichtigen Haut ausgekleidet, die am stumpfen Ende geteilt ist und eine Luftkammer bildet. Die Schale umschließt das Eiklar, welches den im Inneren liegenden Dotter umgibt. Dieses ist durch zwei spiralig gedrehte Hagelschnüre fixiert. An einer Seite des Dotters liegt die weiße Keimscheibe (siehe Bild 2.5).

Das Eiklar ist eine wässrige Flüssigkeit mit einer Trockenmasse von etwa 12 %. Es besteht aus drei unterschiedlich viskosen Schichten. Dickflüssiges Eiklar weist gegenüber dünnflüssigem den vierfachen Gehalt an Ovomucin-Fasern (siehe 2.5) auf. Der pH-Wert beträgt beim frischen Ei 7,6 – 7,9 und steigt bei der Lagerung durch Verlust von Kohlenstoffdioxid durch Diffusion bis auf 9,7. Die Trockenmasse besteht zu über 80 % aus Proteinen (siehe Bild 2.6), von denen die Globuline (z.B. Lysozym, Ovomucin) mit

Ammoniumsulfatlösung gefällt werden können, während die Albumine (Ovalbumin, Conalbumin, Ovomuroid) in Lösung bleiben. Kohlenhydrate treten zu etwa 1 % im Eiklar auf und liegen frei oder gebunden als Glykoproteine vor. Der Mineralstoffgehalt (0,6 %) im Eiklar ist gering, ebenso der Lipidgehalt (0,03 %).

Der Eidotter ist eine Fett-in-Wasser-Emulsion mit einer Trockenmasse von 50 %. Diese besteht zu einem Drittel aus Proteinen und zu zwei Dritteln aus Lipiden. Die Dotterkugel ist aus dem gelbgefärbten Nahrungsdotter und dem weißen Bildungsdotter aufgebaut; abgeschlossen wird sie von der Dottermembran. In dem Nahrungsdotter sind alle für die Entwicklung eines Küchens erforderlichen Nährstoffe enthalten. Eidotter enthält neben Plasma Dottertröpfchen, die überwiegend aus Lipiden bestehen, und Granula, die hauptsächlich aus Proteinen, aber auch aus Lipiden und Mineralstoffen bestehen (wichtige Proteine der Granula und des Plasmas siehe 2.5). Die Lipide bestehen zu 66 % aus Triglyceriden, zu 28 % aus Phospholipiden und zu 6 % aus Cholesterin, Cholesterinestern und sonstigen Verbindungen. Die Phospholipide sind zusammen mit den Lipoproteinen für die emulgierende Wirkung der Eier verantwortlich, was für die Herstellung von z.B. Mayonnaisen und Eierlikör genutzt wird. Die gelbe Farbe des Eidotters ist in erster Linie auf Carotinoide wie Zeaxanthin, Lutein und Xanthophylle zurückzuführen.

Die Aminosäure-Zusammensetzung des Proteinanteils des gesamten Eiinhaltes (Vollei) entspricht ernährungsphysiologisch optimal den Erfordernissen des Menschen, weshalb die Konzentration an essenziellen Aminosäuren als Bezugseinheit zur Berechnung der biologischen Wertigkeit anderer Proteine dient.

Die Legeleistung eines Huhnes beträgt etwa 300 Eier pro Jahr. Der pro Kopf Verbrauch pro Jahr in Europa umfasst laut des Jahresberichtes der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft [LfL, 2005] 200 - 300 Stück.

## **2.5 Hühnerei assoziierte Lebensmittelallergien**

Die Hauptallergene des Hühnereies befinden sich im Eiklar und stellen eine der häufigsten Ursachen der bei Erwachsenen und Kindern auftretenden Allergien des Typ I dar [BARKHOLT et al. 2000]. Diese sind bei Kindern häufig verantwortlich für die Entwicklung von Urtikaria und Ekzemen. Juckreiz (Pruritus) und atopische Dermatitis sind die am meisten beschriebenen Symptome einer Studie mit 84 Kindern mit Eiallergie [LANGELAND 1985]. LANGELAND (1983) detektierte 24 antigene Bestandteile des Eiklars mittels gekreuzter Immunelektrophorese. Allergologisch sind besonders vier Fraktionen der Eiklarproteine von Bedeutung: Ovomuroid, Ovalbumin, Conalbumin (= Ovotransferrin) und Lysozym (siehe auch Tabelle 2.2). Diese Proteine machen ca. 80 % der Gesamtproteine des Eiklars aus.

Tabelle 2.2 Eigenschaften wichtiger Eiklarallergene [KREFT et al. 1995]

	Ovomucoid (Gal d 1)	Ovalbumin (Gal d 2)	Conalbumin (Gal d 3)	Lysozym (Gal d 4)
<b>Anteil am Gesamtproteingehalt</b>	11 %	54 %	12 %	3,5 %
<b>Molekulargewicht</b>	28 kDa	42,7 kDa	80 kDa	14,3 kDa
<b>pI</b>	4,1 - 4,4	4,5 - 4,9	6,0 - 6,8	10,7
<b>Aminosäuren</b>	186	386	683	129
<b>Kohlenhydratgehalt</b>	20 - 25 %	3 %	2 %	--
<b>Thermostabilität</b>	ja	gering	nein	nein

Die Anteile dieser und weiterer Proteine des Eiklars am Gesamtproteingehalt sind in Bild 2.6 dargestellt.

Die Proteine des Eidotters sind bisher nicht so umfassend untersucht wie die des Eiklars. Im Eidotter befinden sich Partikel (Granula), die gleichmäßig verteilt in einer Proteinlösung (Plasma) vorliegen. Vitellogenin stellt ein Phospholipoglycoprotein dar, das in der Leber als Antwort auf im Kreislauf zirkulierendes Estrogen produziert wird. Es gelangt über das Blut zu den Ovarien. Dort wird es über Pinocytose in die Oocyten aufgenommen und in die Dotterproteine Phosphitin und Vitellin gespalten [WAHLI et al. 1981]. Allergologisch sind für Erwachsene die im Eidotter befindlichen Proteine Vitellin, Phosphitin und alpha-Livetin (Hühnerserumalbumin) von Bedeutung [WALSH et al. 1987]. Vitellin kommt in mehreren Varianten mit Molekulargewichten von 9 (Vitellin I) bis 170 kDa (Vitellin VI) vor. Im Allgemeinen ist das allergene Potenzial von Vitellin gering, bei einigen Patienten kann es aber dennoch starke Allergien auslösen [WALSH et al. 1988]. Phosphitin ist ein heterogenes Protein mit verschiedenen Fraktionen und einem allgemein geringen allergenen Potenzial. Von den fünf Fraktionen der Livetine ist das alpha-Livetin (70 kDa) aufgrund der Homologie zu Serumalbumin das wichtigste [WILLIAMS 1962]. Diese Homologie ist der Grund für die Bildung des „Vogel-Ei-Syndroms“ (siehe hierzu auch 2.5.2).

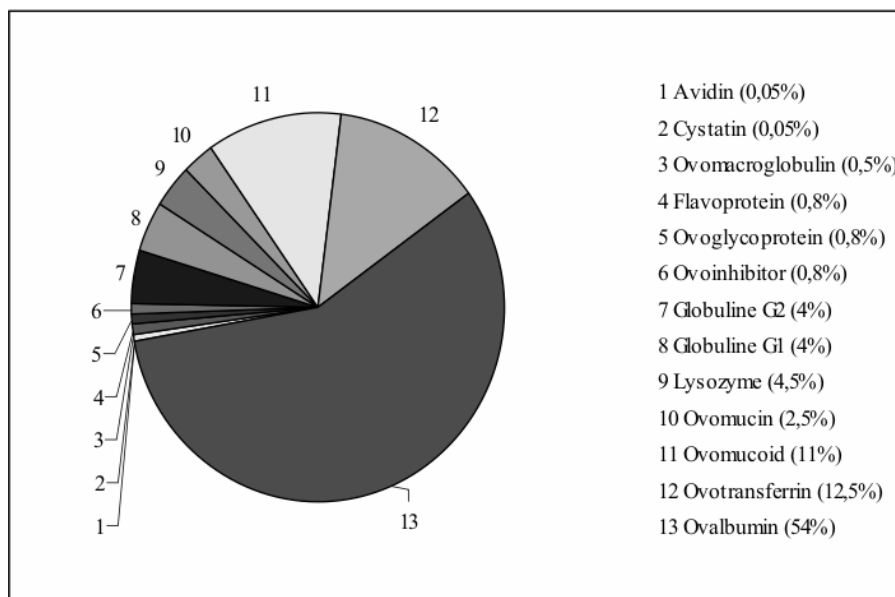


Bild 2.6: Proteine des Eiklars

Im Folgenden wird lediglich auf die vier Hauptallergene des Eiklars eingegangen, da diese im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht wurden.

### 2.5.1 Hauptallergene des Hühnereiklars

**Ovomucoid** wird nach der IUIS (International Union of Immunological Societies)-Nomenklatur als „Gal d 1“ bezeichnet. Hühnerei-Ovomucoid ist ein Glycoprotein, welches in der Lage ist, bovines Trypsin (nicht humanes Trypsin) und andere Enzyme zu inhibieren [TRAVIS 1971]. Ovomucoide von nahe verwandten Spezies wie z.B. Truthahn oder Goldfasan, zeigen sehr unterschiedliche allergene Potenziale [RHODES et al. 1960]. Nach allergologischen Gesichtspunkten ist es das wichtigste Protein im Hühnereiklar. Die Aminosäuresequenz ist bekannt [KATO et al. 1987]. Ovomuucoid besteht aus drei hintereinander folgenden homologen Domänen (DI-III). Es ist resistent gegen viele Formen der Denaturierung (z.B. Harnstoffbehandlung). Dies basiert wahrscheinlich auf der starken Vernetzung durch Disulfidbrücken [DJURTOFT et al. 1991]. Ein weiterer Grund für die Stabilität ist die Existenz von zwei Domänen (DI/II oder DII/III). T-Zellen reagieren meistens mit DII [EIGENMANN et al. 1995], können aber auch mit den zwei weiteren Domänen reagieren. Diese Reaktivität steigt durch reduktive Behandlung [COOKE et al. 1996]. Obwohl Ovomuucoid und Ovalbumin verschiedene Molekulargewichte aufweisen, können sie mittels SDS-PAGE nicht komplett voneinander getrennt werden [BERNHISEL-BROADBENT et al. 1994].

**Ovalbumin** wird nach der IUIS-Nomenklatur als „Gal d 2“ bezeichnet. Es kommt mit 54 % als größter Anteil der Gesamteiklarproteine vor. Ovalbumin ist ein Glycoprotein, das nach Ovomuucoid das zweitstärkste allergene Potenzial aller Eiproteine aufweist. Es setzt sich aus drei Fraktionen (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub>) zusammen, welche sich in ihrem Phosphatgehalt unterscheiden [PERLMANN 1952]. Die Funktion von Ovalbumin ist noch nicht umfassend erforscht, aber die Aminosäuresequenz ist bekannt [NISBET et al. 1981; ELSAYED et al. 1991]. Bei dem Molekül handelt es sich um ein Monomer mit 45 kDa [WARNER 1954].

**Conalbumin** (= Ovotransferrin) wird nach der IUIS-Nomenklatur als „Gal d 3“ bezeichnet. Aufgrund der Fähigkeit Eisen zu binden, wirkt es antibakteriell. Die Aminosäuresequenz, welche aus zwei über Disulfidbrücken stabilisierten Domänen besteht, ist bekannt [WILLIAMS & ELLERMAN 1982; DJURTOFT et al. 1991]. Conalbumin weist ein weitaus schwächeres allergenes Potenzial als Ovalbumin und Ovomuucoid auf.

**Lysozym** wird nach der IUIS-Nomenklatur als „Gal d 4“ bezeichnet. Es hat ein weitaus geringeres allergenes Potenzial als Ovalbumin, Ovomuucoid und Conalbumin. Die Aminosäuresequenz, welche aus vier über Disulfidbrücken verbundenen Ketten besteht, ist bekannt [CANFIELD 1963].

## 2.5.2 Kreuzreaktionen

Kreuzreaktionen von IgE-Antikörpern basieren auf der Reaktivität mit homologen Strukturen, die mit dem eigentlichen Auslöser der IgE-Antwort, dem Immunogen, Ähnlichkeit besitzen. Bei Proteinen gleicher Funktion können die Strukturen auch zwischen Organismen, die nur eine geringe phylogenetische Verwandtschaft aufweisen, noch hoch konserviert und damit auch kreuzreaktiv sein. Vielfach wird die Meinung vertreten, dass klinisch relevante Kreuzreaktionen bei Proteinen mit einer Aminosäure-Sequenzidentität von weniger als 50 % nicht mehr zu erwarten sind. Dies wird aber durch den Befund widerlegt, dass z.B. die Hauptallergene Api g 1 aus Sellerie und Dau c 1 aus Karotte weniger als 40 % Sequenzidentität mit Bet v 1 aus Birkenpollen aufweisen [HENZGEN et al. 2005]. Es ist daher davon auszugehen, dass in Einzelfällen auch klinisch relevante Kreuzreaktionen zwischen solchermaßen gering verwandten Proteinen auftreten können.

Im Fall der Allergie gegen Hühnerei sensibilisieren sich Kinder hauptsächlich oral gegen Proteine aus dem Eiklar. Im Gegensatz dazu ist bei Erwachsenen häufig das sogenannte Vogel-Ei-Syndrom zu beobachten, bei dem die Sensibilisierung meist primär inhalativ auf Federn und Kot von Ziervögeln erfolgt und sich in der Folge aufgrund einer Kreuzreaktion zwischen Vogelfedern bzw. -kot und Allergenen des Eigelbs eine Lebensmittelallergie gegen Eigelb entwickelt. Dabei spielt das alfa-Livetin (Hühner-Serumalbumin, Gal d 5) eine entscheidende Rolle [SZEPFALUSI et al. 1994; WYSS et al. 1996].

Verschiedene Studien diskutieren außerdem Kreuzreaktionen zwischen

- 1) Allergenen des Hühnereies [ANET et al. 1985; WALSH et al. 1987],
- 2) Hühnereiallergenen und anderen Allergenen des Huhnes [HOFFMANN & GUENTHER 1988; DE MAAT-BLEEKER et al. 1985; BAXENDALE et al. 1971; WILLIAMS 1962] und
- 3) Hühnereiallergenen und Eiallergenen anderer Geflügelarten [ANET et al. 1985; LANGELAND 1983; ALESSANDRI et al. 2005].

(Siehe hierzu auch Tabelle 2.3)

Tabelle 2.3: Kreuzreaktionen der Proteine des Hühnereis

kreuzreagierende Proteine	
1)	Conalbumin                      Ovalbumin Ovalbumin                      Apovitellenin I
2)	Albumine                              beta-Glycoproteine Serumproteine                      Livetine
3)	Hühnereiproteine                      Eiproteine von Truthahn, Ente, Gans, Möwe und Wachtel

### 2.5.3 Klinik und Expositionsmöglichkeiten

Die klinischen Erscheinungen einer Eiallergie können in unterschiedlicher Intensität mit gastrointestinalen Beschwerden, Reaktionen seitens des Respirationstrakts, der Haut und des Kreislaufsystems bis zum anaphylaktischen Schock, der in schweren Fällen zum Tod führen kann, einhergehen. Sofern keine Sensibilisierung durch Ovomucoïd vorliegt, werden gekochte oder gebratene Eier in den meisten Fällen vertragen [JÄGER & WÜTHRICH 2002].

Eier werden in zahlreichen Lebensmitteln wie z.B. Mayonnaisen, Soßen, Teigwaren, Wurstsorten und Fertigspeisen verarbeitet (siehe hierzu auch 2.4). Als niedrigsten Schwellenwert zur Auslösung von allergischen Symptomen nach oraler Aufnahme (LOAEL = lowest observed immuno-allergic effect level) geben MORISSET et al. (2003)  $< 2$  mg Ei an.

## 2.6 Einfluss technologischer Veränderungen

Während der Lebensmittelherstellung und -verarbeitung kann es zu potenziellen Veränderungen der Allergenität von Hühnereiproteinen kommen. Das allergene Potenzial kann durch verschiedene Verfahren wie z.B. Waschen, Zerkleinern, Erhitzen, Konservieren, Lagerung oder Reifung abnehmen, unverändert bleiben, aber auch zunehmen. Außerdem können verschiedene chemische Wechselwirkungen zwischen natürlichen Lebensmittelzutaten und Additiven während der Lebensmittelverarbeitung auftreten. Viele Allergene bleiben aber im Allgemeinen nach üblicher industrieller Behandlung des Lebensmittels stabil, und nur wenige Allergene sind labil und werden durch die Verarbeitung des Lebensmittels in ihrer Allergenität reduziert. Auf molekularer Ebene wird eine Allergenveränderung durch Inaktivierung oder Zerstörung von IgE-bindenden Epitopstrukturen, durch die Bildung von neuen Epitopen oder durch besseren Zugang zu sterisch verborgenen Epitopen nach einer Denaturierung des nativen Allergens verursacht. Proteolytische oder hydrolytische Behandlungen können sowohl die konformationelle Struktur als auch die lineare Aminosäuresequenz beeinflussen, wodurch auch sequenziell bindende Epitope zerstört werden können [BESLER et al. 2000]. Mit dem Ziel, Methoden zu entwickeln, um die Allergenität von Eiklarallergenen zu reduzieren, sind verschiedene experimentelle Möglichkeiten wie z.B. Behandlung mit Hitze, Enzymen oder Hochdruck veröffentlicht. Ausschnitte davon werden in den folgenden Abschnitten (2.6.1 - 2.6.4) dargestellt.

### 2.6.1 Hitzebehandlung

Durch Hitzebehandlung kann die konformationelle Struktur eines Allergens durch den Verlust der Tertiärstruktur und Aggregation verändert werden [BESLER et al. 2000]. Aufgrund unterschiedlicher Hitzebehandlungen treten im Vergleich verschiedener Veröffentlichungen widersprüchliche Aussagen über die Struktur der hitzebehandelten Proteine auf [PENG et al. 1998; MEANS & FEENEY 1971; KOCH et al. 1996]. Durch einige Veröffentlichungen, welche beschreiben, dass gekochte Hühnereier in



Tierversuchen eine viel niedrigere oral-sensitive Kapazität aufweisen als native Eier [PENG et al. 1998; McLAUGHLAN et al. 1981; COOMBS & McLAUGHLAN 1984], ist die Hitzebehandlung im Allgemeinen als eine Möglichkeit zur Allergenreduzierung anerkannt [PENG et al. 1998; COOMBS & McLAUGHLAN 1984; LEE 1992]. Je länger das Lebensmittel erhitzt wird, desto besser ist der allergenreduzierende Effekt [JEONG 1998]. Die IgE-Bindung von Eiklarallergenen konnte in einer Studie von ANET et al. (1985) durch eine 10minütige Erhitzung der Probe bei 90 °C auf 58 % (Bestimmung mittels RAST, Radio Allergosorbent Test) gesenkt werden. In einer weiteren Studie konnte durch eine einstündige Erhitzung auf 90 °C mittels DBPCFC (double blind placebo controlled food challenge) festgestellt werden, dass nur noch 55 % der getesteten Eiallergiker allergische Reaktionen zeigten [URISU et al. 1997].

Trotzdem werden in diesem Zusammenhang aber auch schwere Unverträglichkeitsreaktionen gegen Lebensmittel beschrieben [BESLER et al. 2000]. Speziell für Ovomuroid haben Forscher eine hohe Hitzestabilität und Proteolyseresistenz demonstriert [VIETHS et al. 1997; STEVENS & FEENEY 1963; DEUTSCH & MORTON 1956; MATSUDA et al. 1982; MATSUDA et al. 1983]. Dies weist darauf hin, dass in diesem Fall die Antikörperbindung an sequenzielle Epitope erfolgt, welche kaum von konformationellen Veränderungen durch Hitzeeinwirkung betroffen sind [KONISHI et al. 1985].

KATO et al. (2001) und GU et al. (1986) haben gezeigt, dass isoliertes Ovomuroid durch Erhitzen nicht aggregiert oder präzipitiert wird, sondern löslich bleibt und die Reaktivität mit dem Patientenantikörper nicht verändert wird. Allerdings konnte in einer Studie von MATSUDA et al. (1985) eine Reduktion der immunogenen Reaktivität von Ovomuroid beim Erhitzen auf 100 °C gezeigt werden. Ovalbumin (Koagulationstemperatur: 84,5 °C) ist hitzelabil, bildet aber während mehrtägiger Lagerung bei Raumtemperatur hitzestabiles S-Ovalbumin (Koagulationstemperatur: 92,5 °C) [DE GROOT & DE JONGH 2003]. Der Mechanismus der Umsetzung zu S-Ovalbumin ist bisher ungeklärt. Conalbumin ist ein hitzelabiles Allergen, bildet aber mit bi- und trivalenten Metallionen hitzestabile Komplexe [YOSHITADA et al. 1980]. Nach KREFT et al. (1995) gilt Lysozym als hitzelabil (siehe auch Tabelle 2.2).

### **2.6.2 Enzymatische Behandlung (Kombination mit Hitze & Hochdruck)**

Es ist bekannt, dass durch enzymatische Behandlung das allergene Potenzial von Lebensmitteln verändert werden kann. JEONG (1998) entdeckte, dass die Behandlung von Lebensmitteln mit Proteasen den Hydrolysegrad erhöhen und das allergene Potenzial beträchtlich reduzieren kann. Dabei erwiesen sich Alkalasen als weitaus effektiver als Neutrasen.

In einer Studie von ASTWOOD et al. (1996) zeigte sich jedoch eine Resistenz von Ovalbumin gegen Verdauungsenzyme bei einem pH-Wert von 1,2 (> 1 Stunde). Es erwies sich, dass Ovalbumin für diese Proteasen erst nach einer Hitzedenaturierung zugänglich wird [BONOMI et al. 1999]. Da durch diese Hitzebehandlung Einbußen der technologischen Eigenschaften von Eiern resultieren können, wird in der Lebensmittel

verarbeitenden Industrie häufig als Alternative eine Hochdruckbehandlung zur milden Denaturierung gewählt. Professor P. W. BRIDGMAN, ein Pionier der Hochdruckphysik, berichtete bereits 1914 über rohes Vollei, welches in der Eierschale unter Einwirkung von hohen hydrostatischen Drücken (500 - 600 MPa) koagulierte, ohne dass die Eierschale zerstört wurde. Wie Hochdruck allerdings auf die Allergenität von Lebensmitteln wirkt, ist bisher sehr wenig untersucht worden.

Ovalbumin ist Trypsin-resistent, aber nicht Pepsin-resistent [ELSAYED et al. 1986]. Conalbumin hingegen wurde in einer Studie von ASTWOOD et al. (1996) auch ohne vorherige Denaturierung durch Hitze oder Druck sofort abgebaut. Ovomuroid ist in simulierter Verdauungslösung länger als eine Stunde stabil [FU et al. 2002; TAKAGI et al. 2003]. URISU et al. (1997), KOVACS-NOLAN et al. (2000) und BESLER et al. (1999) stellten durch RAST-Inhibition, ELISA (Enzymelinkedimmunosorbent-Assay) und Westernblotting signifikante IgE-Bindungen von Pepsin-verdaulichem Ovomuroid fest. Sie verwendeten dafür Serum von Patienten mit Eiallergie. KOVACS-NOLAN et al. (2000) konnten auch feststellen, dass Pepsin-verdaulichem Ovomuroid seine Trypsin-inhibierenden Eigenschaften beibehält. URISU et al. (1997) analysierten zudem durch RAST-Inhibition signifikante IgE-Bindungen von Chymotrypsin-verdaulichem Ovomuroid.

### **2.6.3 Harnstoffbehandlung**

Harnstoff (6 M) ist in der Lage, Eiklarproteine in eine globuläre, teilweise denaturierte Form umzusetzen, wobei die ursprungsähnliche Struktur weitgehend erhalten bleibt. Während eine Harnstoffbehandlung in einer Studie von MINE und ZHANG (2002) keine Auswirkungen auf die IgE-Bindungsaktivitäten von Ovalbumin und Ovomuroid zeigte, ergaben sich bei Conalbumin und Lysozym signifikant höhere Bindungsaktivitäten zu humanem IgE als bei nativen Formen.

### **2.6.4 Eiroteine als Additive**

LEDUC et al. (1999) testeten die IgE-Bindungsaktivität von Eiklarpulver in experimentell hergestellten Schweinefleischpasten. Sie konnten mittels Immunoblot und EAST Eiklarallergene in unbehandelten und in pasteurisierten (70 °C, 2 h) Fleischpasten nachweisen, während keine IgE-Bindungen zu sterilisierten (115 °C, 90 min) Pasten detektiert werden konnten. KATO et al. (2001) untersuchten die Auswirkungen der Hitzebehandlung einer Modellpasta auf Ovomuroid (Weizenmehl mit Hühnereiklar gemischt). Aus dieser Untersuchung ergaben sich eine starke Unlöslichkeit und eine deutliche Reduktion des allergenen Potenzials von Ovomuroid. Sie führen dies auf eine Aggregation durch Bildung intermolekularer Disulfidbrücken mit Weizenproteinen zurück.

## 3 Material

### 3.1 Technologisch verändertes Probenmaterial

#### 3.1.1 Vollei zum Einsatz in Fertigprodukten

Nicht sämtliche Frischeier gelangen direkt an den Endverbraucher. Zur Konservierung werden aus Eiern flüssige oder pulverförmige Dauerwaren hergestellt. Der Eiinhalt wird dabei durch Trocknen, Gefrieren oder durch chemische Konservierung haltbar gemacht und insbesondere in der Lebensmittelindustrie für verschiedene Zwecke verwendet (siehe dazu auch 2.4). Die Eiprodukte werden hauptsächlich in der Teigwaren- und Backindustrie oder zur Herstellung von z.B. Margarine, Eiscreme oder Mayonnaise eingesetzt [SCHORMÜLLER 1968].

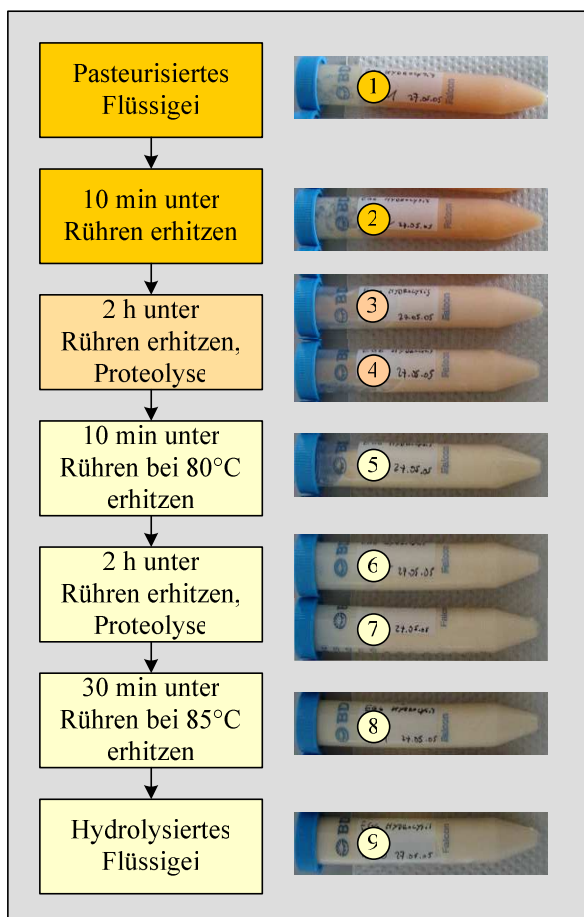


Bild 3.1: Verarbeitungsprozess des Volleies

Die einzelnen Stufen eines Verarbeitungsprozesses zur Allergenreduzierung von pasteurisiertem Vollei wurden von technologischen Partnern des REDALL-Projektes zur Verfügung gestellt. Das Vollei wurde einem sechsstündigen Verarbeitungsprozess unterzogen, dessen Verarbeitungsschritte in Bild 3.1 dargestellt sind. Die Probennahme während der zweistündigen Erhitzungs- und Proteolyseschritte erfolgte jeweils nach einer Stunde und nach zwei Stunden.

Die verwendeten Proteolyseenzyme sowie einige Erhitzungstemperaturen unterliegen zurzeit noch der Geheimhaltung.

Während des Prozesses kam es zu Farbveränderungen der Proben, was aus Bild 3.1 (rechts) zu entnehmen ist. Geschmacks- und Texturveränderungen wurden von einem Sensorikpanel unter Aufsicht der technologischen Partner des REDALL-Projektes während des Prozesses kaum festgestellt.

### 3.1.2 Volleipulver als Additiv in Brät zur Herstellung von Brühwürsten

Brühwürste werden aus rohem zerkleinertem Rind-, Schweine- und/oder Geflügelfleisch, Speck sowie Salz und Gewürzen hergestellt. Milch und Milchproteine, Eier und Pflanzenproteine werden als Bindemittel eingesetzt. Um eine homogene Wurstmasse (Brät) zu erzeugen, werden die Ausgangsmaterialien unter Zugabe von Eis oder Eiswasser meist mit Kutterhilfsmitteln (z.B. Phosphat) intensiv zerkleinert (gekuttert). Das Brät wird abgefüllt und bei 70 °C und höher gebrüht. Beim Brühen verfestigt sich die Masse, und es entsteht die typisch knackige Textur. Aufgrund der besonderen Verarbeitungsmethoden sind Brühwürste nur begrenzt haltbar und müssen deshalb gut gekühlt aufbewahrt und möglichst frisch verzehrt werden. Zu dieser Gruppe gehören z.B. Weißwurst, Fleischwurst, Jagdwurst und Bierschinken. Die roten Brühwurstsorten werden unter Zusatz von Nitritpökelsalz hergestellt, die weißen Sorten wie Weißwurst sowie viele Bratwürste ausschließlich mit Kochsalz.

Die von der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BfEL, Standort Kulmbach) hergestellte Fleischmatrix sollte einer nach industriellem Standard hergestellten Brühwurstmasse möglichst ähnlich sein. Die Zusammensetzung ist wie folgt: 56 % Rindfleisch (Schulter), 24 % Rückenspeck, 18,3 % Eis, 1,65 % Nitritpökelsalz und 0,05 % Natriumascorbat.

Die Menge an Trockenei (1 %) wurde in Schritt 2 des in Bild 3.2 vorgestellten Verarbeitungsprozesses zusätzlich zu den 100 % der Rezeptur dosiert.

Die einzelnen Stufen des Verarbeitungsprozesses zur Allergenreduzierung von *Volleipulver als Additiv in Brät zur Herstellung von Brühwurst* und die anschließenden technologischen Veränderungen wurden ebenfalls von der BfEL zur Verfügung gestellt. Die Verarbeitungsschritte sind in Bild 3.2 dargestellt.

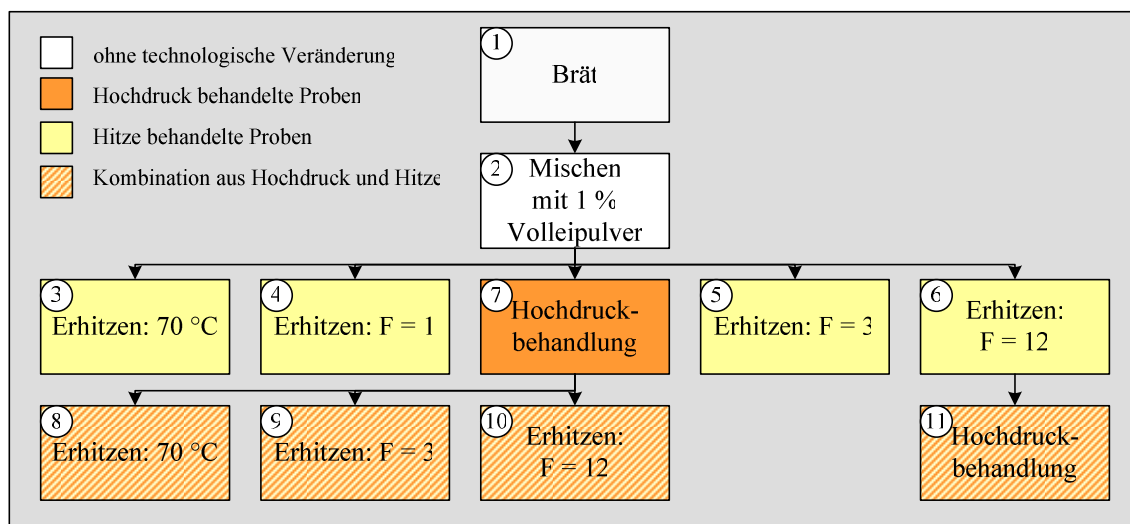


Bild 3.2: Verarbeitungsprozess des Volleipulvers in Brät durch die BfEL

Die Fleischmasse wird mit der oben genannten Rezeptur im Kutter (D 114 K&G, 6 Standardmesser) mit 4900 rpm bei maximal 12 °C zerkleinert. Weiter wird verfahren wie aus Bild 3.2 zu entnehmen.

- ⇒ Die Hochdruckbehandlung erfolgt im „Food Processor“ (EPSI) in hermetisch geschlossenen Aluminiumleichtbehältern mit 600 MPa bei 20 °C für 10 Minuten. Dies ist ein relativ neues technologisches Verfahren zur Haltbarmachung von Fleischprodukten und wird in der Lebensmittelindustrie angewendet.

Konserven sind Lebensmittel, die in verschlossenen Behältern erhitzt und in diesen Behältern auch in Verkehr gebracht werden. Ziel ist es - durch die Begrenzung der mikrobiellen Aktivität (Erhitzen nach vollständigem Verschluss) - eine lange Lagerungszeit ohne eine wesentliche Veränderung des Inhaltes zu erreichen (Nährstoffgehalt, sensorische Qualität, mikrobieller Verderb). Ein Maß für die „Gesamtmenge“ an Hitze mit schädigender Wirkung auf Mikroorganismen ist der F-Wert. Er entspricht der Behandlungszeit in Minuten, die erforderlich ist, um eine vorhandene (spezifische) Keimzahl auf einen akzeptablen Endwert zu reduzieren [ZIERMANN 2005].

Bei Fleisch- und Wurstkonserven kommt es insbesondere darauf an, das Überleben und/oder die Entwicklung der Sporen der Bakteriengattungen *Bacillus* und *Clostridium* zu verhindern.

Das Erhitzen der Behälter erfolgt im Autoklaven („pilot-rotor“, Stock) bei einem Druck von 2 atm

- ⇒ auf eine Kerntemperatur von 70 °C, wie es in der Fleischindustrie für Frischwaren üblich ist. Diese Behandlung tötet nur hitzeintolerante Mikroorganismen ab. Da hitzeresistente Bakterien und Sporen überleben können, muss die Brühwurst bei unter 5 °C gelagert werden. Die Haltbarkeit ist auf etwa sechs Wochen begrenzt.
- ⇒ auf 110 °C auf einen F-Wert von 1, wie es in der Fleischindustrie für Dreiviertelkonserven üblich ist, wobei neben allen vegetativen Mikroorganismen auch Sporen mesophiler *Bacillus*arten inaktiviert werden. Bei unter 10 °C sind diese Konserven etwa 12 Monate haltbar.
- ⇒ auf 110 °C auf einen F-Wert von 3, wie es in der Fleischindustrie für Vollkonserven üblich ist. Durch diese Behandlung werden neben allen vegetativen Mikroorganismen auch Sporen mesophiler *Bacillus*- und *Clostridium*arten inaktiviert. Bei 25 °C sind diese Konserven etwa 4 Jahre haltbar.

⇒ auf 110 °C auf einen F-Wert von 12, wie es in der Fleischindustrie für Tropenkonserven üblich ist, die als steril gelten und ohne Kühlung (< 30 °C) länger als ein Jahr haltbar sind. Durch diese Behandlung werden neben allen vegetativen Mikroorganismen und Sporen mesophiler *Bacillus*- und *Clostridium*arten auch Sporen thermophiler *Bacillus*- und *Clostridium*arten inaktiviert. Bei 25 °C sind diese Konserven etwa 4 Jahre haltbar.

Außerdem werden Kombinationen aus Hochdruck- und Hitzebehandlungen durchgeführt.

### 3.2 Humanseren

Im Rahmen des REDALL-Projektes werden in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität München (Abteilung für Dermatologie und Allergologie), dem Universitätshospital Zürich (Allergiestation, Dermatologische Klinik), dem Macedonio Melloni Hospital Mailand (Abteilung für Pädiatrie) und der Universität Wien (Abteilung für Pädiatrie und Juvenile Medizin) Seren von Patienten mit Hinweis auf eine Sensibilisierung gegen Hühnerei untersucht. Dazu wurde den Patienten zunächst Blut abgenommen und daraus das Serum gewonnen (siehe 8.1.14). Eine Auflistung der untersuchten Humanseren ist im Anhang unter 8.2.1 aufgeführt. Bestimmt wird der Gehalt an freien spezifischen IgE-Antikörpern gegen Hühnerei mittels EAST (siehe 4.4 und 8.1.4). Allergenbanden der Einzelseren, welche EAST-Klassen  $\geq 2$  (Klasseneinteilung siehe 4.4) aufweisen, werden mittels Immunoblot (siehe 4.8 und 8.1.9) charakterisiert. Aus allen Seren mit EAST-Klassen  $\geq 2$  und eindeutiger Allergenbandenfärbung im Immunoblot wird ein Poolserum hergestellt, das ein breites Detektionsspektrum für alle durchzuführenden immunologischen Untersuchungen gewährleistet und dessen Zusammensetzung in Tabelle 5.2 aufgeführt ist. Als Negativkontrolle wird ein Serum eines Probanden ohne Hühnereiallergie eingesetzt, das eine EAST-Klasse von 0 aufweist.

### 3.3 Proteinstandards

Die in der folgenden Tabelle 3.4 dargestellten Proteine der Firma SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen, Deutschland) wurden im Rahmen dieser Arbeit als Standardsubstanzen eingesetzt.

Tabelle 3.4: Parameter der Proteinstandards

	Reinheitsstufe	Reinheit laut Analysenzertifikat	Lagerung
<b>Conalbumin</b>	Substantially iron-free	> 99 % (März 2001)	- 20 °C
<b>Ovalbumin</b>	Grade V	> 99 % (Juli 2005)	2 – 8 °C
<b>Ovomucoid</b>	Type III-O, free of ovoinhibitor	--	2 – 8 °C
<b>Lysozym</b>	3 x crystallized, containing buffer salts (NaCl & Na-acetate)	96 % (Oktober 2003)	- 20 °C

## **4 Methoden**

Der folgende Abschnitt befasst sich mit den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Analysemethoden, die zur Realisierung der Zielsetzungen eingesetzt wurden. Dargestellt sind die Prinzipien der Methoden sowie eventuell durchgeführte Modifizierungen von in der Literatur bereits beschriebenen Methoden.

### **4.1 Proteinextraktionen**

#### **4.1.1 Extraktion mit NaCl-Lösung**

Nach der Methode von LANGELAND (1982a) und LANGELAND (1982b) wird das Probenmaterial vier Stunden mit dem gleichen Volumen 0,15 M NaCl-Lösung gerührt, 30 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **4.1.2 Extraktion mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS)**

Nach der Methode von BERNHISEL-BROADBENT et al. (1994) wird das Probenmaterial über Nacht auf dem Rotationsschüttler bei 4 °C mit dem zehnfachen Volumen phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) extrahiert, 10 Minuten bei 2500 g zentrifugiert, der Überstand in Röhren umgefüllt und zur Klärung bei 17000 g erneut für 15 Minuten zentrifugiert.

Nach der Methode von LEDUC et al. (1999) wird das Probenmaterial über Nacht bei 4 °C mit dem gleichen Volumen PBS inkubiert, 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert und durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Die Lösung wird bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **4.1.3 Extraktion mit Harnstofflösung**

Nach der Methode von BERKELMANN & STENSTEDT (1998) werden die Proteine mittels 8 M Harnstofflösung aus der Matrix extrahiert und der Überstand nach Zentrifugation zur weiteren Analytik verwendet. Es ist dabei darauf zu achten, dass die Extraktionslösung nicht über 37 °C erhitzt werden darf. Bei höheren Temperaturen kann Harnstoff zu Isocyanat hydrolysieren, was zur Modifikation der Proteine führen kann.

#### **4.1.4 Extraktion mit Acetatpuffer**

Nach der Methode von HIROSE et al. (2004) wird das frisch homogenisierte Probenmaterial mit dem gleichen Volumen 0,1 M Acetatpuffer versetzt und diese Mischung über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand zur weiteren Untersuchung eingesetzt.

#### 4.1.5 Extraktion mit Tween 20

Tween 20 gehört zur Gruppe der nichtionischen Detergenzien. Seine Grundstruktur ist ein Polyoxyethylen mit Monolauratresten [HELENIUS et al. 1979; NEUGEBAUER 1988]. Diese Verbindung geht vor allem hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen mit anderen Molekülen ein und wird häufig zur Proteinextraktion aus Pflanzen verwendet, um Proteine aus Lipidkomplexen freizusetzen [FERNÁNDEZ et al. 1999].

### 4.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der in dieser Arbeit verwendeten Extrakte wird nach der Methode von BRADFORD (1976) unter Verwendung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G 250 bestimmt. Die Farbreaktion beruht darauf, dass sich die negativ geladenen Farbstoffmoleküle an die Aminogruppen der Proteine anlagern. Der daraus resultierende blau gefärbte Protein-Farbstoffkomplex kann bei 540 nm photometrisch vermessen werden. Die Messung erfolgt zwei Minuten nach Zugabe der Reagenzien. Die Nachweisgrenze liegt im Bereich von 0,05 µg/mL [READ & NORTHCOTE 1981]. Die Messung kann ohne weitere Aufarbeitung aus den Allergenextrakten durchgeführt werden. Die Quantifizierung des Proteingehaltes erfolgt mittels Kalibrierung mit Rinderserumalbumin (BSA) als Referenzprotein. Angesichts der unterschiedlichen Responsefaktoren verschiedener Proteine gewährleistet diese Methode keine absolute Quantifizierung, so dass die Proteingehalte nur relativ zueinander bestimmt werden können.

### 4.3 Gesamtstickstoffbestimmung

Die gemäß Anhang 8.1.3 nach den Amtlichen Sammlungen von Untersuchungsverfahren (ASU), § 64 LFGB (LEBENSMITTEL- UND FUTTERMITTEL-GESETZBUCH) in der Fassung vom 26 April 2006, ASU Nr. L 06.00-7 durchgeführte Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes ermöglicht die direkte Berechnung des Gesamtproteingehaltes des jeweiligen Probengutes. Aufgrund ihres Aufbaus aus einzelnen Aminosäuren schwankt der Stickstoffgehalt der Proteine nur in relativ engen Grenzen (15 - 18 %,  $\bar{\varnothing}$  16 %). Zur analytischen Erfassung des Proteingehaltes wird daher in der Regel der Stickstoffanteil (N) nach dem Aufschluss der organischen Substanz mit Schwefelsäure (Kjeldahl-Verfahren) bestimmt und anschließend unter Zuhilfenahme eines Faktors (für Ei F = 6,25) der Proteingehalt berechnet. Es wird angenommen, dass während des Aufschlusses das sich bei hohen Temperaturen bildende Schwefeltrioxid als Lewis-Säure an die NH-Gruppe der Peptidbindung (Lewis-Base) des Proteins anlagert und sich die entsprechende Amidosulfonsäure bildet. Diese ist beständig gegen weitere Oxidation und geht durch Zersetzung in Ammoniumsulfat über. Das Ammoniumsulfat kann anschließend nach Freisetzung des Ammoniaks und Destillation mittels Säure-Base-Titration erfasst werden.



## 4.4 Enzymallergosorbent-Test (EAST)

Der EAST ist eine enzymimmunologische Methode zur Bestimmung des Gehaltes an freien, spezifischen Antikörpern der Immunglobulinklasse E im Blutserum. Dieser Test ist eine Variante einer der wichtigsten In-vitro-Untersuchungsmethoden zur Diagnose von Lebensmittelallergien - des Radioallergosorbent-Testes (RAST). Die Allergene werden zunächst durch kovalente Bindungen an eine als Festphase dienende bromcyanaktivierte Cellulosescheibe gekoppelt. Adsorbierende Verbindungen werden durch Waschen entfernt. Verbleibende reaktive Bereiche werden mit Ethanolamin abgesättigt [CESKA & LUNDKVIST 1972].

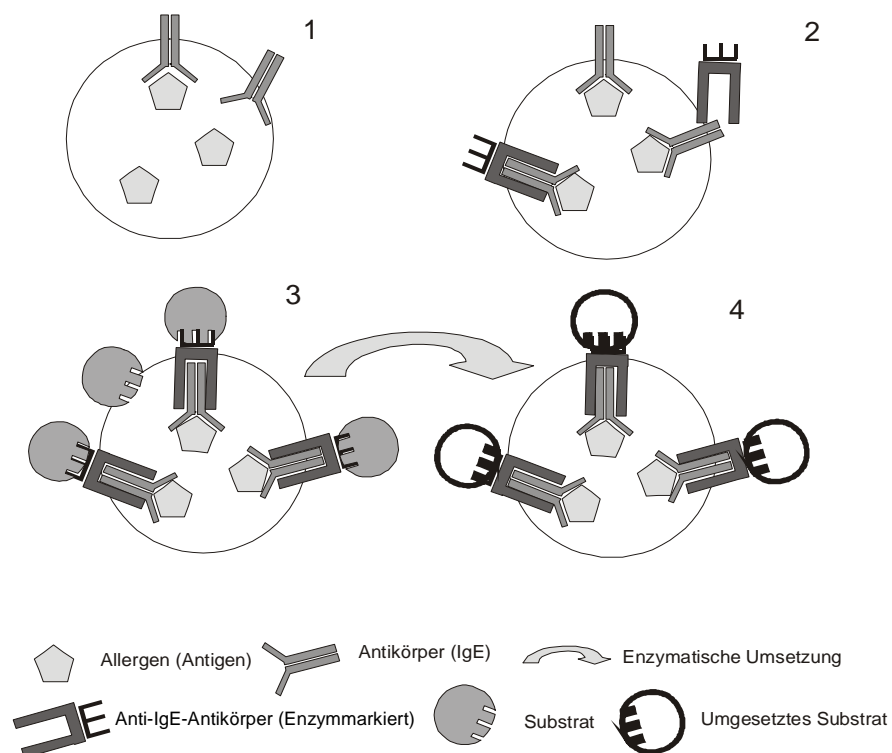


Bild 4.1: Prinzip des EAST [MOHRING 2000, modifiziert]

Es erfolgt die Inkubation der Cellulosescheiben mit den zu untersuchenden Patientenserum. Dabei wird eine Bindung zwischen den spezifischen IgE-Antikörpern und den festphasengebundenen Allergenen ausgebildet (1). Durch mit alkalischer Phosphatase (AP) enzymmarkierte Anti-IgE-Antikörper erfolgt die Markierung der gebundenen Antikörper (2). Durch die AP wird die enzymatische Umsetzung des farblosen Substrates p-Nitrophenylphosphat (PNPP) zum gelb gefärbten p-Nitrophenolat katalysiert, welches bei 405 nm photometrisch vermessen werden kann (3)/(4).

Tabelle 4.1: Einteilung der EAST-Klassen

IgE-Gehalt [U/mL]	EAST-Klasse
< 0,35	0
≥ 0,35 < 0,7	1
≥ 0,7 < 3,5	2
≥ 3,5 < 17,5	3
≥ 17,5 < 50	4
≥ 50	5

Über Referenzseren gegen Lieschgras mit bekanntem IgE-Gehalt - unter Verwendung der entsprechenden Lieschgras-Allergenscheiben - erfolgt die Einstufung der Patientenserum nach ihrem IgE-Gehalt in eine der in Tabelle 4.1 dargestellten EAST-Klassen. Die Ergebnisse werden in Units pro mL angegeben. 1 Unit entspricht 2,4 ng IgE [ALLERGOPHARMA 2005].

## 4.5 EAST-Inhibition

Die EAST-Inhibition stellt eine Variante des EAST dar. Es handelt sich dabei um einen kompetitiven Hemmtest, der eine relative Quantifizierung des allergenen Potenzials der eingesetzten Proteinextrakte ermöglicht. Als Abwandlung im Vergleich zum EAST wird vor der eigentlichen Messung eine Inkubation des Patientenserums mit dem auf seine allergene Potenz zu untersuchenden Extrakt (Inhibitorlösung) durchgeführt [VIETHS et al. 1993a; MÖLLER et al. 1997]. Es findet eine Konkurrenzreaktion zwischen den sich frei in Lösung befindlichen und den festphasengebundenen Allergenen um die aus dem Patientenserum stammenden spezifischen IgE statt. Je größer das Inhibitionsvermögen des jeweils eingesetzten Extraktes ist, desto stärker wird das Messsignal vermindert. Um die Konzentration des jeweiligen Proteinextraktes zu bestimmen, die zu einer 50 %igen Verminderung des Messsignals ( $C_{50}$ -Wert) führt, werden verschiedene Verdünnungen dieser Lösung eingesetzt. Anhand der  $C_{50}$ -Werte ist ein Vergleich der allergenen Potenz von verschiedenen Extrakten untereinander möglich. Der  $C_{50}$ -Wert der Inhibition mit dem nativen Extrakt, der ebenfalls an die Festphase gekoppelt ist, wird als homologe Inhibition bezeichnet und führt zu einer maximalen Verminderung des Messsignals. Die Auswertung erfolgt aus der Abhängigkeit der prozentualen Inhibition von der logarithmischen Proteinkonzentration der Inhibitorextrakte in Form einer logarithmischen Regression. Als Inhibitorlösungen dienen Extrakte von technologisch unterschiedlich behandeltem *Vollei zum Einsatz in Fertigprodukten* bzw. von *Volleipulver als Additiv in Brät zur Herstellung von Brühwürsten*.

## 4.6 Elektrophorese

Die Elektrophorese ist eine etablierte Methode zur Auftrennung von Proteinen nach unterschiedlichen Massen und/oder Ladungen. Sie basiert auf der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Gleichstromfeld in Richtung der Elektrode mit entgegengesetztem Vorzeichen. Die Trennschärfe wird dabei maßgeblich von der Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine beeinflusst. Diese ist abhängig von der Pufferzusammensetzung, der Temperatur, der Feldstärke und dem Trägermaterial. Die Einteilung der verschiedenen elektrophoretischen Methoden beruht auf dem jeweils verwendeten Trennprinzip [WESTERMEIER 1990].

#### 4.6.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine spezielle Variante der Elektrophorese, bei der Proteingemische gemäss LAEMMLI (1970) aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte getrennt werden. Die Eigenladungen der Proteine werden mit dem anionischen Detergenz SDS überdeckt und spielen so für die Elektrophorese keine Rolle mehr [GUTTMANN 1996]. Die zusätzliche Behandlung der Proteine mit 2-Mercaptoethanol führt durch Reduktion zur Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur. Dies führt nach Auffaltung der mit SDS beladenen Proteine zu einheitlichen Micellstrukturen. Die Trennung erfolgt in restriktiven Gelen mit geringer Porengröße. Es ergibt sich eine dem Molekulargewicht proportionale Wanderungsgeschwindigkeit der Proteinmicellen. Als Trennmedium werden Polyacrylamidgele eingesetzt. Dieses Polymer zeichnet sich durch eine hohe chemische Inertheit und mechanische Stabilität aus. Durch Copolymerisation von Acrylamid-Monomeren mit dem Vernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis) wird ein klares durchsichtiges Gel erhalten. Dieses zeichnet sich durch die hohe thermische und chemische Stabilität, das weitgehende Fehlen von Elektroosmose und Adhäsionsneigung sowie eine gute Reproduzierbarkeit der Darstellung aus. Die Porengröße wird durch den Totalacrylamidgehalt und den Vernetzungsgrad definiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich kommerziell erhältliche Fertiggele der Firma Invitrogen<sup>®</sup> vom Typ Novex<sup>®</sup> NuPage<sup>®</sup> Bis-Tris (Tris[hydroxymethyl]-aminomethan)-HCl mit einer Totalamidkonzentration von 4 - 12 % verwendet. Dies ermöglicht in Kombination mit einem 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)-SDS-Elektrodenpuffer eine Auftrennung der Proteine im Bereich zwischen 2,5 und 60 kDa. Die Zuordnung der Proteinbanden erfolgt nach Färbung visuell gegen den Molekulargewichtsmarker Mark12<sup>®</sup> des Herstellers Invitrogen<sup>®</sup> (Groningen, Niederlande) mit bekannter Proteinzusammensetzung (siehe Bild 8.1).

#### 4.6.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die IEF ermöglicht die Trennung nativer Proteinmoleküle anhand ihrer isoelektrischen Punkte (pI). Als Trennmedien werden Gele mit eingegossenen niedermolekularen Ampholyten verwendet. Nach Anlegen eines Gleichstromfeldes wandern diese Ampholyte bis zu ihren pI und bilden aufgrund ihrer Pufferwirkung einen stabilen pH-Gradienten im Gel aus. Bei Proteinen handelt es sich ebenfalls um Ampholyte. Je nach pH-Wert des umgebenden Mediums tragen die Moleküle unterschiedlich starke Ladungen, die sich beim pH-Wert des pI aufheben. Dadurch ist sowohl die Nettoladung als auch die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine am pI gleich Null und die Proteine werden an dieser Stelle im Gel fokussiert [WESTERMEIER 1990]. Die Zuordnung der Proteinbanden erfolgt nach Färbung visuell gegen einen pI-Marker des Herstellers Invitrogen<sup>®</sup> (Groningen, Niederlande) mit bekannter Proteinzusammensetzung (siehe Bild 8.2). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich kommerziell erhältliche IEF-Fertiggele der Firma Invitrogen<sup>®</sup> vom Typ Novex<sup>®</sup>-NuPage<sup>™</sup> mit den entsprechenden Kathoden- und Anodenpuffern verwendet.

### 4.6.3 Zweidimensionale (2D)-Elektrophorese

Die 2D-Elektrophorese stellt eine Kombination aus IEF und SDS-PAGE dar. Sie ist eine sehr leistungsfähige Trennmethode zur Separierung komplexer Proteingemische. Aufgrund der guten Trenneigenschaften eignet sie sich außerdem gut zur Proteinseparierung vor der MALDI-TOF-Massenspektrometrie (MS) Analytik [NATALE et al. 2004; LANNE & PANFILOV 2004]. Die Proteintrennung erfolgt in zwei voneinander unabhängigen Schritten. Im ersten Schritt werden die Proteine mittels IEF anhand ihrer pI getrennt und im Anschluss senkrecht zur IEF durch eine SDS-PAGE nach den Molekulargewichten. Die nach Anfärbung erhaltenen Proteinbanden werden wie bei den Einzeltechniken SDS-PAGE und IEF mit den Banden der zugehörigen Proteinmarker verglichen.

## 4.7 Semidry-blotting

Semidry-blotting ist der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Makromolekülen aus einem Trägergel auf eine immobilisierende Membran [TOWBIN & GORDON 1984]. Dazu werden zwischen zwei als Elektroden dienende Graphitplatten Tücher, die mit Elektrodenpuffer getränkt sind, das Elektrophoresegel sowie eine Blotmembran platziert. Die Übertragung der Proteine erfolgt unter Gleichstrom. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Nitrocellulose (NC)-Membranen verwendet. Ein effektiver und gleichmäßiger Transfer der Proteine auf eine NC-Membran wird durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems gewährleistet [KYHSE-ANDERSEN 1984; STOTT 1989]. Die Bindung der Proteine an die NC-Membran erfolgt nach AALBERSEE (2000) wahrscheinlich über hydrophobe Wechselwirkungen, wobei eine Renaturierung der Proteine nach dem Verlust des SDS der Elektrophorese angenommen wird. Nach dem Transfer können die Proteine weder diffundieren noch eluieren und sind - anders als im Gel - frei zugänglich für spezifische Reaktionen mit IgE-Antikörpern. Die Bindungskapazität einer Membran ist abhängig von ihrer Porengröße; je feiner die Porung, desto mehr Proteine können gebunden werden und eine Immobilisierung kleinerer Proteine wird ermöglicht [HANDMAN & JARVIS 1985].

## 4.8 Immunoblot (IB)

Nach STOTT (1989) wird der Proteintransfer auf eine immobilisierende Membran mit anschließender spezifischer immunochemischer Visualisierung der Allergene als Immunoblot bezeichnet. Mit Hilfe des IB kann eine Differenzierung zwischen allergenen und nicht-allergenen Proteinen vorgenommen werden.

Zur Vermeidung von unspezifischen Färbungen werden die nach dem Transfer frei bleibenden Bindungsstellen der NC-Membran mit Blockierlösung nach einer von SCHÜTTE et al. (2005) modifizierten Methode von VIETHS (1992b) abgesättigt (siehe 8.1.10).

Zur Erhöhung der Sensitivität der immunochemischen Detektion wird das in Bild 4.2 dargestellte, von VIETHS et al. (1992a) entwickelte Verstärkersystem verwendet, bei dem eine Nachweisgrenze von 0,5 ng Protein/mm<sup>2</sup> Membran erreicht wird.

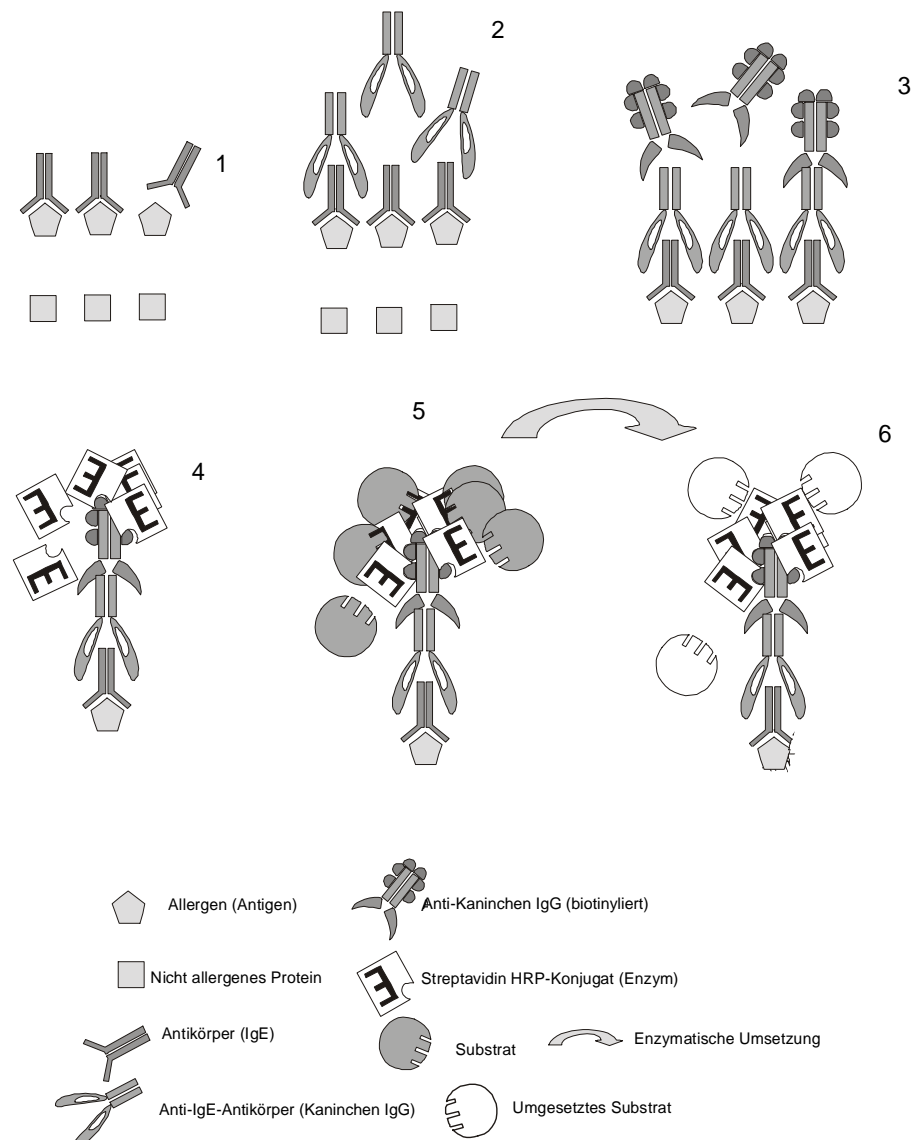


Bild 4.2: Prinzip des IB [MOHRING 2000, modifiziert]

An die immobilisierten Allergene werden spezifische IgE-Antikörper (IgE aus Humanseren, siehe 3.2) gebunden (1). Es folgt eine Inkubation mit Kaninchen Anti-Human-IgE (2) und biotinyliertem Anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege (3). Es folgt die Anlagerung eines Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugates (4). Die verstärkende Wirkung resultiert aus der mehrfachen Biotinylierung des IgG, wodurch mehrere Moleküle des Streptavidin-HRP-Konjugates gebunden werden können. Die Detektion der Allergene erfolgt über eine enzymatische Farbreaktion. Das farblose Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wird in Gegenwart von Diocetyl-natriumsulphosuccinat (DONS) und Wasserstoffperoxid infolge der katalytischen Wirkung der HRP zum blaugefärbten Radikalion umgesetzt (5 → 6). Diese Reaktion ist unter

Lichtausschluss durchzuführen. Durch Einwirkung von Licht erfolgt die Umsetzung zu einem gelbgefärbten 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimmoniumsalz [GALLATI & PRACHT 1985].

## 4.9 Unspezifische Färbungen

Mittels unspezifischer Färbungen werden sowohl allergene als auch nicht-allergene Proteine angefärbt. Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine im Polyacrylamidgel sowie auf NC-Membranen stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung.

### 4.9.1 Silberfärbung

Die Silberfärbung nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1986) ist eine sehr empfindliche Methode zur permanenten Färbung von Proteinen und Nucleinsäuren in Elektrophoresegelen mit einer Nachweisgrenze von 0,05 – 0,1 ng/mm<sup>2</sup>. Die Färbung resultiert aus der autokatalytischen Reduktion von den an die Proteine assoziierten Silberionen zu elementarem Silber (siehe Bild 4.3). Aufgrund des höheren Normalpotenzials der proteingebundenen Ionen im Vergleich zu den gelixierten Silberionen werden die proteinassoziierten Silberionen bevorzugt reduziert. Dies führt zu einer Dunkelfärbung der Proteinbanden.

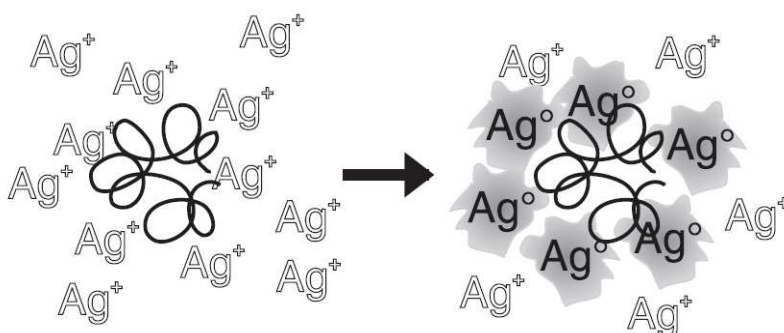


Bild 4.3: Prinzip der Silberfärbung [AMERSHAM BIOSCIENCES 1997]

Bei Bedarf kann das gefärbte Gel in einer glycerinhaltigen Lösung mehrere Tage konserviert werden. Da die Proteine bei der Silberfärbung irreversibel denaturiert und an die Gelmatrix gebunden werden, stehen sie nach der Färbung nur

begrenzt weiteren Untersuchungen zur Verfügung. Mit Farmerschem Abschwächer (wässrige Lösung von Kaliumhexacyanoferrat(III) und Natriumthiosulfat) kann die Färbung durch Oxidation zwar wieder rückgängig gemacht werden, jedoch können die denaturierten Proteine im Anschluss nur erneut unspezifisch gefärbt werden. Meistens resultiert daraus eine stärkere Hintergrundfärbung. Die Intensität der gefärbten Proteinbanden ist nicht proportional zur Proteinkonzentration.

### 4.9.2 Colloidale Coomassie-Brilliant-Blue (CBB)-Färbung

Die colloidale CBB-Färbung ist eine ebenso empfindliche Färbung wie die Silberfärbung nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1986). Ein Vorteil der colloidalen CBB-Färbemethode ist jedoch, dass die Anlagerung des Farbstoffes an die Proteine

quantitativ und ohne deren Denaturierung erfolgt. Eine Entfärbung der Proteinbanden ist ebenfalls möglich. Diese Methode kann somit im Bereich der Proteinisolierung zur Proteinfärbung vor MALDI-TOF/TOF-Messungen [LANNE & PANFILOV 2004; NATALE et al. 2004; NEUHOFF et al. 1988] eingesetzt werden.

### 4.9.3 Ponceau-Färbung

Bei der Ponceaufärbung handelte es sich um eine reversible Anfärbung der Proteine auf einer NC-Membran. Diese Färbung dient vor allem dazu, den erfolgreichen Proteintransfer von SDS-Gelen auf NC-Membranen nachzuweisen. Die Sensitivität liegt im Bereich von etwa 1 µg eines Proteins.

## 4.10 Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight<sup>2</sup> (MALDI-TOF/TOF)

Ein Ionisierungsverfahren für die Massenspektrometrie ist die Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation (MALDI). Diese Technik ermöglicht die Ionisierung von zwischen Matrixkristallen eingelagerten Peptiden oder Proteinen durch Laserbeschuss. Dabei wird die Energie eines Laserpulses von den Matrixmolekülen absorbiert und auf die Peptide übertragen. Die wesentlichen Vorteile der MALDI sind die beinahe ausschließliche Entstehung einfach geladener Ionen, die relativ hohe Toleranz gegenüber Verunreinigungen, z.B. mit Salzen oder Detergenzien, sowie die schnelle Identifizierung von Proben mit geringerer Komplexität. Die Molekulargewichte der erzeugten Molekülonen werden in der Regel mit einem Flugzeitanalysator (time of flight, TOF) ermittelt.

Zur MALDI-TOF-Analyse werden die zuvor mit CBB (siehe 4.9.2) gefärbten Proteinspots eines 2D-Elektrophoresegels (siehe 4.6.3) mit einem Spot-Cutter ausgeschnitten. Für die Identifizierung werden die in den Gelstücken enthaltenen Proteine verdaut und anschließend aus dem Gel extrahiert. Der Verdau erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch das Enzym Trypsin, das Proteine an den Aminosäuren Arginin und Lysin schneidet, so dass definierte Peptide entstehen. Die Peptide werden auf einem Probenträger in das MALDI-TOF eingebracht, um das Molekulargewicht der Peptide - den sogenannten „Peptide Mass Fingerprint“ (PMF) - zu vermessen. Durch den Vergleich der experimentell bestimmten Peptidmassen mit Peptidmassen aus Datenbanken kann das ursprüngliche Protein identifiziert werden. Im Gegensatz zum MALDI-TOF können neben dem PMF mit einem MALDI-TOF/TOF außerdem MS/MS-Spektren ausgewählter Peptide aufgenommen werden. Diese Zusatzinformation erhöht die Genauigkeit der Identifizierung der Proteine. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten die MALDI-TOF/TOF-Messungen in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Molekulare Neurobiologie in Göttingen mit dem Ultraflex der Firma Bruker Daltonik (Bremen, Deutschland). Die Identifizierung des Proteins erfolgte durch Datenbankrecherche (Mascot, Matrix Science).





## 5 Ergebnisse

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden die Ergebnisse der Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit zur Detektion von Allergenen verwendeten Humansenen von Hühnereiallergikern vorgestellt. Der zweite Abschnitt befasst sich mit der Analytik der Extraktion von Proteinen aus dem Vollei zur Beurteilung der am besten geeigneten Methode zur Allergenisolierung. Diese Ergebnisse stellen wichtige Voraussetzungen für die darauf folgenden Untersuchungen der allergenen Potenziale der technologisch veränderten Proben *Vollei zum Einsatz in Fertigprodukten* und *Volleipulver als Additiv in Brät zur Herstellung von Brühwürsten* dar.

### 5.1 Charakterisierung der Patientenserren

In Zusammenarbeit mit der Technischen Universität München (Abteilung für Dermatologie und Allergologie), dem Universitätshospital Zürich (Allergiestation, Dermatologische Klinik), dem Macedonio Melloni Hospital Mailand (Abteilung für Pädiatrie) und der Universität Wien (Abteilung für Pädiatrie und Juvenile Medizin) wurden Seren aus dem Blut von insgesamt 95 Patienten mit Verdacht auf Hühnereiallergie - wie unter 8.1.14 beschrieben - gewonnen.

Diese Seren wurden zur Charakterisierung zunächst einer EAST-Untersuchung (siehe 4.4) unterzogen, um den Gehalt an spezifischen IgE zu bestimmen und die Einstufung in EAST-Klassen (vgl. Tabelle 4.1) vorzunehmen. Anschließend erfolgte eine Charakterisierung der Einzeleren mittels Immunoblot.

#### 5.1.1 Charakterisierung mittels EAST

Die Ergebnisse der EAST-Untersuchungen sind im Anhang unter 8.2.1 wiedergegeben. Tabelle 8.1 ist zu entnehmen, dass 20 der untersuchten Seren einen IgE-Gehalt von  $\geq 0,7$  U/mL aufweisen und somit in eine EAST-Klasse zwischen 2 und 5 eingeteilt werden können, während alle weiteren Seren einen geringeren IgE-Gehalt von  $< 0,7$  U/mL aufweisen.

#### 5.1.2 Charakterisierung mittels Immunoblot

Zur weiteren Charakterisierung wurde ein PBS-Extrakt (siehe 4.1.2) eines homogenisierten Volleies (Proteingehalt: 150  $\mu\text{g/mL}$ ) elektrophoretisch mittels SDS-PAGE getrennt. Dafür wurde ein 4 – 12 %iges Bis-Tris-Elektrophoreseigel mit einem Probenslot verwendet, der sich über die gesamte Breite des Gels erstreckt. Aufgegeben wurden 200  $\mu\text{L}$  des Extraktes. Nach anschließendem Transfer der getrennten Proteine auf eine NC-Membran wurde diese in Streifen (4 mm breit) geschnitten. Jeder dieser NC-Streifen wurde unter Verwendung eines der 20 Einzeleren mit EAST-Klassen  $\geq 2$

immungefärbt. Um unspezifische Bindungen ausschließen zu können, erfolgte zudem eine Inkubation eines NC-Streifens mit dem Serum eines Nicht-Allergikers (EAST-Klasse = 0) als Negativkontrolle (N). In Bild 5.1 sind die mit den jeweiligen Einzelseren immungefärbten NC-Streifen dargestellt. Der mit P gekennzeichnete NC-Streifen wurde als Positivkontrolle unspezifisch mit Ponceau gefärbt.

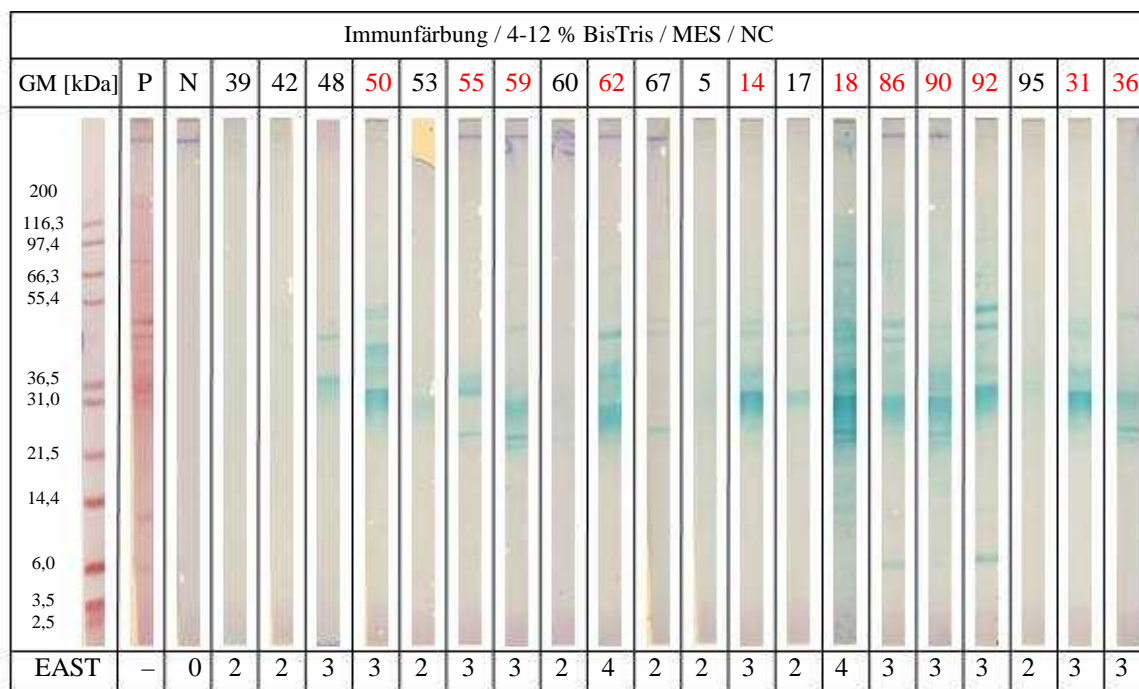


Bild 5.1: Immunoblot von Vollei unter Verwendung der Einzelseren (P = Positivkontrolle, N = Negativkontrolle, rote Kennzeichnung = im Pool verwendete Einzelseren)

Tabelle 5.1 gibt Aufschluss über das Vorkommen und die Intensität der Allergenbanden der Einzelseren im Immunoblot. Bild 8.1 zeigt den in dieser Arbeit verwendeten Proteinmarker der Firma Invitrogen, mit dessen Hilfe die Massen den jeweiligen Proteinbanden zugeordnet wurden. Außerdem erfolgte eine Absicherung dieser Zuordnung durch den Vergleich mit Proteinstandards (siehe 3.3) welche ebenfalls einer SDS-PAGE unterzogen wurden (siehe Bild 8.3).

Lediglich die Seren mit den Nummern 39 und 42 wiesen keine gefärbten Banden der Volleiallergene auf. Mit allen weiteren der 20 getesteten Seren konnte mindestens eine Allergenbande detektiert werden. Die meisten Seren wiesen spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene im Molekulargewicht (MG)-Bereich von Ovalbumin (45 kDa, 80 %) und Ovomuroid (30 - 43 kDa, 80 %) auf. Ovomuroid hat zwar eine Masse von 28 kDa, wird aber aufgrund des relativ großen Kohlenhydratanteils im Elektrophoresegel zurückgehalten und kann in einer diffusen Bande bei 30 - 43 kDa detektiert werden [BERNHISEL-BROADBENT et al. 1994]. Im Bereich von Conalbumin (77 kDa) zeigten 60 % der Seren eine spezifische Bandenfärbung und im Bereich von Lysozym (14 kDa) 15 %.

Tabelle 5.1: Allergenbanden der Einzelseren im Immunoblot

Allergen- Bande	Einzelseren																				Anteil [%]			
	[kDa]	P	N	39	42	48	50	53	55	59	60	62	67	5	14	17	18	86	90	92		95	31	36
≥ 80	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	(+)	+	-	+	-	+++	++	+	+++	-	(+)	+	50	
77	+	-	-	-	+	(+)	-	-	+	-	++	+	-	++	+	++	++	+	+++	-	+	-	60	
45	+++	-	-	-	++	+	(+)	++	(+)	-	++	-	(+)	++	(+)	+++	+	++	+	(+)	++	(+)	80	
30-43	++	-	-	-	(+)	++	(+)	-	++	(+)	++	(+)	-	+++	++	+++	++	++	++	++	(+)	++	++	80
35	(-)	-	-	-	-	-	-	++	++	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	++	35
32	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	20
14	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	15
9	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	10

(+) : sehr schwach sichtbar      ++ : gut sichtbar      - : keine Bande  
 + : schwach sichtbar      +++ : sehr gut sichtbar

Weitere Allergenbanden konnten mit den Einzelseren im Bereich von  $\geq 80$  kDa (50 %), 35 kDa (35 %), 32 kDa (20 %) und 9 kDa (10 %) detektiert werden.

Tabelle 5.2: Zusammensetzung des Poolserums

Serum-Nr.	mL im Pool
50	1,75
55	1,00
59	0,75
62	2,00
14	2,00
18	25,00
86	2,00
90	0,70
92	2,00
31	5,75
36	5,75
Gesamt	48,70

Unspezifische Bindungen konnten durch die Inkubation mit dem Serum eines Nicht-Allergikers (N = Negativkontrolle) ausgeschlossen werden, wobei keine Banden visualisiert wurden.

Die in Tabelle 5.1 rot markierten Seren wurden als ausreichend detektionsstark beurteilt und - wie in Tabelle 5.2 dargestellt - gepoolt. Bild 8.3 zeigt den Immunoblot des Serenpools. Dieser wurde dazu in einer Verdünnung von 1:5 verwendet. Es konnten mit Hilfe des Poolserums alle vier für diese Arbeit relevanten Hauptallergene in ausreichender Intensität detektiert werden.

## 5.2 Proteinextraktionen

Die im Methodenteil dieser Arbeit unter 4.1.1 bis 4.1.5 dargestellten Extraktionsmethoden unterscheiden sich in den eingesetzten Puffern und Lösungen, in der Art und Dauer der Extraktion, in teilweise durchgeführter Dialyse und der verwendeten Parameter bei der Zentrifugation oder Filtration der Extrakte. Im Folgenden wurde die Anwendbarkeit dieser Extraktionen auf die Eiallergenanalytik untersucht. Dazu wurden die Proteingehalte sowie die relativen allergenen Potenziale der verschiedenen Extrakte vermessen.

### 5.2.1 Quantifizierung des Proteingehaltes der Extrakte

Für einen Test zur Anwendbarkeit der Extraktionsmittel für die Eiallergenanalytik wurden diese unter gleichen Bedingungen eingesetzt, um die Proteine aus frisch homogenisiertem Vollei zu extrahieren. Vollei und Extraktionsmittel wurden dabei im Verhältnis 1:10 (v/v) verwendet. In einer Dreifachbestimmung wurden jeweils 2,5 mL des homogenisierten Volleies mit Hilfe einer Eppendorfpipette in ein 50 mL Nunc<sup>TM</sup>-Extraktionsröhrchen eingewogen und mit dem entsprechenden Extraktionsmittel ad 25 mL aufgefüllt. Die genaue Durchführung ist im Anhang unter 8.1.1 dargestellt. Zum Vergleich wurde außerdem mit bidestilliertem (bidest.) Wasser extrahiert. Um eine Aussage über die Vollständigkeit der Extraktionen treffen zu können, wurde der jeweils bei der Zentrifugation erhaltene Rückstand erneut mit demselben Gesamtvolumen extrahiert wie bei der ersten Extraktion. Die erhaltenen relativen Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Methode nach BRADFORD (1976) (siehe 8.1.2) ermittelt. Als Kontrolle wurde eine Lösung von Vollei in Wasser hergestellt und ohne vorherige Extraktion der relative Proteingehalt mittels der Methode nach BRADFORD (1976) und der absolute Proteingehalt mit der Methode nach § 64 LFGB, ASU Nr. L 06.00-7 [LEBENSMITTEL- UND FUTTERMITTELGESETZBUCH 2006] (siehe 4.3) bestimmt. Die genaue Durchführung ist im Anhang unter 8.1.3 dargestellt, Messwerte und Berechnungen befinden sich unter 8.3.1. Der ermittelte Proteingehalt der Kontrolle von 110,71 mg/g liegt innerhalb der in der Literatur [SOUCI et al. 1991] angegebenen Spanne des Proteingehaltes von Vollei (106 - 124 mg/g). Somit wird im Folgenden (siehe Bild 5.2) der relative - mit der Methode nach BRADFORD (1976) bestimmte - Proteingehalt des Kontrollwertes als 100 % bezeichnet und alle weiteren relativen Proteingehalte der Extrakte darauf bezogen.

Tabelle 5.3 zeigt die mit der Methode nach BRADFORD (1976) bestimmten gemittelten relativen Proteingehalte der Extrakte pro Gramm Vollei. Die genauen Einwaagen sowie gemessene Einzelwerte und die Berechnungen der Proteingehalte und Variationskoeffizienten sind im Anhang unter 8.3.1 (Tabelle 8.2a/b) dargestellt. Nach DIN 53804 (Ausreißertest nach Dixon) ergeben sich für die Messwerte der jeweiligen Dreifachbestimmungen keine Ausreißer.

Tabelle 5.3: Proteinextraktionen

Nr.	Extraktionsmittel	Proteingehalt		Gesamtproteingehalt [mg/g]
		1. Extraktion [mg/g]	2. Extraktion [mg/g]	
1	PBS	28,88	1,80	30,68 (75,90 %)
2	bidest. Wasser	23,87	2,58	26,45 (65,43 %)
3	0,15 M NaCl-Lösung	27,85	1,56	29,41 (72,78 %)
4	8 M Harnstofflösung	57,59	3,37	60,96 (155,77 %)
5	0,1 M Acetatpuffer pH 3,8	23,18	2,47	25,65 (63,47 %)
6	0,2 % Tween 20-Lösung	27,99	1,77	29,76 (73,63 %)
7	Kontrolle	-	-	40,42 (100,00 %)

Mit deutlich mehr als 100 % (in Bezug auf den Kontrollwert) ist der gemessene Proteingehalt des 8 M Harnstoffextraktes unrealistisch hoch (siehe Tabelle 5.3). Dieses Ergebnis wird unter 6.2 näher diskutiert.

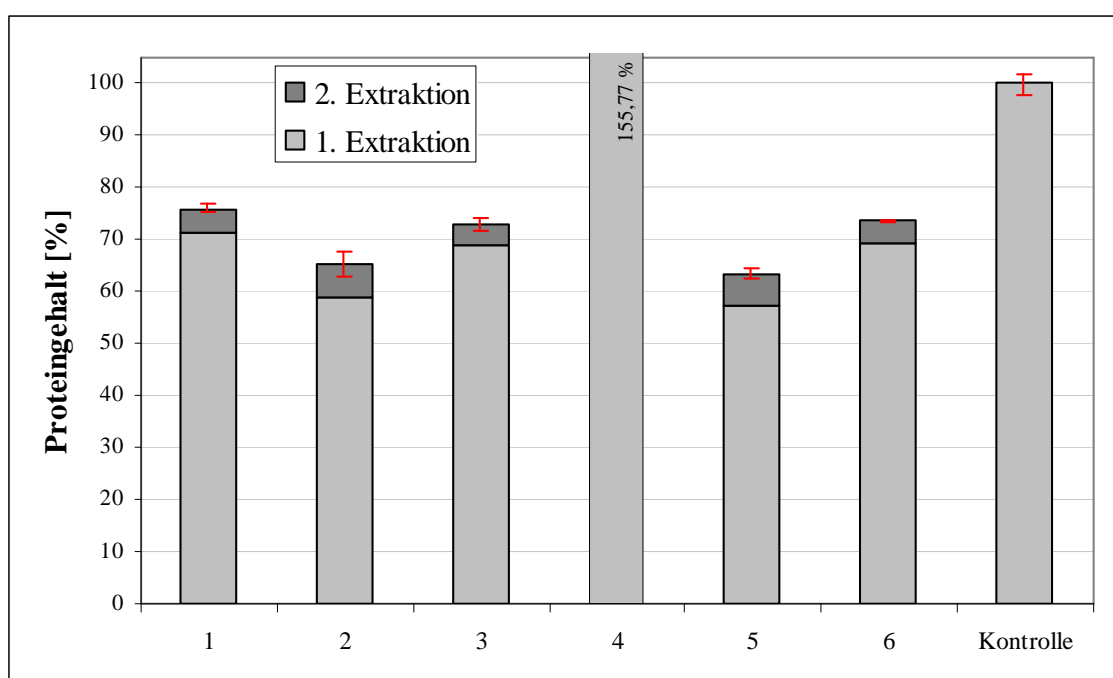


Bild 5.2: Proteingehalte der Extrakte im Vergleich zum Kontrollwert

Alle weiteren Vollei-Proteinextrakte liefern Proteingehalte von weniger als 100 % bezogen auf den Kontrollwert. Der höchste Proteingehalt - mit durchschnittlich 75,9 % - ergibt sich nach der Extraktion mit PBS. Nach DIN 55303 (Vergleich von zwei Mittelwerten) ist der mittlere Proteingehalt der PBS-Extrakte signifikant höher als der der Tween 20-Extrakte mit dem zweithöchsten Proteingehalt. Der geringste Proteingehalt wurde - mit durchschnittlich 63,5 % des Kontrollwertes - durch Extraktion mit 0,1 M Acetatpuffer (pH = 3,8) erzielt.

## 5.2.2 Quantifizierung des relativen allergenen Potenzials der Proteinextrakte

Für die Beurteilung der Anwendbarkeit der sechs verschiedenen Extraktionsmethoden ist es von Bedeutung, dass die Proteine des Hühnereies nicht nur quantitativ extrahiert werden, sondern auch, dass sichergestellt ist, dass diese während der Extraktion nicht in ihrem allergenen Potenzial verändert werden. Eine Methode zur Quantifizierung des relativen allergenen Potenzials eines Proteinextraktes ist die EAST-Inhibition (siehe 4.5). Diese wurde eingesetzt, um die allergenen Potenziale der verschiedenen Extrakte mit dem des Kontrollwertes vergleichen zu können. Die Durchführung der EAST-Inhibition ist im Anhang unter 8.1.5 dargestellt.

Bild 5.3 zeigt die Inhibitionskurven der Extraktionslösungen und der Kontrolle. Die Messwerte und Berechnungen sind im Anhang unter 8.3.2 (Tabelle 8.4a/b) dargestellt. Bei dieser Auswertung wurden alle Inhibitionen auf die Konzentration des jeweiligen Verdünnungsschrittes des Kontrollwertes bezogen, um eventuell vorhandene matrixbedingte Fehler bei der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) zu eliminieren. Je höher der  $C_{50}$ -Wert einer Inhibitionskurve ist, desto geringer ist das allergene Potenzial eines Proteinextraktes (siehe 4.5).

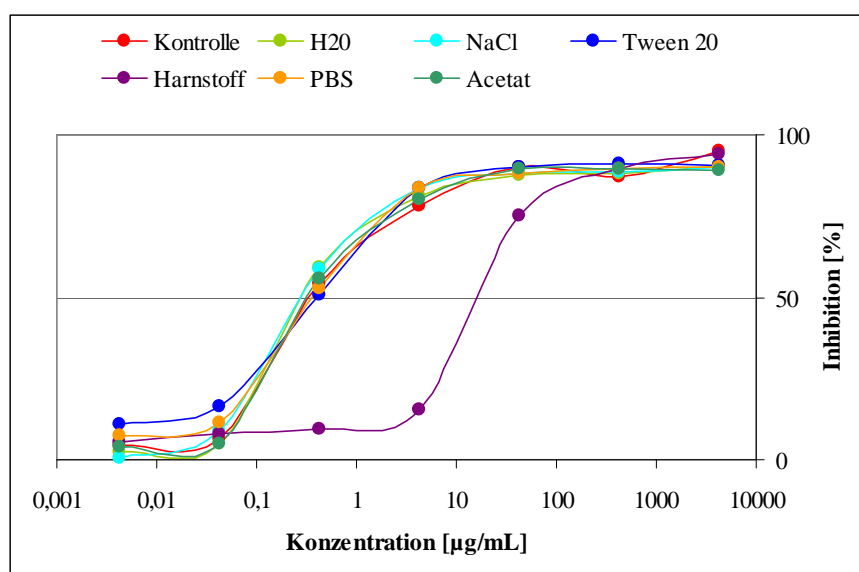


Tabelle 5.4:  
 $C_{50}$ -Werte der EAST-Inhibition der Extraktionen des Volleies

Nr.	$C_{50}$ -Wert [µg/mL]
Kontrolle	0,4
H <sub>2</sub> O	0,4
NaCl	0,4
Tween 20	0,4
Harnstoff	26,3
PBS	0,4
Acetat	0,4

Bild 5.3: EAST-Inhibition der Extraktionslösungen und des Kontrollwertes

Der  $C_{50}$ -Wert der Inhibitionskurve von Harnstoff beträgt 26,3 µg/mL. Die  $C_{50}$ -Werte aller anderen Inhibitionskurven - einschließlich der des Kontrollwertes - liegen bei 0,4 µg/mL (siehe Tabelle 5.4). Somit ist das allergene Potenzial des Harnstoffextraktes im Vergleich zur Kontrolle um mehr als das 65fache verringert, während die allergenen Potenziale aller anderen Extraktionen mit dem allergenen Potenzial der Kontrolle übereinstimmen. Die 8 M Harnstofflösung wird aufgrund der Verringerung des allergenen Potenzials von Vollei als Extraktionsmittel als weniger gut geeignet beurteilt als alle anderen der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Extraktionsmittel.

Aufgrund der Ergebnisse wurde im Folgenden im Rahmen dieser Arbeit PBS (siehe 8.1.1) zur Proteinextraktion verwendet.

### **5.3 Technologisch verändertes Vollei zum Einsatz in Fertigprodukten**

Im Folgenden wurde das allergene Potenzial der unter 3.1.1 dargestellten technologisch veränderten Volleiprobe untersucht und mit dem allergenen Potenzial der nicht veränderten Ausgangsprobe verglichen. Dazu wurden während des technologischen Prozesses Proben von insgesamt neun Prozessstufen gezogen, mit PBS extrahiert und analysiert. Dies geschah, um Veränderungen des allergenen Potenzials während der Prozessführung zu analysieren.

Die Extrakte wurden zur Bestimmung des Proteinmusters mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung visualisiert. Zur Bestimmung des Allergenmusters wurden die Proteine auf eine NC-Membran transferiert und die Allergene spezifisch mit Hilfe des unter 5.1 beschriebenen Serenpools immungefärbt. Zur weiteren Bestimmung des relativen allergenen Potenzials wurden die Probenextrakte einer EAST-Inhibition unterzogen. Des Weiteren erfolgte von den Prozessstufen, bei denen sich mittels Immunoblot eine deutliche Veränderung der Allergene zeigte, eine Charakterisierung dieser mittels 2D-Elektrophorese und MALDI-TOF/TOF-Analyse.

#### **5.3.1 Charakterisierung der Prozessstufen mittels SDS-PAGE**

Anhand der in Bild 5.4 dargestellten SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung der Prozessstufen des Volleies werden deutliche Veränderungen im Proteinspektrum während der technologischen Verarbeitung sichtbar.

Probe Nr. 1 – das pasteurisierte Flüssigei – weist deutliche Banden der vier Proteine Conalbumin, Ovalbumin, Ovomuroid und Lysozym sowie Banden zahlreicher weiterer Eiweiße auf (vgl. 2.5 und Bild 8.3). Obwohl Ovomuroid und Ovalbumin verschiedene Molekulargewichte aufweisen, können sie aufgrund des hohen Kohlenhydratanteils von Ovomuroid mittels SDS-PAGE nicht komplett voneinander getrennt werden [BERNHISEL-BROADBENT et al. 1994].

Nach 10minütigem Erhitzen unter Rühren zeigen sich mit der Silberfärbung bei Probe Nr. 2 keine deutlichen Unterschiede zu Probe Nr. 1. Lediglich die Bande von Lysozym ist durch die Erhitzung abgeschwächt.

Die Proben Nr. 3 und 4 - welche zusätzlich eine Stunde bzw. zwei Stunden unter Rühren erhitzt und einer Proteolyse unterzogen wurden – weisen in der Silberfärbung bereits eindeutige Unterschiede zu den zuvor beschriebenen Proben auf. Die bei den Proben Nr. 1 und 2 detektierten Banden in einem Massenbereich von etwa > 200, 120, 100 und 60 kDa können für die Proben Nr. 3 und 4 nicht mehr detektiert werden.

Hierbei handelt es sich um Nebenallergene des Hühnereies. Neue Banden treten bei beiden Proben (Nr. 3 und 4) in den Bereichen von etwa 6, 10, 16, 22, 36, 97 und 116 kDa auf. Die Bande im Massenbereich von etwa 25 kDa zeigt in den Proben Nr. 3 und 4 eine deutlich stärkere Silberfärbung als in den Proben Nr. 1 und 2. Die Bande im Massenbereich von Ovomuroid (30 - 43 kDa) wird in den Proben Nr. 3 und 4 teilweise von einer während der Proteolyse auftretenden neuen Bande bei etwa 36 kDa überdeckt.

Protein (MG [kDa])	Prozessstufen Vollei									Marker	MG [kDa]
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Conalbumin (77)											200
											116,3
											97,4
											66,3
Ovalbumin (45) Ovomucoid (28)											55,4
											36,5
											31,0
Lysozym (14)											21,5
											14,4
											6,0
											3,5
										2,5	
Novex® 4-12 % Bis-Tris-Gel (Silberfärbung)										Invitrogen® Mark12 (Silberfärbung)	

Bild 5.4: SDS-PAGE und Silberfärbung der Prozessstufen des Volleies

Probe Nr. 5 – welche zusätzlich einer erneuten 10minütigen Erhitzung unterzogen wurde – weist im Gegensatz zu den vorherigen Proben weitaus weniger Proteinbanden auf. Die Bande im Massenbereich des Hauptproteins Lysozym kann hier nicht mehr detektiert werden. In den Massenbereichen der anderen drei Hauptproteine werden – wenn auch mit geringerer Intensität als bei den zuvor beschriebenen Proben – noch Proteinbanden detektiert. Eine neue diffuse Bande tritt im Massenbereich von etwa 15 bis 21 kDa auf.

Die Proben mit den Nummern 6 und 7 weisen nach der Silberfärbung Proteinbanden in den gleichen Massenbereichen auf wie Probe Nr. 5. Allerdings sind die Farbintensitäten hier – mit Ausnahme der Bande im Massenbereich von etwa 40 kDa – bei den Proben Nr. 6 und 7 geringer.

Die Proben Nr. 8 und 9 – welche zu Beginn und nach Beendigung einer 30minütigen Erhitzung unter Rühren gezogen wurden – weisen mit Silberfärbung lediglich schwach detektierbare diffuse Banden im Massenbereich von Ovalbumin und Ovomuroid und im Bereich von etwa 14 bis 19 kDa auf.



Bild 5.5 zeigt die Immunfärbung der Allergene in den Prozessstufen des Volleies mit dem Humanserenpool.

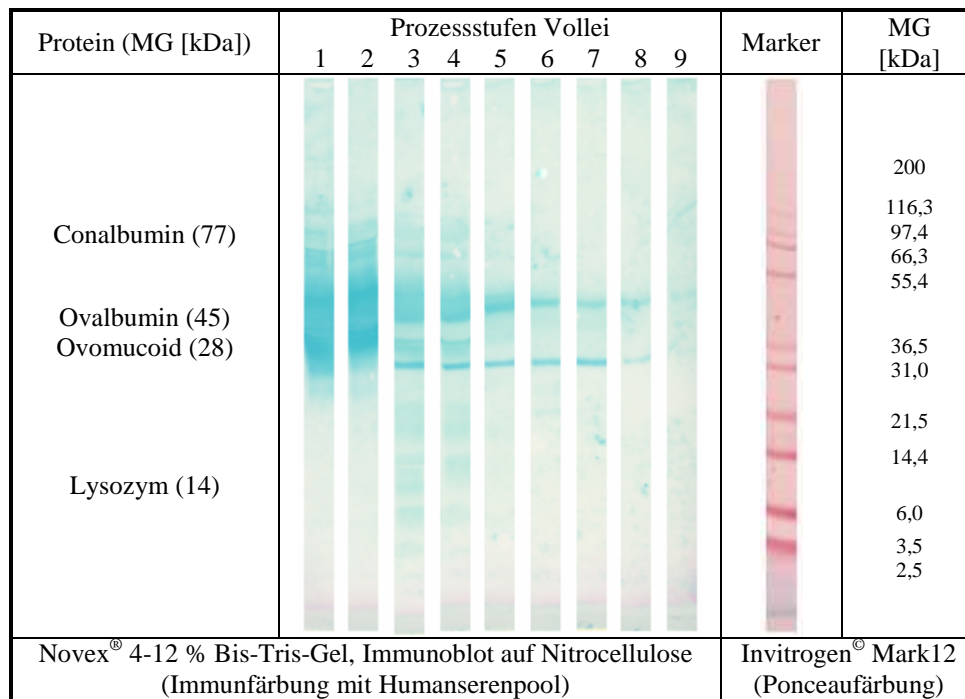


Bild 5.5: Westernblot und Immunfärbung mit Humanserenpool der Prozessstufen des Volleies

In dem Massenbereich von Lysozym konnte – im Gegensatz zu der Silberfärbung - in diesen Proben keine Bande detektiert werden. In den Proben Nr. 1 und 2 ist die Färbung der Allergene im Bereich von etwa 30 bis 65 kDa so intensiv, dass kaum eine Differenzierung in Einzelbanden erfolgen kann. Eine davon abgegrenzte diffuse Allergenbande tritt bei beiden Proben im Bereich von Conalbumin (77 kDa) auf. Die Intensität dieser Bande nimmt in den Proben Nr. 3 und 4 ab und ist in Probe Nr. 5 kaum zu detektieren.

Ähnlich verhält es sich mit der Bande im Massenbereich von Ovalbumin (45 kDa). Diese Bande nimmt in der Intensität ihrer Färbung während des Prozesses stetig ab, kann aber – genau wie mit der Silberfärbung - auch in der Probe Nr. 9 noch schwach detektiert werden.

Eine neue relativ konkrete Allergenbande tritt in den Proben Nr. 3 bis 9 im Massenbereich von 31 kDa auf. Die Intensität dieser Bande nimmt im Verlaufe des Prozesses erst in der Probe Nr. 8 ab und kann bereits in Probe Nr. 9 kaum detektiert werden. Mit der Silberfärbung konnte diese Bande nicht eindeutig detektiert werden.

Im Massenbereich < 30 kDa treten – ähnlich wie im Silbergel - in den Proben Nr. 3 und 4 mehrere relativ schwach detektierbare diffuse Banden auf.

### 5.3.2 Bestimmung des relativen allergenen Potenzials mittels EAST-Inhibition

In Bild 5.6 sind die Inhibitionskurven der Prozessstufen des Volleies dargestellt. Die Messwerte und Berechnungen sind im Anhang unter 8.4 dargestellt. Der höchste eingesetzte – mit Hilfe der Methode nach BRADFORD (1976) bestimmte – Proteingehalt der Homologen (Probe Nr. 1) beträgt 4647 µg/mL. Diese Proteinlösung wurde zur Erstellung der Inhibitionskurve – wie unter 8.1.5 beschrieben - in sechs (bzw. fünf) weiteren Verdünnungsstufen eingesetzt. Da es sich bei allen anderen Prozessstufen um dieselbe Ausgangssubstanz (aber unterschiedlich technologisch verarbeitet) handelt, wurde dieser Proteingehalt (sowie dessen Verdünnungsstufen) auch auf alle weiteren Prozessstufen bezogen.

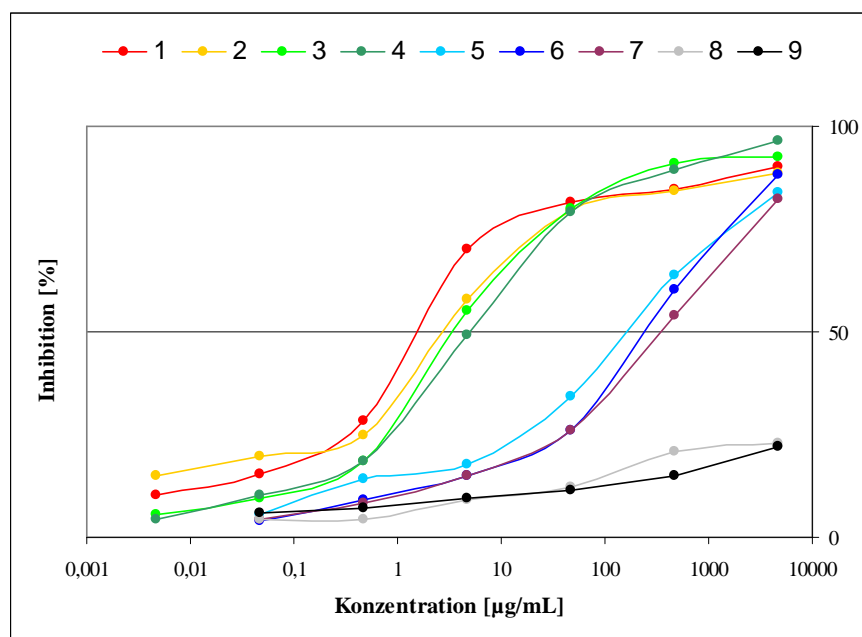


Tabelle 5.5:  
C<sub>50</sub>-Werte der EAST-Inhibition der Prozessstufen des Volleies

Nr.	C <sub>50</sub> -Wert [µg/mL]
1	2,6
2	3,7
3	4,0
4	5,9
5	270
6	340
7	403
8	nicht erreicht
9	nicht erreicht

Bild 5.6: EAST-Inhibition der Prozessstufen des Volleies

In Tabelle 5.5 sind die C<sub>50</sub>-Werte der Inhibitionskurven wiedergegeben. Je höher der C<sub>50</sub>-Wert einer Inhibitionskurve ist (siehe 4.5), desto geringer ist das allergene Potenzial eines Proteinextraktes.

Von Probe Nr. 1 bis 4 steigt der C<sub>50</sub>-Wert stetig aber relativ gering an. Ein vergleichsweise großer Sprung in der Abnahme des allergenen Potenzials (bzw. Zunahme des C<sub>50</sub>-Wertes) der Extrakte tritt - mit etwa dem 100fachen des Ausgangswertes - bei Probe Nr. 5 auf. Ein weiterer Anstieg der C<sub>50</sub>-Werte erfolgt von Probe Nr. 5 bis 7. Probe Nr. 8 und 9 erreichen innerhalb des Messbereiches keinen C<sub>50</sub>-Wert und weisen somit im Vergleich zu allen anderen Prozessstufen eindeutig die geringsten allergenen Potenziale auf.

### 5.3.3 Untersuchungen mittels MALDI-TOF/TOF

Als Folge der technologischen Behandlung des Volleies zeigte sich sowohl mittels Immunoblot (Bild 5.5) als auch mit Hilfe der Methode der EAST-Inhibition (5.3.2) eine eindeutige Reduzierung des allergenen Potenzials der Probe. Da aber mit beiden Methoden auch in der letzten Prozessstufe (Probe Nr. 9) ein allergenes Restpotenzial nachgewiesen werden kann, wurden im Folgenden zur Charakterisierung dieser potenziell allergenen Proteine bzw. Proteinbruchstücke MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen durchgeführt und mit denen der Ausgangsprobe (Nr. 1) verglichen. Außerdem erfolgten MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen mit der Probe Nr. 3, da sich während des technologischen Prozesses hier mit Hilfe des Immunoblots zahlreiche neue potenziell allergene Proteinbruchstücke detektieren ließen.

Dazu wurden die Proteinextrakte vor den MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen mittels 2D-Elektrophorese (siehe 8.1.8) aufgetrennt. Zur Visualisierung der Proteinspots im SDS-PAGE-Gel werden in der Literatur geeignete Methoden beschrieben (siehe 8.1.12), welche im Folgenden zunächst auf ihre Anwendbarkeit für die MALDI-TOF/TOF-Analyse von Hühnereiproteinen getestet und miteinander verglichen und optimiert wurden.

#### *Optimierung der Visualisierung von Proteinen im SDS-PAGE-Gel zur MALDI-TOF/TOF-Analyse*

Zur Visualisierung der zuvor im SDS-PAGE-Gel getrennten Proteine wurden zunächst zwei Färbemethoden mit colloidalem Coomassie-Brilliant Blue G-250 auf ihre Anwendbarkeit für Eiweiße getestet. Dazu wurden verschiedene Volumina einer Eiweißlösung (20, 15, 10 und 5  $\mu\text{L}$  der Kontrolle 1 aus 5.2) mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

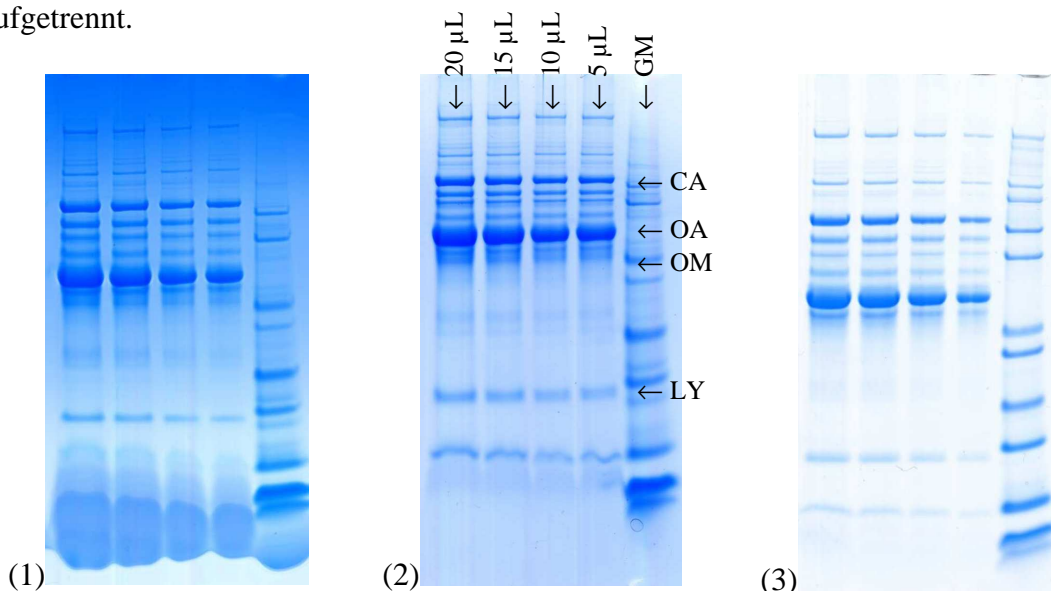


Bild 5.7: Visualisierung von Eiweißen: (1) Methode nach NEUHOFF et al. (1988), (2) Methode nach LANNE & PANFILOV (2004), (3) Methode nach NEUHOFF et al. (1988) mit zweitem Fixierschritt nach LANNE & PANFILOV (2004)

Bild 5.7 (1) zeigt die Ergebnisse der Visualisierungen der Proteine mit der Färbemethode nach NEUHOFF et al. (1988) und (2) nach LANNE und PANFILOV (2004).

Die Durchführungen dieser Färbemethoden sind im Anhang unter 8.1.12 dargestellt. Bild 8.1 zeigt den in dieser Arbeit verwendeten Proteinmarker der Firma Invitrogen, mit dessen Hilfe die Massen den jeweiligen Proteinbanden zugeordnet wurden. Der Vergleich der Ergebnisse der beiden Färbemethoden zeigt, dass mit beiden Methoden die Banden der vier Hauptproteine deutlich gefärbt werden konnten. Allerdings treten in beiden Fällen deutliche Hintergrundfärbungen auf, welche bei der Detektion von Spots mit relativ geringen Proteinmengen diese überdecken könnten.

Die Hintergrundfärbungen zeigen sich bei der Durchführung der Methode nach NEUHOFF et al. (1988) noch wesentlich stärker als bei der Durchführung der Methode nach LANNE und PANFILOV (2004). Zur Reduzierung der Hintergrundfärbung wird von NEUHOFF et al. (1988) vor der bisher durchgeführten Fixierung ein zusätzlicher einstündiger Wasch- und Fixierschritt mit 12 %iger Trichloressigsäure in Wasser empfohlen, was einer Kombination der Methoden nach NEUHOFF et al. (1988) und nach LANNE und PANFILOV (2004) entspricht. Bild 5.7 (3) zeigt die Färbung nach NEUHOFF et al. (1988) mit dem zweiten Fixierschritt. Durch diese Kombination der Methoden konnte die Hintergrundfärbung deutlich reduziert werden. Die Färbung der Proteinbanden ist weiterhin deutlich zu erkennen. Im Folgenden wurde für die Visualisierung der Proteine im SDS-PAGE-Gel nach der 2D-Elektrophorese zur Proteincharakterisierung mittels MALDI-TOF/TOF die Färbemethode nach NEUHOFF et al. (1988) mit einem zweiten Fixierschritt nach LANNE und PANFILOV (2004) angewendet.

### ***Ergebnisse der Maldi-TOF/TOF-Untersuchungen***

Nachfolgend werden die Spots der 2D-elektrophoretisch getrennten Proteine der Prozessstufen 1, 3 und 9 des Volleies dargestellt. In jeder Darstellung sind zum Vergleich die 2D-Elektropherogramme aller drei eben genannten Prozessstufen nebeneinander dargestellt. Das 2D-Elektropherogramm der Prozessstufe dessen Ergebnisse dargestellt werden ist jeweils hervorgehoben. Als Molekulargewichtsmarker (GM) wurde der Mark12<sup>®</sup> der Firma Invitrogen<sup>®</sup> (siehe Bild 8.1) und als IEF-Marker (IEFM) der Serva Liquid Mix 3-7 der Firma Novex<sup>®</sup> (siehe Bild 8.2) verwendet.

Bild 5.8 zeigt die Spots der 2D-elektrophoretisch getrennten Proteine der Prozessstufe 1 des Volleies. Die getrennte Proteinmenge entspricht 4,7 µg. Die Identifizierungen der Proteine des Volleies mittels MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen erfolgten anhand des PMF und der Aufnahme von MS/MS-Spektren ausgewählter Peptide derselben Probe (siehe 4.10).

Bild 5.9 zeigt den Immunoblot der zweidimensional getrennten Proteine der Prozessstufe 1 des Volleies. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 5.6 wiedergegeben. Die Datenbankrecherchen erfolgten mit dem Mascot protein identification

system (Matrix Science, London, UK). Das Identifizierungskriterium war ein signifikanter Mascot Score  $\geq 72$  ( $p < 0,05$ ). Der Score wird beschrieben durch  $-10 \cdot \log(P)$ , wobei P die Wahrscheinlichkeit ist, mit der die Übereinstimmung zufällig ist.

Die Sequenzübereinstimmung (S.C.) beschreibt den prozentualen Anteil - mittels MALDI-TOF identifizierter Sequenz - des jeweiligen Proteins. Nach zusätzlicher Absicherung der PMF-Ergebnisse durch die Identifizierung ausgewählter Peptide mittels MS/MS ergibt sich der Hyperscore. Außerdem beinhaltet Tabelle 5.6 die aus dem Immunoblot in Bild 5.9 entnommenen Informationen über die Detektierbarkeit von IgE-Bindungsfähigkeit der Proteine mithilfe des Humansenenpools (Spalte IB).

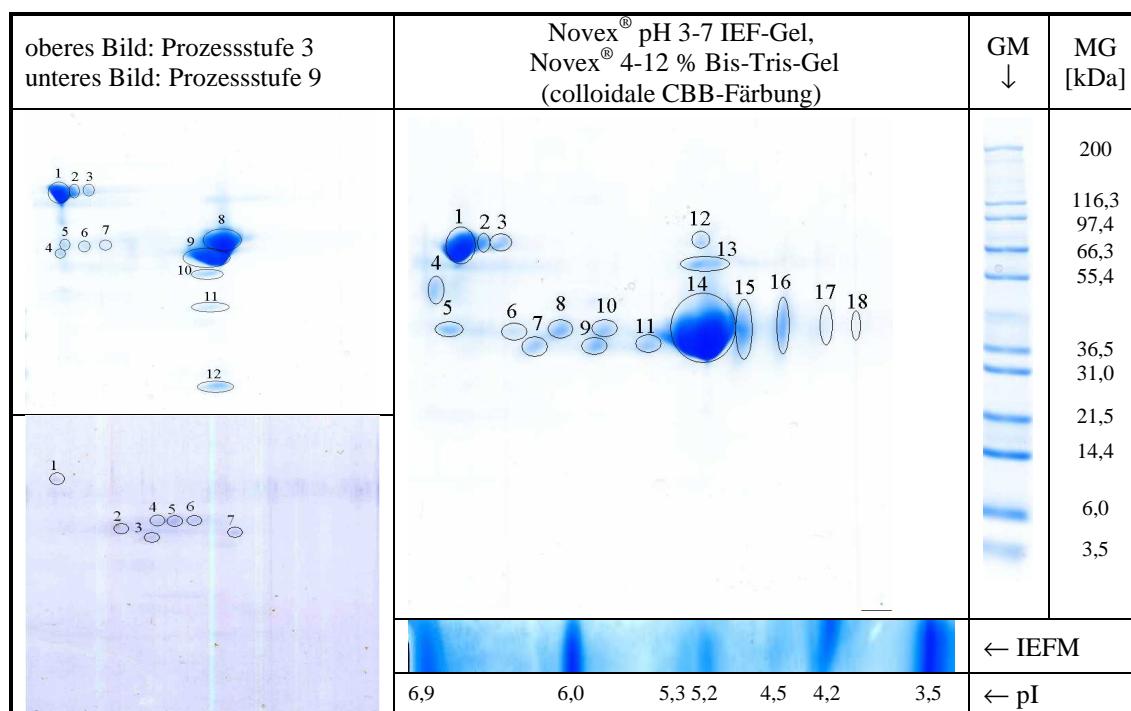


Bild 5.8: 2D-Elektrophorese und colloidale CBB-Färbung der Prozessstufe 1 des Volleies, im Vergleich dazu die Ergebnisse der Prozessstufen 3 und 9 (links von oben nach unten kleiner dargestellt)

Mit einem relativ hohen Score bzw. Hyperscore können die Spots Nr. 1, 2 und 3 (in Bild 5.8) dem Protein Conalbumin zugeordnet werden. Auch die Massen und isoelektrischen Punkte der drei Proteine aus der Datenbank stimmen gut mit denen im 2D-Elektrophoresegel gemessenen überein. IgE-Bindungsfähigkeit wurde nur für die Spots Nr. 1 und 2, nicht für Nr. 3 detektiert.

Spot Nr. 4 wird mit einem hohen Score dem Protein Ovoinhibitor zugeordnet. Die im 2D-Elektrophoresegel gemessene Masse stimmt gut mit der theoretischen Masse aus der Datenbank überein. Da der theoretische isoelektrische Punkt geringer als der tatsächlich gemessene ist, wird vermutet, dass durch das Pasteurisieren dieser Prozessstufe 1 des Volleies das Protein so verändert wurde, dass einige Säuregruppen des Moleküls nicht mehr zu der Ausbildung des ursprünglichen isoelektrischen Punktes beitragen. IgE-Bindungsfähigkeit wurde für diesen Spot nicht detektiert.

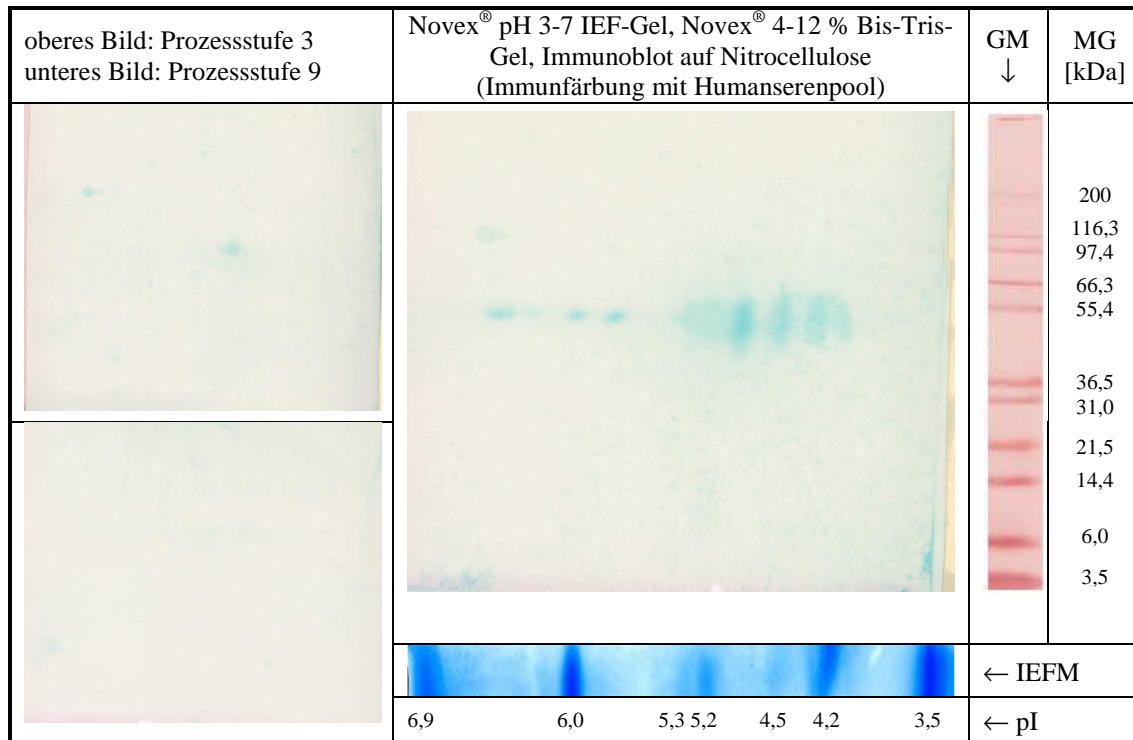


Bild 5.9: 2D-Elektrophorese und Immunoblot der Prozessstufe 1 des Volleies, im Vergleich dazu die Ergebnisse der Prozessstufen 3 und 9 (links von oben nach unten kleiner dargestellt)

Spot Nr. 5 und 6 werden mit einem hohen Score dem Protein Ovalbumin zugeordnet. Die im 2D-Elektrophoresegele gemessenen Massen stimmen gut mit den theoretischen Massen aus der Datenbank überein. Da die theoretischen isoelektrischen Punkte geringer als die tatsächlich gemessenen sind, wird hier ebenfalls vermutet, dass durch das Pasteurisieren dieser Prozessstufe 1 des Volleies einige Säuregruppen des Moleküls nicht mehr zu der Ausbildung des ursprünglichen isoelektrischen Punktes beitragen. IgE-Bindungsfähigkeit wurde nur für Spot Nr. 5, nicht für Nr. 6 detektiert.

Das Protein Vitellogenin kann den Spots Nr. 7 und 9 nicht mittels PMF, wohl aber mit ausreichend hohem Score mittels MS/MS zugeordnet werden. Die gemessenen Massen der Proteine betragen jeweils nur etwa ein Fünftel der theoretischen Massen und auch die theoretischen und tatsächlichen isoelektrischen Punkte stimmen nicht überein. Mittels MS/MS-Experiment können in den Spots ausschließlich Peptide des N-terminalen Endes der Gesamtproteinsequenz von Vitellogenin identifiziert werden. Aus diesen Informationen lässt sich schließen, dass es sich bei den detektierten Proteinspots Nr. 7 und 9 um Bruchstücke des Vitellogenins handelt. IgE-Bindungsfähigkeit wurde für keinen der beiden Spots detektiert.

Die Spots Nr. 8, 10, 11 und 18 können sowohl mittels PMF als auch mittels MS/MS-Experimenten nicht identifiziert werden. IgE-Bindungsfähigkeit wurde für die Spots Nr. 8, 10 und 18, nicht aber für Spot Nr. 11 detektiert.

Die Spots Nr. 12 und 13 werden mit einem ausreichenden und Spot Nr. 14 mit einem hohen Score dem Protein Ovalbumin zugeordnet. Die im 2D-Elektrophoresegele

gemessenen isoelektrischen Punkte stimmen für die 3 Spots mit den theoretischen Daten überein. Eine Übereinstimmung der theoretischen und tatsächlichen Massen dieser drei Spots ist lediglich für Spot Nr. 14 gegeben. Da die tatsächlich gemessenen Massen der Spots Nr. 12 und 13 höher sind als die theoretischen, wird vermutet, dass es sich dabei um einen Schmiereffekt bei der Durchführung der SDS-PAGE infolge eines relativ hohen Anteils von Ovalbumin in Spot Nr. 14 handelt. IgE-Bindungsfähigkeit wurde nur für Spot Nr. 14, nicht für Nr. 12 und 13 detektiert.

Tabelle 5.6: Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen der Prozessstufe 1 des Volleies

Nr.	PMF	MS/MS		Mascot Datenbank		2D-Elektro- phorese			Protein
	Score	Hyper- score	S.C. [%]	Masse [kDa]	pI	Masse [kDa]	pI	IB	
1	305	547	56	77,518	6,7	~ 78	~ 6,7	+	Conalbumin
2	381	501	66	77,518	6,7	~ 78	~ 6,6	+	Conalbumin
3	299	440	58	77,518	6,7	~ 78	~ 6,5	-	Conalbumin
4	142	257	41	54,394	6,16	~ 54	~ 6,8	-	Ovoinhibitor
5	120	344	51	43,065	5,2	~ 44	~ 6,7	+	Ovalbumin
6	141	365	53	43,065	5,2	~ 44	~ 6,3	-	Ovalbumin
7	-	180	-	206,862	9,22	~ 40	~ 6,2	-	Vitellogenin
8	-	-	-	-	-	~ 44	~ 6,1	+	-
9	-	244	-	206,862	9,22	~ 41	~ 5,8	-	Vitellogenin
10	-	-	-	-	-	~ 44	~ 5,7	+	-
11	-	-	-	-	-	~ 42	~ 5,5	-	-
12	105	147	51	43,065	5,2	~ 78	~ 5,2	-	Ovalbumin
13	93	218	51	43,065	5,2	~ 65	~ 5,2	-	Ovalbumin
14	206	393	69	43,065	5,2	~ 44	~ 5,2	+	Ovalbumin
15	-	209	-	21,210	4,8	~ 45	~ 4,8	+	Ovomucoid
16	53	279	48	21,210	4,8	~ 45	~ 4,5	+	Ovomucoid
17	52	99	48	21,210	4,8	~ 45	~ 4,2	+	Ovomucoid
18	-	-	-	-	-	~ 45	~ 4,0	+	-

Die Spots Nr. 15, 16 und 17 können mittels PMF nicht eindeutig, wohl aber mit hohem bzw. ausreichendem Score mittels MS/MS dem Protein Ovomucoid zugeordnet werden. Die gemessenen Massen der Proteine stimmen aufgrund des relativ großen Kohlenhydratanteils des Ovomucoids in dem 2D-Elektrophoresegele nicht mit den theoretischen Massen überein (siehe dazu auch 5.1.2), wohl aber die isoelektrischen Punkte.



Bild 5.10 zeigt die Spots der 2D-elektrophoretisch getrennten Proteine der Prozessstufe 3 des Volleies. Die getrennte Proteinmenge entspricht 3,6 µg. Bild 5.11 zeigt den Immunoblot der zweidimensional getrennten Proteine der Prozessstufe 3 des Volleies.

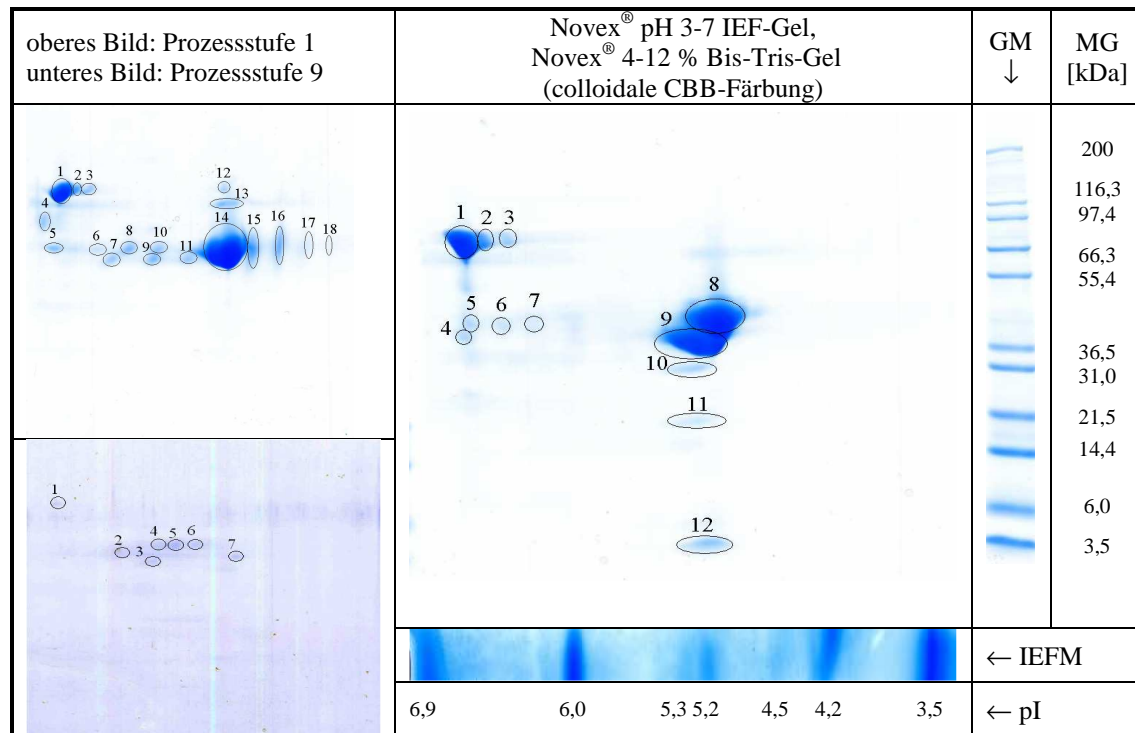


Bild 5.10: 2D-Elektrophorese und colloidale CBB-Färbung der Prozessstufe 3 des Volleies, im Vergleich dazu die Ergebnisse der Prozessstufen 1 und 9 (links von oben nach unten kleiner dargestellt)

Die Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen sind in Tabelle 5.7 wiedergegeben. Die Spots Nr. 4 und 5, 7 bis 13 sowie 15 bis 18 in der Prozessstufe 1 des Volleies werden nach weiterer technologischer Veränderung in der Prozessstufe 3 des Volleies nicht mehr detektiert. Allerdings treten in der Prozessstufe 3 des Volleies neue Spots auf (Nr. 4 bis 6 und 9 bis 12).

Mit einem relativ hohen Score bzw. Hyperscore können die Spots Nr. 1, 2 und 3 dem Protein Conalbumin zugeordnet werden. Auch die Massen und isoelektrischen Punkte der drei Proteine aus der Datenbank stimmen gut mit denen im 2D-Elektrophoresegel gemessenen überein. IgE-Bindungsfähigkeit wurde nur für die Spots Nr. 1 und 2, nicht für Nr. 3 detektiert. Eine deutliche Veränderung der Proteine dieser drei Spots kann im Vergleich zur Prozessstufe 1 der Volleiprobe nicht festgestellt werden.

Die Spots Nr. 4 und 5 können mit einem ausreichend hohen Score ebenfalls dem Protein Conalbumin zugeordnet werden. Da diese Spots in der Prozessstufe 1 noch nicht zu detektieren sind und erst nach technologischer Veränderung in Prozessstufe 3 auftreten und die tatsächlichen Massen dieser Proteine deutlich geringer sind als die theoretischen, wird vermutet, dass es sich dabei um während des technologischen



Prozesses entstandene Bruchstücke des Proteins Conalbumin handelt. Die theoretischen und tatsächlichen isoelektrischen Punkte dieser Proteine stimmen relativ gut überein. IgE-Bindungsfähigkeit wurde für diese beiden Spots nicht detektiert.

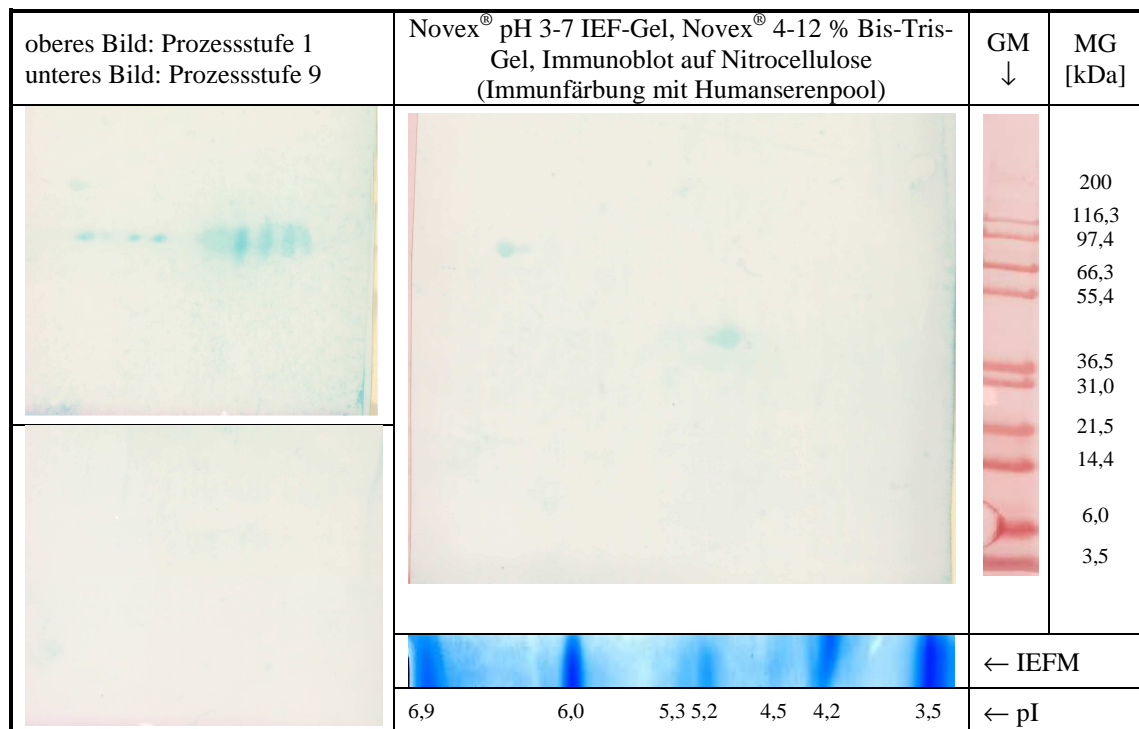


Bild 5.11: 2D-Elektrophorese und Immunoblot der Prozessstufe 3 des Volleies, im Vergleich dazu die Ergebnisse der Prozessstufen 1 und 9 (links von oben nach unten kleiner dargestellt)

Spot Nr. 6 und 7 werden mit einem ausreichend hohen Score dem Protein Ovalbumin zugeordnet. Die im 2D-Elektrophoresegel gemessenen Massen stimmen gut mit den theoretischen Massen aus der Datenbank überein. Da die theoretischen isoelektrischen Punkte geringer als die tatsächlich gemessenen sind, wird vermutet, dass durch die technologische Veränderung des Volleies das Protein so verändert wurde, dass einige Säuregruppen des Moleküls nicht mehr zu der Ausbildung des ursprünglichen isoelektrischen Punktes beitragen.

Bei dem Spot Nr. 7 in der Prozessstufe 3 könnte es sich um dasselbe Protein handeln, das in Spot Nr. 6 in der Prozessstufe 1 detektiert wurde.

Spot Nr. 8 in der Prozessstufe 3 entspricht dem Spot Nr. 14 des Ovalbumins in der Prozessstufe 1 des Volleies. IgE-Bindungsfähigkeit wurde hier (genau wie in der Prozessstufe 1) detektiert.

Die Spots Nr. 9 bis 12 wurden mit ausreichend hohen Hyperscores dem Protein Ovalbumin zugeordnet. Mit Ausnahme des Proteins in Spot Nr. 12 sind auch die Scores des PMF ausreichend hoch für diese Zuordnung. Die im 2D-Elektrophoresegel gemessenen Massen sind bei diesen Proteinspots (Nr. 9 bis 12) alle geringer als die theoretischen Massen aus der Datenbank. Es wird deshalb vermutet, dass es sich dabei um Bruch-

stücke des Proteins Ovalbumin handelt. Bei Spot Nr. 11 und 12 können mittels MS/MS-Experimenten Sequenzen aus dem C-terminalen Bereich und bei Spot Nr. 13 Sequenzen des N-terminalen Bereiches von Ovalbumin identifiziert werden. Die theoretischen und tatsächlichen isoelektrischen Punkte dieser Proteine stimmen miteinander überein. IgE-Bindungsfähigkeit kann bei diesen Bruchstücken des Ovalbumins nicht detektiert werden.

Tabelle 5.7: Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen der Prozessstufe 3 des Volleies

Nr.	PMF	MS/MS		Mascot Datenbank		2D-Elektro- phorese			Protein
	Score	Hyper- score	S. C. [%]	Masse [kDa]	pI	Masse [kDa]	pI	IB	
1	332	602	62	77,518	6,7	~ 78	~ 6,7	+	Conalbumin
2	140	510	53	77,518	6,7	~ 78	~ 6,6	+	Conalbumin
3	384	442	66	77,518	6,7	~ 78	~ 6,5	-	Conalbumin
4	133	283	30	79,551	6,85	~ 44	~ 6,7	-	Conalbumin
5	151	253	40	79,551	6,85	~ 46	~ 6,7	-	Conalbumin
6	113	321	51	43,065	5,2	~ 44	~ 6,5	-	Ovalbumin
7	113	319	51	43,065	5,2	~ 45	~ 6,3	-	Ovalbumin
8	165	347	62	43,196	5,2	~ 45	~ 5,2	+	Ovalbumin
9	135	343	52	43,196	5,2	~ 40	~ 5,2	-	Ovalbumin
10	102	339	39	43,065	5,2	~ 31	~ 5,2	-	Ovalbumin
11	98	362	47	43,065	5,2	~ 21	~ 5,2	-	Ovalbumin
12	-	190	-	43,196	5,2	~ 3,5	~ 5,2	-	Ovalbumin

Bild 5.12 zeigt die Spots der 2D-elektrophoretisch getrennten Proteine der Prozessstufe 9 des Volleies. Die getrennte Proteinmenge entspricht 4,2  $\mu\text{g}$ .

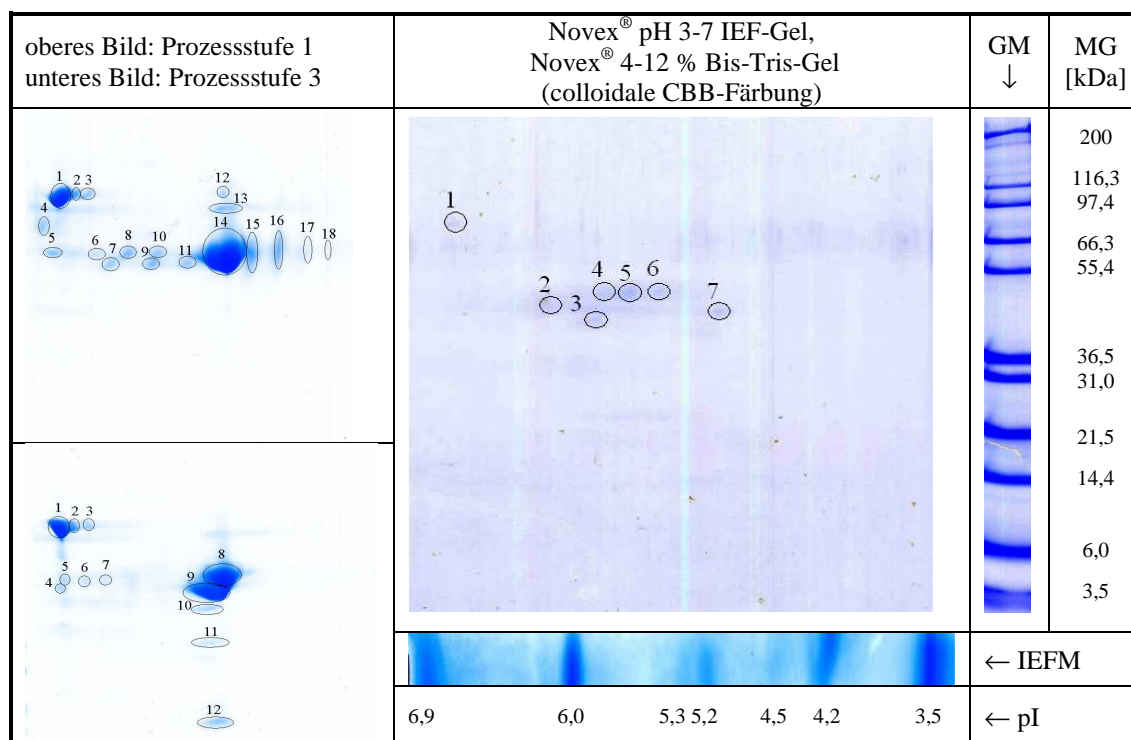


Bild 5.12: 2D-Elektrophorese und colloidale CBB-Färbung der Prozessstufe 9 des Volleies, im Vergleich dazu die Ergebnisse der Prozessstufen 1 und 3 (links von oben nach unten kleiner dargestellt)

Bild 5.13 zeigt den Immunoblot der zwei-dimensional getrennten Proteine der Prozessstufe 9 des Volleies.

Die Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen sind in Tabelle 5.8 wiedergegeben.

Die Spots Nr. 2 bis 6 sowie 9 bis 12 in der Prozessstufe 3 des Volleies werden nach weiterer technologischer Veränderung in der Prozessstufe 9 des Volleies nicht mehr detektiert. Allerdings treten in der Prozessstufe 9 des Volleies neue Spots auf (Nr. 3 bis 6).

Mit einem relativ geringen Score bzw. Hyperscore kann der Spot Nr. 1 dem Protein Conalbumin zugeordnet werden. Auch die Masse und der isoelektrische Punkt des Proteins aus der Datenbank stimmen gut mit denen im 2D-Elektrophoresegel gemessenen überein. IgE-Bindungsfähigkeit wurde für diesen Spot nicht detektiert.

Das Protein Ovalbumin kann in Spot Nr. 2 nicht mittels PMF, wohl aber mit relativ geringem Score mittels MS/MS zugeordnet werden. Die gemessene Masse des Proteins ist deutlich geringer als die der theoretischen Masse und auch der theoretische und tatsächliche isoelektrische Punkt stimmen nicht überein. Es wird daher vermutet, dass es

sich bei dem detektierten Proteinspot Nr. 2 um ein Bruchstück des Proteins Ovalbumin handelt. IgE-Bindungsfähigkeit wurde für diesen Spot nicht detektiert.

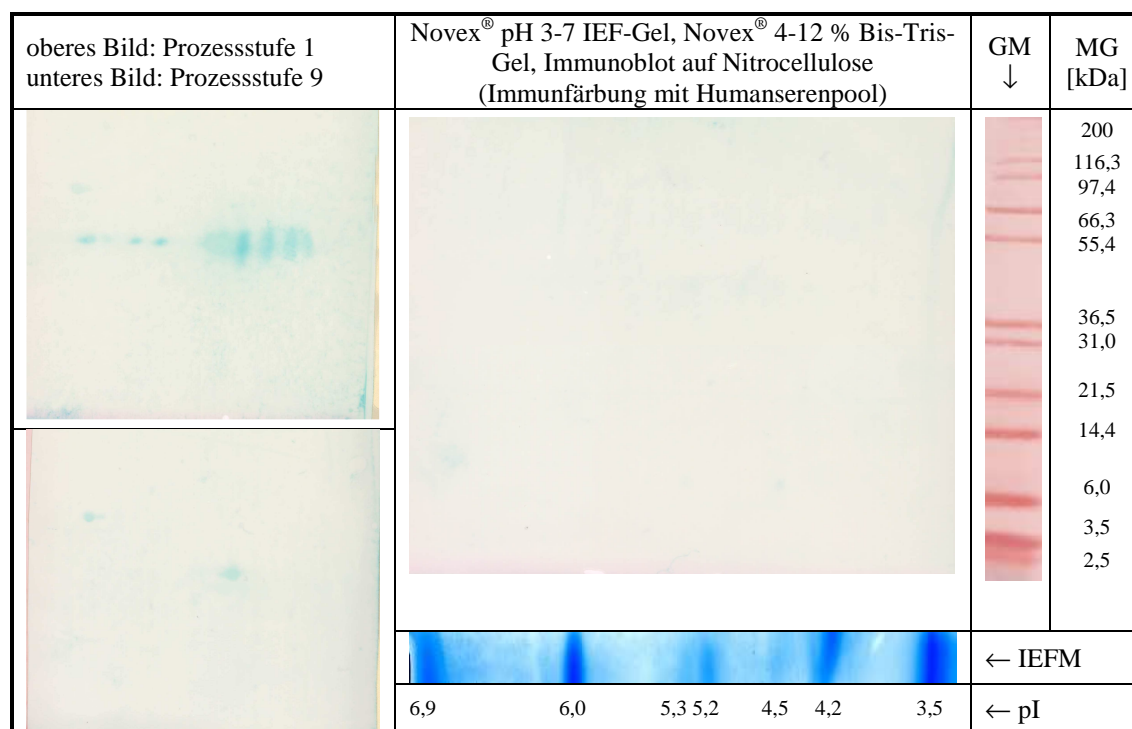


Bild 5.13: 2D-Elektrophorese und Immunoblot der Prozessstufe 9 des Volleies, im Vergleich dazu die Ergebnisse der Prozessstufen 1 und 3 (links von oben nach unten kleiner dargestellt)

Die Spots Nr. 3 und 5 können sowohl mittels PMF als auch mittels MS/MS-Experimenten nicht identifiziert werden. IgE-Bindungsfähigkeit kann für diese Spots nicht detektiert werden.

Tabelle 5.8: Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen der Prozessstufe 9 des Volleies

Nr.	PMF	MS/MS		Mascot Datenbank		2D-Elektrophorese		IB	Protein
	Score	Hyper-score	S. C. [%]	Masse [kDa]	pI	Masse [kDa]	pI		
1	68	69	23	77,518	6,7	~ 78	~ 6,7	-	Conalbumin
2	-	74	14	56,486	6,45	~ 45	~ 6,2	-	Ovalbumin
3	-	-	-	-	-	~ 40	~ 5,9	-	-
4	114	147	37	44,029	5,2	~ 44	~ 5,7	-	Ovalbumin
5	-	-	-	-	-	~ 44	~ 5,5	-	-
6	59	171	28	44,029	5,2	~ 44	~ 5,3	-	Ovalbumin
7	117	246	44	43,065	5,2	~ 43	~ 5,2	-	Ovalbumin

Die Spots Nr. 4, 6 und 7 können mit einem ausreichend hohen Score dem Protein Ovalbumin zugeordnet werden. Diese Spots sind in der Prozessstufe 1 und 3 noch nicht zu detektieren und treten erst nach technologischer Veränderung in Prozessstufe 9 auf. Während die theoretischen und tatsächlichen Massen dieser Proteine relativ gut übereinstimmen, treten leichte Unterschiede bei den theoretischen und tatsächlichen isoelektrischen Punkten auf. Da die theoretischen isoelektrischen Punkte der Spots Nr. 4

und 6 geringer als die tatsächlich gemessenen sind, wird vermutet, dass durch die technologische Veränderung des Volleies das Protein so verändert wurde, dass einige Säuregruppen des Moleküls nicht mehr zu der Ausbildung des ursprünglichen isoelektrischen Punktes beitragen. Bei Spot Nr. 7 stimmen sowohl die tatsächliche Masse als auch der tatsächliche isoelektrische Punkt mit den theoretischen Werten überein. Es wird vermutet, dass es sich dabei um denselben - durch das Protein Ovalbumin hervorgerufenen - Spot wie Nr. 8 in der Prozessstufe 3 und Nr. 14 in der Prozessstufe 1 handelt. IgE-Bindungsfähigkeit wurde für die Spots Nr. 4, 6 und 7 nicht detektiert.

## 5.4 Technologisch verändertes Volleipulver als Additiv in Brät zur Herstellung von Brühwürsten

### 5.4.1 Charakterisierung der Prozessstufen mittels SDS-PAGE

Anhand der in Bild 5.14 dargestellten SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung der Prozessstufen des Volleipulvers in Brät werden deutliche Veränderungen im Proteinspektrum während der technologischen Verarbeitung sichtbar.

Neben den einzelnen Prozessstufen sind in Bild 5.14 außerdem die silbergefärbten mittels SDS-PAGE getrennten Proteinbanden des zum Brät zugesetzten Volleipulvers dargestellt.




Volleipulver	Protein (MG [kDa])	Prozessstufen Volleipulver in Brät											Marker	MG [kDa]
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
	Conalbumin (77) Ovoinhibitor (49) Ovalbumin (45) Ovomucoid (28)  Lysozym (14)													200 116,3 97,4  66,3 55,4  36,5 31,0  21,5 14,4  6,0 3,5 2,5
Novex® 4-12 % Bis-Tris-Gel (Silberfärbung)												Invitrogen® Mark12 (Silberfärbung)		

Bild 5.14: SDS-PAGE und Silberfärbung der Prozessstufen des Volleipulvers in Brät

Bei Probe Nr. 1 handelt es sich um das reine nicht technologisch veränderte Brät (wie unter 3.1.2 beschrieben). Probe Nr. 2 enthält außerdem Volleipulver. Da es sich hierbei um einen Zusatz von nur 1 % handelt, hat dies kaum eine Auswirkung auf das hier dargestellte Proteinmuster der Probe im Vergleich zu Probe Nr. 1. Lediglich einige Proteinbanden dieser beiden Proben treten in etwas unterschiedlichen Intensitäten auf, was auch auf natürliche Schwankungen zurückgeführt werden kann. Eindeutige Proteinbanden des Volleipulvers können in Probe Nr. 2 nicht detektiert werden, da sie von den Banden des Bräts verdeckt werden. Insgesamt können in diesen 2 Proben Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich von ca. 14 – 200 kDa detektiert werden.

Die auf 70 °C erhitzte Probe Nr. 3 zeigt bereits deutlich diffusere Banden als die beiden technologisch unveränderten Proben Nr. 1 und 2. Es treten neue Banden im Bereich von 6 – 14 kDa auf. Dies verstärkt sich noch bei den höher erhitzten Proben Nr. 4 (F = 1) und Nr. 5 (F = 3). Bei Probe Nr. 6 (F = 12) ist kaum noch eine Differenzierung einzelner Banden zu erkennen. Die mit Hochdruck behandelte Probe Nr. 7 zeigt ein mit der auf 70 °C erhitzten Probe (Nr. 3) vergleichbares Proteinmuster, ohne dass hier neue Proteine im Molekulargewichtsbereich < 14 kDa auftreten. Beim Vergleich der Proben Nr. 3 (auf 70 °C erhitzt) und 8 (auf 70 °C erhitzt und anschließend mit Hochdruck behandelt) zeigen sich keine auffälligen Veränderungen im Proteinmuster. Dies gilt ebenso für den Vergleich der Proben Nr. 5 und 9 und 6 und 10, bei denen durch zusätzliche Hochdruckbehandlung nach dem Erhitzen keine weiteren Veränderungen im Proteinmuster zu erkennen sind. Auch beim Vergleich von Probe Nr. 10 (erhitzt mit F = 12 und anschließend hochdruckbehandelt) und 11 (hochdruckbehandelt und anschließend erhitzt mit F = 12) treten durch Veränderung der Reihenfolge der technologischen Behandlungen keine sichtbaren Unterschiede im Proteinmuster auf.

Bild 5.15 zeigt die Immunfärbung der Eiallergene in den Prozessstufen des Volleipulvers in Brät mit dem Humanserenpool.

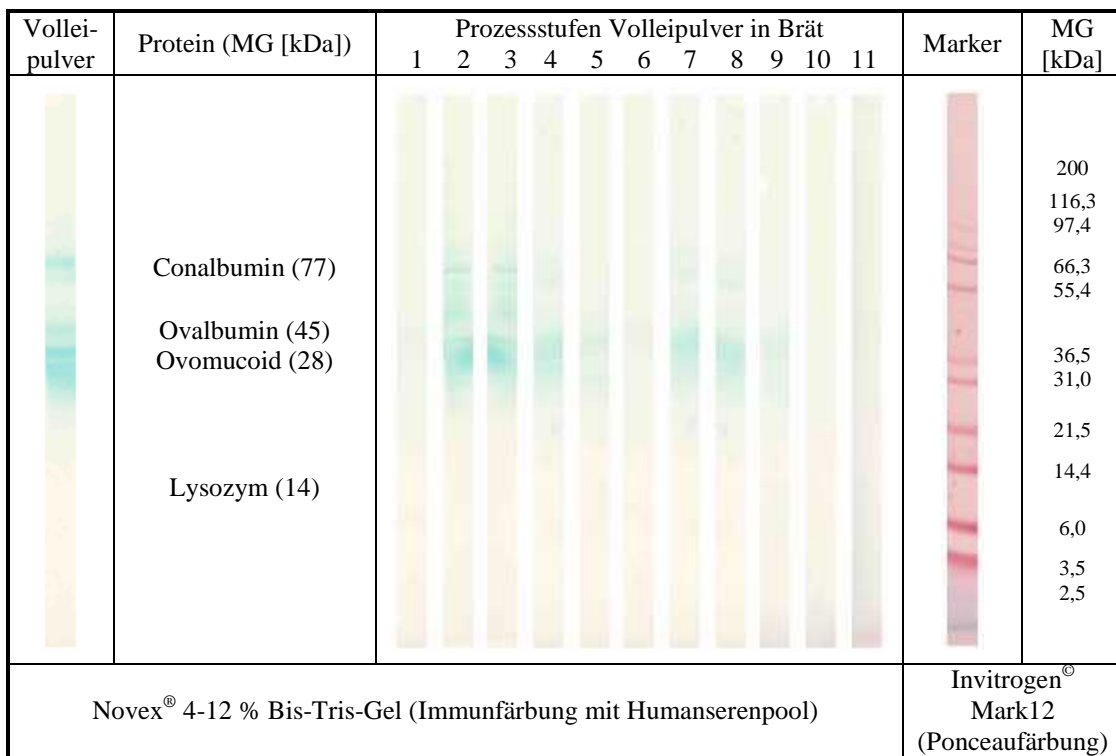


Bild 5.15: Immunfärbung der Prozessstufen des Volleipulvers in Brät

In dem Massenbereich von Lysozym kann sowohl in dem Volleipulver als auch bei den Prozessproben keine Bande detektiert werden. Die Banden der weiteren 3 Hauptallergene des Volleies - Conalbumin, Ovalbumin und Ovomuroid – können in der Positivprobe (dem Volleipulver) und der Probe Nr. 2 (Zusatz von 1 % Volleipulver

ohne technologische Veränderung) eindeutig detektiert werden. In der Probe Nr. 1 (Negativprobe aus reinem Brät ohne Zusatz von Volleipulver) kann - wie zu erwarten - kein Allergen detektiert werden. Die auf 70 °C erhitzte Probe Nr. 3 zeigt im Vergleich zu der nicht erhitzten Probe Nr. 2 keine eindeutigen Veränderungen im Allergenmuster. Beim Erhitzen der Probe auf einen F-Wert von 1 (Probe Nr. 4) nimmt die Intensität der Allergenbanden ab, Conalbumin ist in dieser Probe kaum noch zu detektieren. Beim Erhitzen der Probe auf einen F-Wert von 3 (Probe Nr. 5) treten nur noch relativ schwach detektierbare diffuse Banden im Massenbereich von Ovalbumin und Ovomuroid auf, welche beim Erhitzen der Probe auf einen F-Wert von 12 (Probe Nr. 6) mit dem verwendeten Humansenpool gar nicht mehr detektiert wurden. Bei der mit Hochdruck behandelten Probe Nr. 7 können Banden von Conalbumin, Ovalbumin und Ovomuroid detektiert werden. Im Vergleich zu der technologisch unbehandelten Probe Nr. 2 treten diese aber deutlich diffuser und weniger intensiv gefärbt auf.

Die mit Hochdruck und 70 °C behandelte Probe Nr. 8 zeigt im Vergleich zu Probe Nr. 7 keine eindeutigen Veränderungen in Allergenmuster und -intensität. Bei der mit Hochdruck und einem F-Wert von 3 behandelten Probe Nr. 9 tritt eine diffuse Färbung der Allergene im Massenbereich von Ovalbumin und Ovomuroid auf, welche bei den mit Hochdruck und einem F-Wert von 12 behandelten Proben Nr. 10 und 11 mit dem verwendeten Humansenpool gar nicht mehr detektiert werden kann.

#### **5.4.2 Bestimmung des relativen allergenen Potenzials mittels EAST-Inhibition**

In Bild 5.16 sind die Inhibitionskurven der Prozessstufen des Volleipulvers in Brät dargestellt. Die Messwerte und Berechnungen sind im Anhang unter 8.5 dargestellt. Der höchste eingesetzte – mit Hilfe der Methode nach BRADFORD (1976) bestimmte – Proteingehalt der unbehandelten Probe Nr. 2 (Brät mit Zusatz von 1 % Volleipulver) beträgt 7818 µg/mL. Diese Proteinlösung wurde zur Erstellung der Inhibitionskurve – wie unter 8.1.5 beschrieben - in sechs weiteren Verdünnungsstufen eingesetzt. Da es sich bei den Prozessproben Nr. 2 bis 11 um dieselbe Ausgangssubstanz (aber unterschiedlich technologisch verarbeitet) handelt, wurde dieser Proteingehalt (sowie dessen Verdünnungsstufen) auch auf alle weiteren Prozessstufen bezogen. Der Proteingehalt der Volleiprobe Nr. 0 sowie der Negativprobe Nr. 1 unterscheiden sich von den übrigen Proben, da es sich dabei nicht um die gleiche Ausgangssubstanz handelt. Ihre Proteingehalte sind im Anhang unter 8.5 angegeben.

In Tabelle 5.9 sind die  $C_{50}$ -Werte der Inhibitionskurven wiedergegeben. Je höher der  $C_{50}$ -Wert einer Inhibitionskurve ist (siehe 4.5), desto geringer ist das allergene Potenzial eines Proteinextraktes. Bei der Negativprobe Nr. 1 wird – wie erwartet – kein  $C_{50}$ -Wert erreicht. Da die Probe Nr. 2 nur 1 % des Volleipulvers enthält und somit auch nur 1 % der allergenen Potenz des reinen Volleipulvers aufweist, ist der  $C_{50}$ -Wert dieser Probe mit 145 µg/mL - wie zu erwarten - um ca. das 100fache höher als der  $C_{50}$ -Wert der Homologen (Probe Nr. 0 mit 1,3 µg/mL).



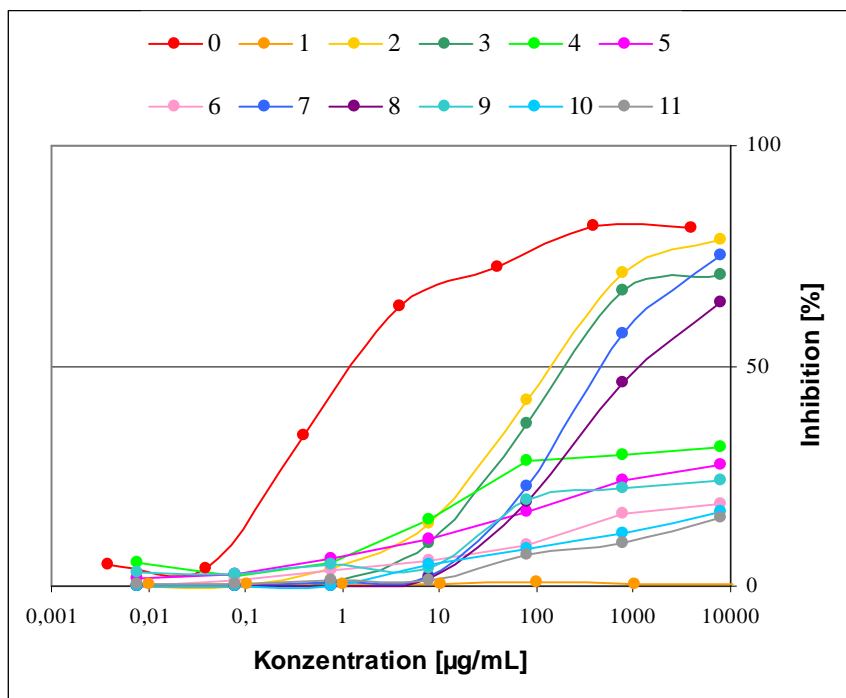


Tabelle 5.9:  
C<sub>50</sub>-Werte der EAST-  
Inhibition der  
Prozessstufen des  
Brät

Nr.	C <sub>50</sub> -Wert [µg/mL]
0	1,3
1	nicht erreicht
2	145
3	214
4	nicht erreicht
5	nicht erreicht
6	nicht erreicht
7	485
8	1286
9	nicht erreicht
10	nicht erreicht
11	nicht erreicht

Bild 5.16: EAST-Inhibition der Prozessstufen des Volleipulvers in Brät

Durch das Erhitzen der Probe (Nr. 3) steigt der C<sub>50</sub>-Wert um das 1,5fache im Vergleich zur unerhitzten Probe (Nr. 2). Das Erhitzen der Probe auf einen F-Wert von 1 (Probe Nr. 4) führt bereits dazu, dass die Inhibitionskurve dieser Probe so flach verläuft, dass der C<sub>50</sub>-Wert innerhalb des Messbereiches nicht erreicht wird. Das Gleiche gilt für das Erhitzen der Proben auf F-Werte von 3 und 12 (Proben Nr. 5 und 6) mit noch flacher verlaufenden Inhibitionskurven bzw. geringer werdenden - mit dieser Methode nicht messbaren - allergenen Potenzialen. Bei der mit Hochdruck behandelten Probe Nr. 7 steigt der C<sub>50</sub>-Wert um mehr als das 3fache im Vergleich zur unehandelten Probe (Nr. 2). Durch zusätzliches Erhitzen der mit Hochdruck behandelten Probe auf 70 °C (Probe Nr. 8) steigt der C<sub>50</sub>-Wert bzw. sinkt das allergene Potenzial im Vergleich zu Probe Nr. 7 noch einmal um mehr das 2,5fache. Wie bei den Proben, die mit einem F-Wert von 3 und 12 behandelt wurden, sind die Inhibitionskurven der Proben mit zusätzlicher Hochdruckbehandlung (Proben Nr. 9 bis 11) so flach, dass der C<sub>50</sub>-Wert innerhalb des Messbereiches nicht erreicht wird und ein allergenes Potenzial der Proben mit dieser Methode nicht messbar ist. Dabei sind die Inhibitionskurven mit zusätzlicher Hochdruckbehandlung nach dem Erhitzen jeweils noch flacher als die Kurven der Proben, die mit dem gleichen F-Wert, aber nicht mit Hochdruck behandelt wurden. Ein Vergleich der Proben Nr. 10 und 11, bei denen die Behandlung mit Hochdruck und Hitze (F = 12) in unterschiedlicher Reihenfolge erfolgte, zeigt keine großen Unterschiede, wobei die Kurve der Probe die zuerst erhitzt und dann mit Hochdruck behandelt wurde (Probe Nr. 11) tendenziell etwas flacher verläuft als die Kurve der Probe Nr. 10.



## 6 Diskussion

### 6.1 Charakterisierung der Patientenserum

Aus Bild 5.1 und Tabelle 5.1 wird deutlich, dass die verschiedenen Allergene des Hühnereies von den Einzelseren in Bezug auf ihre Häufigkeit und Intensität unterschiedlich stark detektiert werden. Ein Vergleich der unter 5.1 erhaltenen Ergebnisse macht deutlich, dass die Seren, welche in den Untersuchungen mittels EAST höhere spezifische IgE-Gehalte aufweisen, eine intensivere Allergendetektion in der Einzelserenbestimmung mittels Immunoblot ausbilden.

Conalbumin, Ovalbumin, Ovomuroid und Lysozym zählen laut zahlreicher Studien [HOLEN & ELSAYED 1990; LANGELAND 1982b, 1983; LANGELAND & HARBITZ 1983; BERNHISEL-BROADBENT et al. 1994; HOFFMANN 1983] zu den Hauptallergenen des Hühnereies, da mehr als 50 % der getesteten (auf Hühnerei allergischen) Patienten spezifische IgE-Antikörper aufweisen (vgl. 2.1.2). Dies trifft weitestgehend auch auf die Ergebnisse der Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zu, bei denen 80 % der getesteten Einzelseren Ovalbumin, ebenfalls 80 % Ovomuroid und 60 % Conalbumin detektieren. Lysozym wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nur von 15 % der getesteten Seren detektiert, was der Aussage widerspricht, dass es sich dabei um ein Hauptallergen handelt. In einer Studie von AABIN et al. (1996) mit 34 mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot getesteten Humanseren von Eiallergikern konnte ebenfalls mit nur 15 % der Seren Lysozym detektiert werden. Diese Ergebnisse können darauf zurückgeführt werden, dass 20 bzw. 34 Seren für eine repräsentative Aussage über die IgE-Verteilung bei Hühnereiallergikern nicht ausreichen. Nach GEHA (1995) ist zur gesicherten Einteilung in Haupt- und Nebenallergene ein Patientenkollektiv von mehr als 50 Individuen nötig.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit weiterhin detektierten Allergenen mit den Massen im Bereich  $\geq 80$  kDa (50 %) handelt es sich wahrscheinlich um Allergene des Eidotters (alpha-Livetin 80 kDa, Phosvitin 160 – 190 kDa, Apovitellin VI 170 kDa; vgl. 2.5). Ein 35 kDa-Allergen (35 %) wurde ebenfalls von SZEPFALUSI et al. (1994) detektiert, aber nicht näher beschrieben. Bei dem 32 kDa-Allergen (20 %) könnte es sich um das Flavoprotein des Eiklars und bei dem 9 kDa-Allergen (10 %) um das Apovitellin I des Eidotters handeln. Diese Proteine werden als Nebenallergene des Hühnereies eingestuft [WÜTHRICH 1993], da hier weniger als 50 % der getesteten (auf Hühnerei allergischen) Patienten spezifische IgE-Antikörper aufweisen. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit dieser Aussage überein, können aber – wie bereits erwähnt – aufgrund der relativ geringen Anzahl von 20 Seren nur als Tendenz angesehen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die folgenden immunologischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ein Poolserum aus 11 der 20 mittels Immunoblot untersuchten Einzelseren verwendet, das spezifische IgE-Gehalte der Einzelseren von  $> 4,8$  U/mL aufweist und im Hinblick auf die vier Hauptallergene des Hühnereies als ausreichend detektionsstark beurteilt wird.

Da sich der verwendete Serenpool aus 11 Einzelseren zusammensetzt, können die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen dieser Arbeit nur als Tendenz angesehen werden. Einzelne Patientenseren unterliegen immer individuellen Schwankungen und Unterschieden in Bezug auf die Art und Konzentration der spezifischen IgE. Deshalb ist es nicht auszuschließen, dass ein Patient außerhalb dieser Studie auf ein Allergen reagiert, welches mit dem im Rahmen dieser Studie verwendeten Serenpool nicht detektiert werden kann und umgekehrt. Mit den durchgeführten *in vitro* Untersuchungen dieser Studie werden nur Seren von Patienten getestet, die aufgrund einer Typ-I-Reaktion IgE gegen Hühnereiallergene bilden. Nicht IgE vermittelte allergische Reaktionen werden im Rahmen dieser Untersuchungen nicht erfasst. Patientenseren mit einem spezifischen IgE-Gehalt von  $< 4,8$  U/mL erwiesen sich als für diese Untersuchungen nicht ausreichend detektionsstark. Da für den eingesetzten Serenpool nur Seren mit einem IgE-Gehalt von  $> 4,8$  U/mL eingesetzt wurden, ist nicht auszuschließen, dass – auch wenn mit dem Serenpool kein Allergen detektiert werden kann – ein stark sensibilisierter Patient mit einer Allergie gegenüber Hühnerei trotzdem allergisch auf das entsprechende Lebensmittel reagiert. Als niedrigsten Schwellenwert zur Auslösung von allergischen Symptomen nach oraler Aufnahme (LOAEL = lowest observed immuno-allergic effect level) geben MORISSET et al. (2003)  $< 2$  mg Ei an.

Es soll deshalb an dieser Stelle noch einmal hervorgehoben werden, dass die Untersuchungen dieser Arbeit nicht das Ziel einer totalen Eliminierung des allergenen Potenzials von Hühnerei haltigen Lebensmitteln haben, sondern eine deutliche Reduktion des allergenen Potenzials angestrebt wird.

Da das verwendete Poolserum insgesamt ein Volumen von 48,70 mL aufweist und dies den limitierenden Faktor für die durchzuführenden immunologischen Untersuchungen darstellt, können im Rahmen dieser Arbeit nur ausgewählte Immunoblots bzw. EAST-Inhibitionen durchgeführt werden.

## 6.2 Proteinextraktionen

Für die Analysen der Proben *Vollei zum Einsatz in Fertigprodukten* und *Volleipulver als Additiv in Brät zur Herstellung von Brühwürsten* ist es wichtig, die zu untersuchenden Lebensmittelallergene zunächst quantitativ und reproduzierbar aus der Matrix zu isolieren, ohne diese in ihrem allergenen Potenzial zu verändern.

In der Literatur finden sich verschiedene Methoden zur Proteinextraktion aus unterschiedlichen Matrices. Einige davon sind unter 4.1 bereits beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, die Gesamtproteine und speziell die vier Hauptallergene des Hühnereies Conalbumin, Ovalbumin, Ovomuroid und Lysozym möglichst quantitativ zu isolieren und keine einzelnen Proteine durch die Extraktion abzutrennen. Fällungsreaktionen einzelner Proteine oder Proteingruppen wie z.B. eine Trennung der Globulin- und Albuminfraktion des Eiklars mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Zur Extraktion von Proteinen aus pflanzlichen Lebensmitteln sind aufgrund des Vorkommens von proteinaktiven Substanzen wie Phenoloxidasen komplexere Methoden wie z.B. die Tieftemperatur-, „Acetonpulver“-Methode nach VIETHS et al. (1994) oder die Extraktion nach BJÖRKSTEN et al. (1980) nötig. Da im Hühnerei keine Enzyme abgetrennt werden müssen, welche nach der Extraktion Hühnereiproteine abbauen könnten, kann im Rahmen dieser Arbeit auf derart aufwändige Extraktionsmethoden verzichtet werden. Präzipitationsmethoden mit organischen Lösungsmitteln oder hohen Salzkonzentrationen („Aussalzung“ der Proteine) werden ebenfalls in der Literatur beschrieben [DÉSORMEAUX et al. 1992]. Da diese Methoden aber in der Regel zu einem Proteinverlust führen [VIETHS et al. 1994], wurden diese im Rahmen dieser Arbeit nicht angewandt. Eine Methode zur Proteinisolierung mittels Ionenaustauschchromatographie wurde von MARTINEZ et al. (1997) beschrieben. Da diese Methode zu einem Verlust von Proteinen mit einem pI > 8,8 führt, ist sie für die Hühnereiallergenanalytik nicht geeignet, da Lysozym einen pI von 10.7 aufweist.

Im Falle von tierischen Lebensmitteln wurden in der Literatur häufig durch einfache Inkubationen des Lebensmittels in Pufferlösungen Extrakte mit ausreichend hohem Proteingehalt erzielt [PASTORELLO & TRAMBAIOLI 2001]. Proteine aus Hühnerei wurden von LANGELAND (1982b) mit demselben Volumen physiologischer Kochsalzlösung vier Stunden extrahiert, zentrifugiert und der Überstand für weitere Untersuchungen verwendet. Diese Methode wurde durch BERNHISEL-BROADBENT et al. (1994) modifiziert, indem sie Hühnerei über Nacht mit PBS extrahierten. WITTEMAN et al. (1994) extrahierten Proteine aus Austern, Krabben und Muscheln mit Wasser und einer anschließenden Dialyse. Nach einer Methode von BERKELMANN & STENSTEDT (1998) werden Proteine mittels 8 M Harnstofflösung aus der Matrix extrahiert und der Überstand nach Zentrifugation zur weiteren Analytik verwendet. HIROSE et al. (2004) extrahierten Proteine aus frisch homogenisiertem Probenmaterial mit dem gleichen Volumen 0,1 M Acetatpuffer. Das nichtionische Detergenz Tween 20 wird zur

Freisetzung von Proteinen aus Lipidkomplexen verwendet [FERNÁNDEZ et al. 1999], da es hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen mit anderen Molekülen eingeht.

Diese sechs im vorherigen Abschnitt genannten Extraktionsverfahren wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Anwendbarkeit in der Hühnereiallergen-Analytik untersucht (siehe 5.2). Für einen Vergleich der Quantität und Reproduzierbarkeit der Extraktionen wurden die Extraktionsmittel unter gleichen Bedingungen in Dreifachbestimmungen eingesetzt, um die Proteine aus frisch homogenisiertem Vollei zu extrahieren. Neben dem Ziel einer möglichst quantitativen Extraktion der Allergene aus der Matrix war es ebenso von Bedeutung, dass die Proteine des Hühnereies während der Extraktion nicht in ihrem allergenen Potenzial verändert werden. Zur Überprüfung des relativen allergenen Potenzials der hergestellten Extrakte wurde deshalb die Methode der EAST-Inhibition eingesetzt. Um die Proteine möglichst vollständig aus der Matrix zu extrahieren, wurde der Rückstand einer jeden Extraktion erneut mit demselben Gesamtvolumen des Extraktionsmittels extrahiert. Die relativen Proteingehalte der Extraktion 1 und 2 wurden mittels der Methode nach BRADFORD (1976) bestimmt. Da der Proteingehalt der jeweils 2. Extraktion nur etwa 5 - 10 % der jeweils 1. Extraktion ausmachte, wurde auf eine 3. Extraktion verzichtet.

Als Kontrolle für die Quantität der Proteingehalte in den Extrakten wurde eine Lösung von Vollei in Wasser hergestellt und ohne vorherige Extraktion der relative Proteingehalt mit der Methode nach BRADFORD (1976) bestimmt. Der ermittelte mittlere Kontrollwert betrug 40,42 mg/g. Der Proteingehalt eines Volleies entspricht nach SOUCI et al. (1991) 106-124 mg/g. Daraus wird deutlich, dass das mit der Methode nach BRADFORD (1976) gemessene Ergebnis nur etwa ein Drittel des Literaturwertes ausmacht. Die Ursache dafür wurde bereits unter 4.2 beschrieben. Diese Methode zur Bestimmung des Proteingehaltes gewährleistet aufgrund unterschiedlicher Responsefaktoren verschiedener Proteine keine absolute, sondern nur eine relative Quantifizierung der Proteine. Prinzipiell kann die Kalibration der Methode mit jedem homogenen und möglichst reinen Proteinpräparat vorgenommen werden. Rinderserumalbumin führt laut einer Studie von TAL et al. (1980) im Vergleich zu den meisten anderen Proteinen zu einer deutlich höheren Farbintensität. Hierdurch wird der wahre Proteingehalt in den Proben systematisch unterschätzt. Zur Überprüfung des Kontrollwertes wurde dieser deshalb zusätzlich mit der Methode nach § 64 LFGB, ASU Nr. L 06.00-7 (2006) (siehe 4.3) bestimmt. Der ermittelte mittlere Proteingehalt der Kontrolle von 110,71 mg/g liegt nach dieser Methode innerhalb der in der Literatur [SOUCI et al. 1991] angegebenen Spanne des Proteingehaltes von Vollei (106 - 124 mg/g). Somit wurde der nach der Methode von BRADFORD (1976) ermittelte Proteingehalt des Kontrollwertes als 100 % bezeichnet, und alle weiteren ermittelten Proteingehalte der Extrakte wurden darauf bezogen.

Nach DIN 53804 (Ausreißertest nach Dixon) ergaben sich für die Messwerte der Gesamtproteingehalte der jeweiligen Dreifachbestimmungen keine Ausreißer. Die Verfahrensvariationskoeffizienten der Dreifachbestimmungen sind mit 0,55 % bis

3,74 % relativ gering, somit liegen die relativen Standardabweichungen vom jeweiligen Mittelwert für die verwendeten Extraktionsverfahren alle in einem für die Methoden adäquaten Bereich.

Auffällig hoch ist der mittlere Proteingehalt der Extrakte mit 8 M Harnstofflösung (Nr. 4), der einen Proteingehalt von mehr als dem 1,5fachen des Kontrollwertes aufweist. Der  $C_{50}$ -Wert der Inhibitionskurve zur Bestimmung des relativen allergenen Potenzials der Lösung beträgt 26,3  $\mu\text{g/mL}$  und ist folglich um mehr als das 65-fache des  $C_{50}$ -Wertes der Kontrolllösung verringert. Somit wird deutlich, dass das allergene Potenzial des Harnstoffextraktes während der Extraktion signifikant herabgesetzt wurde und deshalb die 8 M Harnstofflösung für die Extraktionen im Rahmen dieser Arbeit nicht geeignet ist.

Die Methode zur Bestimmung des relativen Gesamtproteingehaltes mit der Methode von BRADFORD (1976) basiert auf der Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie brilliant blue G-250 sich an Proteine zu binden, wobei sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt [BRADFORD 1976; COMPTON & JONES 1985]. Der Farbstoff besitzt eine Affinität zu basischen (Histidin, Lysin) und aromatischen (Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin) Aminosäuren. Die Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) wird durch die Gegenwart verschiedener Reagenzien beeinflusst, die Wechselwirkungen mit dem Farbstoff oder den Proteinen eingehen können [COMPTON & JONES 1985]. Tabelle 6.1 zeigt die Konzentrationen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Reagenzien zur Herstellung der Extraktionsmittel und die Konzentrationen, die erfahrungsgemäß in verschiedenen Studien zu Störungen der Proteinbestimmung geführt haben [SEDMAK & GROSSBERG 1977; SPECTOR 1978; PIERCE & SUELTER 1977; BEARDEN 1977; COMPTON & JONES 1985; MERCK 2006].

*Tabelle 6.1: Konzentrationen verschiedener Reagenzien, die zu Störungen der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) führen können*

<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration die zur Störung führen kann</b>	<b>in dieser Arbeit verwendete Konzentration</b>
NaCl	> 5 M	0,15 M
Tween 20	> 0,5 %	0,2 %
Natriumacetat	> 0,5 M	0,1 M
Harnstoff	> 6 M	8 M

Aus der Tabelle 6.1 wird deutlich, dass die Extraktionsmittel, welche NaCl, Tween 20 oder Natriumacetat enthalten, im Rahmen dieser Arbeit in Konzentrationen eingesetzt wurden, die deutlich unter den hier angegebenen Konzentrationen liegen, die in verschiedenen Studien zu Störungen bei der Proteinbestimmung nach der Methode von BRADFORD (1976) geführt haben. Es wird deshalb nicht davon ausgegangen, dass bei diesen Bestimmungen extraktionsmittelabhängige Störungen der Proteinbestimmung stattgefunden haben. Harnstoff wurde allerdings - in Anlehnung an die von BERKELMANN & STENSTEDT (1998) vorgeschlagene Methode zur Proteinextraktion - in einer Konzentration im Extraktionsmittel eingesetzt, die nach MERCK (2006) in einer Studie zu Störungen der Proteinbestimmung nach der Methode von BRADFORD (1976)

fürte. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich Blindwerte (Leerwerte ohne Proteine) mit 8 M Harnstofflösung vermessen (siehe 8.3.1). Diese machen im Vergleich zu den gemessenen Proteingehalten der Extrakte in 8 M Harnstofflösung ( $> 6000$  mg/L, siehe Tabelle 8.2a) aber nur einen sehr geringen Anteil (von 19,85 mg/L) aus. Die Bestimmung eines zu hohen Proteingehaltes von 155,77 % im Vergleich zum Kontrollwert (siehe Bild 5.2) kann daher nicht durch das Auftreten von zu hohen Blindwerten der 8 M Harnstofflösung - durch Wechselwirkungen von Harnstoff mit Coomassie brilliant blue G250 - herrühren. Vielmehr werden hier Wechselwirkungen von Harnstoff mit den zu extrahierenden Proteinmolekülen in Gegenwart von Coomassie brilliant blue G250 vermutet, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden. Harnstoff ( $\geq 6$  M) ist in der Lage, Eiklarproteine in eine globuläre, teilweise denaturierte Form umzusetzen, welche einer ursprungsähnlichen Struktur entsprechen. Während eine Harnstoffbehandlung in einer Studie von MINE und ZHANG (2002) keine Auswirkungen auf die IgE-Bindungsaktivitäten von Ovalbumin und Ovomuroid zeigten, ergaben sich bei Conalbumin und Lysozym signifikant höhere Bindungsaktivitäten zu humanem IgE als bei nativen Formen. Dies konnte im Rahmen dieser Studie nicht bestätigt werden, da der mittels EAST-Inhibition untersuchte Harnstoffextrakt hier im Vergleich zum Kontrollwert ein signifikant geringeres allergenes Potenzial zeigte.

Aus den gemessenen Proteingehalten der weiteren Extrakte wird deutlich, dass mit diesen Extraktionsmitteln jeweils nur ein Teil der im Vollei vorkommenden Proteine extrahiert werden konnte. Die Ergebnisse der EAST-Inhibitionen zeigen aber, dass alle Extrakte (außer dem Harnstoffextrakt) Inhibitionskurven mit  $C_{50}$ -Werten von  $0,4$   $\mu\text{g/mL}$  aufweisen und somit dem allergenen Potenzial der Kontrolle entsprechen. Den höchsten Proteingehalt liefert - mit durchschnittlich 75,9 % des Kontrollwertes - die Extraktion mit PBS. Nach DIN 55303 (Vergleich von zwei Mittelwerten) ist der mittlere Proteingehalt der PBS-Extrakte signifikant höher als der der Tween 20-Extrakte mit dem zweithöchsten Proteingehalt. Die Proteingehalte der Extrakte nehmen weiterhin in der Reihenfolge 0,15 M NaCl-Lösung  $>$  bidest. Wasser  $>$  0,1 M Acetatpuffer pH 3,8 bis hin zu einem Proteingehalt von 63,5 % ab.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird PBS zur Extraktion der vier Hauptallergene des Volleies als das von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Extraktionsmitteln am besten geeignete beurteilt und für die folgende Analytik als Extraktionsmittel eingesetzt.



## 6.3 Technologisch verändertes Vollei zum Einsatz in Fertigprodukten

Da das Hühnereiprotein Ovomuroid zu den hitzestabilen Allergenen gehört und starke Hitzeeinwirkung zu Einbußen der technologischen Eigenschaften von Eiern führen kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Kombination von Proteolyse und mäßiger Hitzeeinwirkung (< 90 °C) zur Denaturierung gewählt. Die Untersuchungen zur Veränderung der Proteine und des allergenen Potenzials von Vollei durch diese Kombination von Erhitzungs- und Proteolyseschritten wurde mittels elektrophoretischer, immunochemischer und massenspektrometrischer Methoden untersucht. Ziel dieser technologischen Veränderungen war es, *Vollei zum Einsatz in Fertigprodukten* - wie z.B. Puddingspeisen - herzustellen, das in seinem allergenen Potenzial reduziert und somit für den Verbraucher verträglicher ist. Dabei sollte das technologisch veränderte Vollei im Vergleich zu dem lediglich durch Pasteurisation behandelten Vollei zum Einsatz in Fertigprodukten keine wesentlichen Nachteile im Hinblick auf sensorische und technologische Eigenschaften aufweisen.

### 6.3.1 Voraussetzungen für die MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen

Für die MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen ausgewählter Prozessstufen erfolgte zunächst eine Optimierung der Visualisierung der Proteine im 2D-Elektrophoresegele. Es wurde dazu ein Vergleich zweier Färbemethoden nach NEUHOFF et al. (1988) und LANNE und PANFILOV (2004) unternommen, die im Wesentlichen aus den in Tabelle 6.2 dargestellten Arbeitsschritten bestehen. Aus den Ergebnissen dieser Färbemethoden wird deutlich, dass eine Fixierung der Proteine vor der Färbung - im Vergleich zur Färbung mit anschließender Fixierung - zu einer deutlichen Reduzierung der Hintergrundfärbung des Elektrophoresegeles führt. Eine Kombination beider Methoden wurde durchgeführt, wobei der Methode nach NEUHOFF et al. (1988) ein zweiter Fixierschritt der Proteine vorangestellt wurde und der gesamte Vorgang lediglich einmal durchgeführt und nicht dreimal wiederholt wurde.

Tabelle 6.2: Vergleich der Arbeitsschritte zweier Proteinfärbemethoden mit colloidalem CBB

NEUHOFF et al. (1988)	LANNE und Panfilov (2004)
Waschen	Fixieren
Färben	Waschen
Inkubieren	Inkubieren
Waschen	Färben
Fixieren	Inkubieren
Vorgang 3x wiederholen	Waschen

Durch diese Kombination beider Methoden konnte die Hintergrundfärbung weiter reduziert werden, ohne dass die Schärfe der Proteinbandenfärbung negativ beeinträchtigt wurde. Es

wird vermutet, dass die Fixierung der Proteine vor der Färbung neben dem Schutz vor dem Auswaschen der Proteine außerdem zu einem Auswaschen anderer eventuell bei der Färbung störender Substanzen führt [NEUHOFF et al. 1988].

Aufgrund des hohen Auflösungsvermögens der 2D-Elektrophorese wird vielfach davon ausgegangen, dass ein Spot genau eine Proteinspezies enthält. Dies ist jedoch nicht

immer der Fall. Einerseits können Proteine in verschiedenen Spots über ein Gel verteilt auftreten, andererseits können Spots aus mehreren Komponenten bestehen. Automatische Datenbankrecherchen führen aber meist nur zur Identifizierung der Hauptkomponente eines Spots. Die Suche nach weiteren Komponenten ist sehr aufwändig und derzeit nicht automatisiert möglich [SCHMIDT et al. 2003]. Als Ergebnis im Rahmen dieser Arbeit wird deshalb für jeden Spot im 2D-Elektrophoresegele maximal ein mittels Datenbankrecherche ermitteltes Protein(bruchstück) angegeben. Ob es sich dabei tatsächlich in jedem Fall um ein reines Protein(bruchstück) oder um eine Mischung mehrerer Protein(bruchstück)e handelt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt.

### **6.3.2 Untersuchungen des technologisch veränderten Volleies zum Einsatz in Fertigprodukten**

Aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten elektrophoretischen und immunochemischen Untersuchungen des technologisch veränderten Volleies wird deutlich, dass die unter 3.1.1 dargestellte Verarbeitung innerhalb des Prozesses stufenweise zu einer deutlichen Veränderung der Proteine und ihrer allergenen Eigenschaften geführt hat.

Bei der Prozessstufe Nr. 1 handelt es sich um das pasteurisierte Vollei. Bei einer Pasteurisierung wird Vollei kurzzeitig (wenige Sekunden) auf 60 bis 90 °C erhitzt, um Salmonellen zuverlässig abzutöten, ohne dabei den Geschmack und die Konsistenz des Volleies bedeutend zu verändern. Laut Studien von KREFT et al. (1995) handelt es sich bei Lysozym um ein stark hitzelabiles Allergen, was durch die Untersuchungen der Prozessstufe Nr. 1 des Volleies bestätigt werden konnte. Lysozym konnte im Rahmen dieser Arbeit in Prozessstufe Nr. 1 - im Vergleich zu dem unveränderten Vollei aus den Extraktionsversuchen (hier nicht dargestellt) - sowohl mittels Silber- als auch mittels Immunfärbung bereits nicht mehr nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf eine massenspektrometrische Untersuchung von Lysozym verzichtet. Im Rahmen der 2D-elektrophoretischen Auftrennungen der Prozessstufen 1, 3 und 9 für die anschließenden MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen wurden deshalb Elektrophoresegele zur isoelektrischen Fokussierung im Bereich von pH 3 bis 7 verwendet (Lysozym: pI = 10,7), um Proteine in diesem pI-Bereich (Conalbumin: pI = 6,0 - 6,8; Ovalbumin: pI = 4,5 - 4,9; Ovomuroid: pI = 4,1 - 4,4) besser auftrennen zu können. Allergene in den Massenbereichen der - neben Lysozym - weiteren drei Hauptallergene (CA, OA und OM) des Volleies konnten in der Prozessstufe Nr. 1 sowohl mittels Silber- als auch mittels Immunfärbung in dem Elektropherogramm der SDS-PAGE deutlich nachgewiesen werden. Weitere Proteine oder neue Bruchstücke der Proteine konnten in dieser Stufe mittels SDS-PAGE nicht detektiert werden. Mit Hilfe der 2D-Elektrophorese und anschließenden massenspektrometrischen Untersuchungen dieser Prozessstufe konnten neben Conalbumin, Ovalbumin und Ovomuroid außerdem Ovoinhibitor und ein Bruchstück von Vitellogenin identifiziert werden (siehe auch 2.5). Da die zwei letztgenannten Proteine in der 2D-Elektrophorese ähnliche Massen wie Ovalbumin

aufweisen, konnten sie in der SDS-PAGE nicht als einzelne Banden identifiziert werden. Beide Proteine stehen nicht im Fokus dieser Arbeit, da sie als kaum allergen gelten [JÄGER & WÜTHRICH 2002], was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt, da für diese im zweidimensionalen Immunoblot keine IgE-Bindungsfähigkeit detektiert werden konnte. Conalbumin konnte mittels MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen eindeutig in drei Spots des 2D-Elektrophoresegels identifiziert werden. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Studien von DESERT et al. (2001) sowie RICHARDS & HUANG (1997) lässt vermuten, dass es sich dabei um die drei Isoformen des Proteins Conalbumin - Apo-Ovotransferrin (Spot Nr. 1), Fe-Ovotransferrin (Spot Nr. 2) und Fe<sub>2</sub>-Ovotransferrin (Spot Nr. 3) - handelt. Allergenes Potenzial wurde nur für die ersten beiden Formen des Conalbumins detektiert. IgE-Bindungsfähigkeit der dritten Isoform von Conalbumin, die in der Coomassiefärbung von den drei Isoformen am schwächsten detektiert wurde, konnte wahrscheinlich aufgrund der eingeschränkten Detektionsstärke des verwendeten Serenpools (siehe 6.1) nicht nachgewiesen werden. Ovalbumin konnte mittels MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen in der Prozessstufe Nr. 1 eindeutig in drei Spots und mit - wahrscheinlich durch den Vorgang der Pasteurisierung - abgespaltenen Säuregruppen in weiteren zwei Spots identifiziert werden. Bei zwei der drei erstgenannten - mit colloidalem Coomassie sehr schwach angefärbten - Spots wird vermutet, dass es sich dabei lediglich um Schlierenbildung des am stärksten detektierten Ovalbuminspots handelt. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Studien von DESERT et al. (2001) - bei denen es ebenfalls zu einer Schlierenbildung durch Überladung des Elektrophoresegels kommt - bestätigt diese Ergebnisse. Allergenes Potenzial wurde nur für den Hauptspot des Ovalbumins und für einen der Spots von Ovalbumin mit abgespaltenen Säuregruppen detektiert. Ovomuroid konnte mittels MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen eindeutig in vier Spots identifiziert werden. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Studien von DESERT et al. (2001) sowie BIER et al. (1953) lässt vermuten, dass es sich dabei um vier von fünf Isoformen des Ovomuroids handelt. Allergenes Potenzial konnte für alle vier im 2D-Elektrophoresegel angefärbten Spots des Ovomuroids detektiert werden. Drei der im 2D-Elektrophoresegel detektierten Spots konnten weder mittels MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen noch durch den Vergleich mit den Studien von DESERT et al. (2001) sicher einem Protein des Hühnereies zugeordnet werden. Bei zwei dieser drei Spots konnte IgE-Bindungsfähigkeit detektiert werden.

Die Prozessstufe Nr. 2 wurde nach dem Pasteurisieren zehn Minuten unter Rühren erhitzt. In den Elektropherogrammen der SDS-PAGE konnten weder bei der Silberfärbung noch im Immunoblot signifikante Unterschiede in Muster und Stärke der Proteinbanden festgestellt werden. Die Ergebnisse der EAST-Inhibition zeigen aber eine leichte Abnahme der IgE-Bindungsfähigkeit in der Prozessstufe Nr. 2 im Vergleich zu Nr. 1.

Die deutlichsten Veränderungen im Proteinmuster (siehe Bild 5.4) treten innerhalb des technologischen Prozesses während des ersten Proteolyseschlittes (Prozessstufen Nr. 3 und 4) auf. Aus dem Immunoblot der SDS-PAGE der einzelnen Prozessstufen des

Volleies (Bild 5.5) wird deutlich, dass während des ersten Proteolyseschlittes die Hauptallergene Conalbumin, Ovalbumin und Ovomuroid bereits teilweise verändert (abgebaut) wurden und zahlreiche Bruchstücke entstanden sind, die immer noch allergenes Potenzial aufweisen. Im Massenbereich von Ovomuroid konnte keine Proteinbande mit allergenem Potenzial detektiert werden. Mit Hilfe der 2D-elektrophoretischen Auftrennungen der Prozessstufe Nr. 3 und der anschließenden MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen konnten - neben dem bereits in der 1. Prozessstufe detektierten Hauptspot sowie zwei Spots von Ovalbumin mit abgespaltenen Säuregruppen - vier neue Ovalbumin-Bruchstücke unterschiedlicher Molekülmassen detektiert werden. Allergenes Potenzial zeigt hier aber nur der Hauptspot. Für Conalbumin treten neben den bereits in der 1. Prozessstufe identifizierten Spots der drei Isoformen zwei neue Bruchstücke auf, welche kein allergenes Potenzial aufweisen. Ovomuroid konnte mittels 2D-Elektrophorese nicht nachgewiesen werden. Gleiches gilt für die in der Prozessstufe Nr. 1 identifizierten Proteine Ovoinhibitor und Bruchstücke von Vitellogenin. Ovomuroid gilt aber laut verschiedener Studien [TAKAGI et al. 2003; FU et al. 2002; URISU et al. 1997; KOVACS-NOLAN et al. 2000 und BESLER et al. 1999] als relativ unempfindlich gegenüber Proteolyse mit verschiedenen Enzymen. Da das mittels EAST-Inhibition bestimmte gesamte allergene Potenzial der Prozessstufe Nr. 3 im Vergleich zur Prozessstufe Nr. 2 kaum abgenommen hat, kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass neu entstandene potenziell allergene Bruchstücke von Ovomuroid aufgrund einer geringen Molekülgröße oder eines isoelektrischen Punktes  $> 7$  mittels 2D-Elektrophorese nicht erfasst werden konnten.

Eine deutliche Reduzierung des allergenen Potenzials konnte mittels EAST-Inhibition für die Prozessstufen Nr. 5 bis 9 festgestellt werden. Durch die Hitzebehandlung in den Prozessstufen Nr. 5 und 8 kann die konformationelle Struktur eines Allergens durch den Verlust der Tertiärstruktur und Aggregation verändert werden [BESLER et al. 2000]. Zahlreiche Studien beschreiben, dass erhitzte Hühnereier eine deutlich niedrigere oral-sensitve Kapazität aufweisen als native Eier [PENG et al. 1998; MCLAUGHLAN et al. 1981; COOMBS & MCLAUGHLAN 1984; LEE 1992; JEONG 1998]. Die IgE-Bindung von Eiklarallergenen konnte in einer Studie mit Eiklarallergikern von ANET et al. (1985) durch eine 10minütige Erhitzung der Probe bei 90 °C auf 58 % (Bestimmung mittels RAST, Radio Allergosorbent Test) gesenkt werden. Die 10minütige Erhitzung der Prozessstufe Nr. 5 auf 80 °C im Rahmen dieser Arbeit zeigt eine ebenfalls starke Reduzierung des allergenen Potenzials von mehr als dem 45fachen im Vergleich zu der Probe Nr. 4 und von mehr als dem 100fachen im Vergleich zu der Prozessstufe Nr. 1. Daraus wird deutlich, dass durch eine Kombination aus Proteolyse und Hitzebehandlung das allergene Potenzial eines Hühnereies stärker gesenkt werden kann als durch eine Hitzebehandlung allein. Ein weiterer Vorteil dieser Kombination ist, dass die Erhitzung schonender abläuft, da hierfür geringere Temperaturen eingesetzt werden können, um einen besseren Effekt auf die Reduzierung des allergenen Potenzials zu erhalten als in der Studie von ANET et al. (1985). Ein allergenes Potenzial von Conalbumin kann in der Prozessstufe Nr. 5 nicht mehr detektiert werden. Allein eine

Bande im Massenbereich von Ovalbumin sowie eine Bande im Massenbereich von 31 kDa zeigen im Immunoblot noch allergenes Potenzial. Dieses nimmt im Laufe des technologischen Prozesses bis hin zur Prozessstufe Nr. 9 zwar noch deutlich ab, Restallergenität kann aber auch in der letzten Prozessstufe (Nr. 9) mittels SDS-PAGE und Immunoblot noch detektiert werden. Mittels 2D-Elektrophorese und anschließenden MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen können in dieser Prozessstufe noch Conalbumin und verschiedene Bruchstücke von Ovalbumin detektiert werden. Ein allergenes Potenzial dieser Spots kann aber im Immunoblot des 2D-Elektrophoresegels der Prozessstufe Nr. 9 - aufgrund der geringeren Empfindlichkeit als im SDS-PAGE-Gel - nicht mehr nachgewiesen werden.

Speziell für Ovomuroid haben Forscher eine hohe Hitzestabilität und Proteolyseresistenz demonstriert [VIETHS et al. 1997; STEVENS & FEENEY 1963; DEUTSCH & MORTON 1956; MATSUDA et al. 1982; MATSUDA et al. 1983]. Trotzdem ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, durch eine spezielle Kombination von Proteolyse- und Erhitzungsschritten eine deutliche Reduzierung des allergenen Potenzials von mehr als dem 100fachen des pasteurisierten Volleies zu erzielen.

Signifikante Geschmacks- und Texturveränderungen nach der Verarbeitung des allergenreduzierten Volleies in einem Pudding konnten von einem Sensorikpanel unter Aufsicht der technologischen Partner des REDALL-Projektes - im Vergleich zu dem gleichen Pudding mit pasteurisiertem Vollei - kaum festgestellt werden.

## 6.4 Technologisch verändertes Volleipulver als Additiv in Brät zur Herstellung von Brühwürsten

Volleipulver wird aus technologischen Gründen als Additiv zu verschiedenen Lebensmitteln während der Herstellung zugesetzt (siehe 2.4 und 2.5.3). Studien zeigen, dass die Matrix eines Lebensmittels während einer technologischen Behandlung einen Einfluss auf das allergene Potenzial eines Inhaltsstoffes haben kann [LEDUC et al. 1999; KATO et al. 2001] (siehe auch 2.6.4). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit das allergene Potenzial eines technologisch veränderten Modelllebensmittels untersucht. Als Modell diente dazu ein mit 1% Volleipulver versetztes Brät zur Herstellung von Brühwürsten.

Als technologische Veränderungen wurden verschiedene Hochdruck- und/oder Hitzebehandlungen angewandt (siehe 3.1.2). Die Hitzebehandlungen erfolgten dazu analog einer typischen industriellen Herstellung von frischer Ware, Dreiviertel- ( $F = 1$ ), Voll- ( $F = 3$ ) und Tropenkonserven ( $F = 12$ ). Rohes Fleisch und thermisch unbehandeltes Brät zeigten in einer Studie von SCHÖBERL (1999) nach einer Hochdruckbehandlung bei  $> 300$  MPa eine Inaktivierung der Enzyme, eine Texturverfestigung (durch vernetzende Koagulation der gelösten sarkoplasmatischen Proteine) und einen Verlust der nativen roten Farbe (durch Autoxidation von Myoglobin zu braunem Metmyoglobin). Wie Hochdruck auf das allergene Potenzial von Lebensmitteln wirkt, ist bisher aber sehr wenig untersucht worden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Hochdruckbehandlungen erfolgten bei einem Druck von 600 MPa, da Studien von JANKIEWICZ et al. (1997) sowie von SCHEIBENZUBER (2002) Veränderungen des allergenen Potenzials verschiedener pflanzlicher Lebensmittel durch Hochdruckbehandlungen bei  $> 300$  MPa bzw. 600 MPa zeigten.

Die Untersuchungen zur Veränderungen der Volleiproteine und des allergenen Potenzials von Vollei durch diese Erhitzungs- und Hochdruckbehandlungen wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels elektrophoretischer und immunochemischer Methoden unternommen.

Aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten elektrophoretischen und immunochemischen Untersuchungen des nach 3.1.2 technologisch veränderten Volleies in Brät wird deutlich, dass eine zunehmende Hitzebehandlung sowie die Anwendung von Hochdruck zu einer deutlichen Veränderung der Volleiproteine und ihrer allergenen Eigenschaften geführt hat.

Durch die Hitzebehandlungen der Probe konnte bei  $70^{\circ}\text{C}$  mittels EAST-Inhibition eine Reduktion des allergenen Potenzials um das 1,5fache im Vergleich zur unerhitzten Probe analysiert werden. Durch alle weiteren Erhitzungsschritte ( $F = 1$ ,  $F = 3$ ,  $F = 12$ ) wurde das allergene Potenzial der Probe so stark reduziert, dass mittels EAST-Inhibition kein  $C_{50}$ -Wert mehr bestimmt werden konnte. Eine Tendenz der Abnahme des allergenen Potenzials von der Erhitzung auf  $F = 1$  über  $F = 3$  bis hin zu  $F = 12$  ist

deutlich an dem Verlauf der Kurven der EAST-Inhibition (siehe Bild 5.16) zu erkennen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen des Immunoblots überein.

Lysozym konnte im Immunoblot weder im Volleipulver (Positivvergleich) noch in den technologisch veränderten Proben detektiert werden. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass das allergene Potenzial von Lysozym bereits bei der Herstellung des Volleipulvers zerstört wurde, da dort ein Pasteurisationsschritt angewandt wurde (siehe dazu auch 6.3.2). Dem Immunoblot ist außerdem zu entnehmen, dass zuerst das allergene Potenzial von Conalbumin während der Erhitzung der Probe reduziert wird. Das allergene Potenzial im Massenbereich von Ovalbumin und Ovomuroid nimmt erst bei stärkerer Temperatureinwirkung ( $F = 1$ ) langsam ab und ist im Immunoblot bei der Erhitzung der Probe mit einem F-Wert von 12 mit dem verwendeten Humansenepool gar nicht mehr zu detektieren. Es wird aber davon ausgegangen, dass das allergene Potenzial der Probe durch die Erhitzung auf einen F-Wert von 12 nicht komplett reduziert werden konnte, da durch die Methode der EAST-Inhibition noch allergenes Restpotenzial detektiert werden konnte.

Mit der Methode der EAST-Inhibition wurde deutlich, dass die Hochdruckbehandlung der Probe zu einer Reduktion des allergenen Potenzials des Volleipulvers um das 3,3fache im Vergleich zur unbehandelten Probe führte. Die Auswirkung durch die Anwendung von Hochdruck auf die Reduktion des allergenen Potenzials des Volleipulvers in Brät ist somit um das 2,5fache stärker als die Erhitzung der Probe auf 70 °C, aber deutlich schwächer als alle weiteren Hitzebehandlungen der Probe ( $F = 1$ ,  $F = 3$ ,  $F = 12$ ). Diese Ergebnisse stimmen mit denen des Immunoblots überein, bei denen deutlich schwächere Banden von Conalbumin, Ovalbumin und Ovomuroid als in der unbehandelten Probe detektiert werden konnten. Die Ergebnisse der Studien von JANKIEWICZ et al. (1997) und SCHEIBENZUBER (2002) bei der Hochdruckbehandlung verschiedener pflanzlicher Lebensmittel (siehe oben) zeigen ebenfalls eine Reduktion des allergenen Potenzials der untersuchten Proben. Die Studien von ILLGNER (2000) hingegen zeigen eine hochdruckinduzierte Erhöhung der Antigenität von  $\beta$ -Lactoglobulin anhand von ELISA-Tests mit spezifischen monoklonalen Hühnerantikörpern. Dies führt ILLGNER (2000) auf die durch die Druckbehandlung induzierte Erhöhung der frei zugänglichen Gesamtoberfläche der Aggregatstruktur zurück. Ob in diesem Zusammenhang klinische Relevanz besteht, ist jedoch nicht bekannt. Diese Ergebnisse zeigen aber, dass die Auswirkung der Hochdruckbehandlung auf das allergene Potenzial von Lebensmitteln für jedes Allergen in jeder Matrix unterschiedlich sein kann.

Durch die Kombinationen von Hitze- und Hochdruckbehandlungen konnte jeweils eine weitere Reduktion des allergenen Potenzials der Probe im Vergleich zur alleinigen Hitzebehandlung erzielt werden. Durch die anschließende Behandlung mit Hochdruck konnte das allergene Potenzial der zuvor auf 70 °C erhitzten Probe nochmals um das 6fache - und insgesamt um das 8,9fache im Vergleich zur unbehandelten Probe - reduziert werden. Somit wird deutlich, dass diese Kombination beider Behandlungen zu

einer fast doppelt so starken Reduktion des allergenen Potenzials führt wie die Summe beider einzelnen Behandlungen (1,3fach + 3,3fach = 4,6fach). Bei den weiteren Kombinationen von Hitze- und Hochdruckbehandlung können diese synergistischen Effekte nicht detailliert analysiert werden, da die  $C_{50}$ -Werte der EAST-Inhibition aufgrund eines insgesamt sehr geringen allergenen Potenzials nicht messbar waren. Diese Ergebnisse stimmen tendenziell mit denen des Immunoblots überein.

Eine Untersuchung, ob die Reihenfolge der technologischen Behandlungen von Bedeutung für die Stärke der Reduktion des allergenen Potenzials ist, erfolgte mit den Proben, die auf einen F-Wert von 12 erhitzt wurden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im allergenen Potenzial dieser Proben, wobei die Probe, die zuerst erhitzt und dann mit Hochdruck behandelt wurde, tendenziell etwas stärker im allergenen Potenzial reduziert werden konnte als die Probe, die zunächst mit Hochdruck und anschließend mit Hitze behandelt wurde.

## 6.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen verschiedener technologischer Behandlungen auf das allergene Potenzial von Vollei mittels *in vitro* Tests untersucht.

Nach GEHA (1995) ist zur gesicherten Einteilung in Haupt- und Nebenallergene ein Patientenkollektiv von mehr als 50 Individuen nötig. Aufgrund der relativ geringen Anzahl von 20 (bzw. 11) Seren von Eiklarallergikern können die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen dieser Arbeit deshalb nur als Tendenz angesehen werden und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Rahmen des „REDALL“-Projektes in weiteren Studien zusätzlich *in vivo* mittels doppelblinder placebo-kontrollierter Expositionstests (DBPCFC) in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität München (Abteilung für Dermatologie und Allergologie), dem Universitätshospital Zürich (Allergiestation, Dermatologische Klinik), dem Macedonio Melloni Hospital Mailand (Abteilung für Pädiatrie) und der Universität Wien (Abteilung für Pädiatrie und Juvenile Medizin) abgesichert.

Eine *in vitro* Verdauung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten technologisch veränderten Volleiprüben könnte im Vorfeld Informationen darüber liefern, ob die in ihrem allergenen Potenzial reduzierten Proben den Magen passieren können, ohne ihre IgE-bindenden Eigenschaften zu verlieren. Dadurch könnte geklärt werden, ob die stark technologisch veränderten Allergene des Volleies stabil gegenüber einem proteolytischen Verdau - und somit zur Sensibilisierung über den Gastrointestinaltrakt befähigt - sind.



## 7 Zusammenfassung/Summary

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen von in der Lebensmittelindustrie anwendbaren technologischen Behandlungen auf das allergene Potenzial der vier Hauptallergene des Hühnereies: Conalbumin, Ovalbumin, Ovomuroid und Lysozym. Gegenstand der Untersuchungen waren Zwischen- und Endprodukte eines Prozesses von technologisch verändertem *Vollei zum Einsatz in Fertigprodukten* sowie von technologisch verändertem *Volleipulver als Additiv in Brät zur Herstellung von Brühwürsten*. Mit Hilfe des zuletzt genannten Prozesses sollten zusätzlich modellhaft mögliche vorhandene Matrixeinflüsse auf das allergene Potenzial der Eiroteine während der technologischen Veränderungen untersucht werden. Diese Proben wurden von technologischen Partnern des REDALL-Projektes (Reduced Allergenicity of Processed Food, QLK1-CT-2002-02687) in zwei Verarbeitungsprozessen mittels Hitze- und Hochdruckeinwirkung sowie mittels Hitzeinwirkung und enzymatischer Hydrolyse behandelt. Die analytischen Untersuchungen erfolgten *in vitro* unter Verwendung elektrophoretischer, immunologischer und massenspektrometrischer Verfahren (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, Isoelektrische Fokussierung, zweidimensionale Elektrophorese, Immunoblot, Enzymallergosorbent-Test (EAST)(-Inhibition) und Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight<sup>2</sup>).

Für die immunologischen Untersuchungen wurde ein – aus 11 Einzelseren bestehendes - humanes Poolserum eingesetzt. Alle Einzelseren des Pools wiesen spezifische Immunglobulin E (IgE)-Gehalte der EAST-Klassen  $\geq 2$  gegen die vier Hauptallergene des Hühnereies auf. Da in zahlreichen Studien mehr als 50 % der getesteten (auf Hühnerei allergischen) Patienten spezifische IgE-Antikörper gegen Lysozym aufweisen, zählt dieses Protein zu den Hauptallergenen des Hühnereies. Im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit konnte Lysozym aber nur mit 15 % der Einzelseren detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass 11 Seren für eine repräsentative Aussage über die IgE-Verteilung bei Hühnereiallergikern nicht ausreichen und dass zur gesicherten Einteilung in Haupt- und Nebenallergene ein größeres Patientenkollektiv (von mindestens 50 Individuen) nötig ist. Die drei weiteren Hauptallergene konnten mit 80 % (Ovalbumin), 80 % (Ovomucoid) und 60 % (Conalbumin) der Seren detektiert werden. Da sich der verwendete Serenpool aus 11 Einzelseren zusammensetzte, können die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen dieser Arbeit nur als Tendenz angesehen werden.

Für die Allergenanalytik war neben den genannten Untersuchungsmethoden eine im Vorfeld durchgeführte Aufarbeitung zur Abtrennung der Hauptallergene von der jeweiligen Matrix von Interesse. Für dieses Ziel wurde die Anwendbarkeit von sechs verschiedenen Extraktionsverfahren in Hinblick auf die Hühnereiallergenanalytik getestet. Neben dem Ziel einer möglichst quantitativen Extraktion der Allergene aus der Matrix war es ebenso von Bedeutung, dass die Proteine des Hühnereies während der Extraktion

nicht in ihrem allergenen Potenzial verändert wurden. Diese Anforderungen wurden mittels Proteinbestimmung nach Bradford und nach § 64 LFBG, ASU Nr. L 06.00-7 sowie der Methode der EAST-Inhibition überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass eine Extraktion mit 8 M Harnstofflösung zu Störungen der Proteinbestimmung mit der Methode nach Bradford führte und dass das allergene Potenzial der Hühnereiproteine während der Extraktion mit 8 M Harnstofflösung signifikant herabgesetzt wurde. 8 M Harnstofflösung war somit für die Extraktionen im Rahmen dieser Arbeit nicht geeignet. Mit allen weiteren Extraktionsmitteln konnten adäquate Proteingehalte des Volleies extrahiert werden. Den signifikant höchsten Proteingehalt lieferte eine Extraktion mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (75,9 %), gefolgt von Tween 20-Lösung, 0,15 M physiologischer Kochsalz-Lösung, bidestilliertes Wasser und 0,1 M Acetatpuffer (63,5 %). Die Ergebnisse zeigen, dass keiner dieser Extrakte durch die eingesetzten Extraktionsmittel (außer 8 M Harnstofflösung) in seinem allergenen Potenzial verändert wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde phosphatgepufferte Kochsalzlösung zur Extraktion der vier Hauptallergene des Volleies für die folgende Analytik als Extraktionsmittel eingesetzt.

Die Untersuchungen des technologisch veränderten *Volleies zum Einsatz in Fertigprodukten* ergaben, dass die Behandlung innerhalb des angewendeten Prozesses mit zwei enzymatischen Hydrolyseschritten und verschiedenen Erhitzungen stufenweise zu einer deutlichen Veränderung der Proteine und ihrer allergenen Eigenschaften führten. Eine eindeutige Reduzierung des allergenen Potenzials von mehr als dem 100fachen im Vergleich zu der unbehandelten Probe konnte nach einer auf den ersten Hydrolyseschritt folgenden 10minütigen Erhitzung der Probe bei 80 °C festgestellt werden, bei der allergenes Potenzial von Conalbumin bereits nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Es wurde deutlich, dass durch eine Kombination aus Proteolyse und Hitzebehandlung das allergene Potenzial eines Hühnereies stärker und schonender gesenkt werden konnte als durch eine Hitzebehandlung allein. Nur Ovalbumin und Ovomuroid zeigten in dieser Prozessstufe noch allergenes Potenzial. Dieses nahm im Laufe des technologischen Prozesses bis hin zur letzten Prozessstufe zwar deutlich ab, allergenes Restpotenzial konnte aber auch dort noch detektiert werden. Trotz der hohen Hitzestabilität und Proteolyseresistenz von Ovomuroid ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, durch eine spezielle Kombination von Proteolyse- und Erhitzungsschritten eine deutliche Reduzierung des allergenen Potenzials von mehr als dem 100fachen des pasteurisierten Volleies zu erzielen, ohne dass signifikante Geschmacks- und Texturveränderungen festgestellt werden konnten.

Aus den Untersuchungen des technologisch veränderten *Volleipulvers zum Einsatz als Additiv in Brät zur Herstellung von Brühwürsten* wurde deutlich, dass eine zunehmende Hitzebehandlung (70 °C, F = 1, F = 3, F = 12) sowie die Anwendung von Hochdruck (600 MPa) zu einer deutlichen Veränderung der Volleiproteine und ihrer allergenen Eigenschaften geführt haben. Das allergene Potenzial im Massenbereich von Ovalbumin und Ovomuroid nahm (im Gegensatz zu dem hitzeempfindlicheren Conalbumin) erst bei stärkerer Temperatureinwirkung (F = 1) langsam ab und war bei

der Erhitzung der Probe mit einem F-Wert von 12 mit dem verwendeten Humanserenpool kaum noch zu detektieren. Die Behandlungen der Probe mit Hitze und Hochdruck wiesen synergistische Effekte in der Reduzierung des allergenen Potenzials auf, da die Kombination aus der Behandlung mit 70 °C und 600 MPa zu einer fast doppelt so starken Reduktion des allergenen Potenzials führte, wie die Summe beider einzelnen Behandlungen.

The aim of this study was to analyse technological treatments used in food industry to determine their effect on the allergenic potential of the four major hen's egg allergens: conalbumin, ovalbumin, ovomucoid and lysozyme. The investigation focused on the intermediate and final products of the processing of *whole egg for use in convenience products* as well as of *powdered whole egg used as an additive in meat preparations for the production of boiled sausages*. Using the aforementioned processing techniques, the aim was to find representative results regarding potential matrix effects on the allergenic potential of egg proteins during the treatment. These samples were subjected to two common manufacturing processes, one a combination of heat and high pressure and the other a combination of heat and enzymatic hydrolysis, by technological partners of the REDALL-project (Reduced Allergenicity of Processed Food, QLK1-CT-2002-02687). The experiments were carried out *in vitro* with electrophoretical, immunological, and mass spectrometrical methods (Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamid gelelectrophoresis, Isoelectric Focussing, two dimensional electrophoresis, Immuno blotting, Enzyme Allergosorbent Test (EAST) (inhibition), and Matrix assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight<sup>2</sup>).

For the immunological investigation a human serum pool consisting of 11 individual sera was used. Every human serum was EAST class  $\geq 2$  when tested for specific immune globuline E (IgE) against the four major egg allergens. Since numerous studies demonstrate that more than 50 % of the tested patients (who are allergic to egg) have specific IgE antibodies against lysozyme, this protein is classified as a major egg allergen. However, within the scope of this study lysozyme could only be detected in 15 % of the human sera. This result shows that 11 sera are not sufficient to provide conclusive evidence of the prevalence of specific IgE in individuals with egg allergies. For a valid classification of major and minor allergens, testing needs to include sera from a larger patient sample (sera from at least 50 people). The other three major allergens could be detected with 80 % (ovalbumin), 80 % (ovomucoid), and 60 % (conalbumin) of the patients' sera. Since the used sera pool consists of 11 individual sera the results of these immunological investigations of this study can only be considered as a tendency.

Besides the above-mentioned research methods, a previously conducted method for separating the major allergens and the egg matrix was of special interest for the allergen analysis. For this aim, the applicability of six different extraction methods was tested with regard to egg allergen analytics. Besides the aim of a quantitative extraction of the

allergens from the matrix, it was equally important not to alter their allergenic potential during the extraction process. These requirements were examined via protein determination according to Bradford and § 64 LFBG, ASU Nr. L 06.00-7 as well as EAST inhibition method. Using the Bradford method it could be demonstrated that extraction with urea solution (8 M) leads to significant interferences during the protein determination, and substantially reduced the allergenic potential of egg proteins. Therefore, urea solution (8 M) was not applicable for the extractions within the scope of these investigations. With all other extraction solutions adequate protein contents of the whole egg could be extracted. The highest protein content – with a mean value of 75.9 % - was achieved by the extraction with phosphate buffered saline followed by Tween 20 solution, physiological saline (0.15 M), water, and acetate buffer (0.1 M, protein content 63.5 %). The results show that none of these extracts – except from urea solution (8 M) – was changed in its allergenic potential. On the basis of these results, phosphate buffered saline was used as the extracting agent for the separation of the four major egg allergens for the following analysis.

The investigation on the technologically altered *whole egg for use in convenience products* showed that the treatment process including two steps of enzymatic hydrolysis and different heat treatments resulted in a gradual but nonetheless apparent alteration of the proteins and their allergenic potentials. A pronounced reduction in allergenic potential - of more than a hundredfold in comparison to the untreated sample - was detected after the first step of hydrolysis followed by a heating of the sample for ten minutes at 80 °C, whereas the allergenic potential of conalbumin could not be determined. It became clear that a combination of proteolysis and heat treatment was more effective than a single heat treatment as this combination resulted in a higher reduction in allergenic potential and a stronger sample. At this point in the process, only ovalbumin and ovomucoid still showed allergenic potential. In fact, this allergenic potential was reduced to the level of the final step of the technological process, but residual IgE-binding potential could still be detected. Within the scope of this study, a special combination of steps including proteolysis and heat treatment succeeded in reducing the allergenic potential of whole egg despite its remarkable heat stability and resistance against proteolysis of ovomucoid of more than a hundredfold of the pasteurised egg without a significant change in texture and flavour.

The examination of the technologically altered *powdered whole egg used as an additive in meat preparations for the production of boiled sausages* revealed that increasing heat treatment (70 °C, F = 1, F = 3, F = 12) as well as the application of high pressure (600 MPa) caused definite changes to the whole egg proteins and their allergenic capacity. The allergenic potential in the mass range of ovalbumin and ovomucoid (in contrast to the heat labile conalbumin) only slowly decreased with strong heat exposure (F = 1), and was hardly detected with the human serum pool after the sample underwent a heat treatment with an F-value of 12. The combined application of heat (70 °C) and high pressure (600 MPa) produced synergistic effects reducing allergenic potential by nearly twice as much as the sum of the single treatments conducted separately.

# 8 Anhang

## 8.1 Methoden

### 8.1.1 Proteinextraktionen

verwendete Extraktionslösungen:

PBS-Puffer (pH 7,4)	0,80 g NaCl 0,14 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,02 g KCl 0,02 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit bidest. Wasser ad 100 mL
0,1 M NaCl-Lösung	0,58 g NaCl mit bidest. Wasser ad 100 mL
8 M Harnstofflösung	48,05 g Harnstoff mit bidest. Wasser ad 100 mL
0,1 M Acetatpuffer (pH 3,8)	0,82 g Natriumacetat mit bidest. Wasser ad 100 mL mit 4 M HCl auf pH 3,8 einstellen
0,2 % Tween 20-Lösung	0,20 g mit bidest. Wasser ad 100 mL

Durchführung:

- ⇒ zu extrahierende Probe (2,5 mL) in ein Nunc<sup>TM</sup>-Röhrchen pipettieren
- ⇒ Masse der pipettierten Probe für spätere Berechnungen auswiegen
- ⇒ auf das 10fache Volumen (ad 25 mL) mit Extraktionsmittel versetzen
- ⇒ 4 h auf der Schüttelbank extrahieren
- ⇒ 30 min bei 1000 g bei Raumtemperatur (RT) zentrifugieren
- ⇒ unlösliches Pellet abfiltrieren
- ⇒ 1. Filtrat für die weitere Analytik einsetzen
- ⇒ Pellet ad 25 mL mit Extraktionsmittel versetzen und resuspendieren
- ⇒ erneut extrahieren, zentrifugieren und filtrieren
- ⇒ 2. Filtrat für die weitere Analytik einsetzen
- ⇒ für weitere Untersuchungen verwenden oder bei -20 °C lagern

### 8.1.2 Bestimmung des Proteingehaltes

nach BRADFORD (1976)

verwendete Lösungen:

Lösung 1	10 mL Ethanol (96 %ig) 20 mL o-Phosphorsäure (85 %ig) 35 mg Coomassie Brilliant Blue G 250
Lösung 2	3 mL Lösung I 3 mL o-Phosphorsäure (85 %ig) 1,5 mL Ethanol (96 %ig) mit bidest. Wasser ad 50 mL (Lösung bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss aufbewahren)
Standardlösungen	Standards:
	9,000 mL bidest. Wasser + 1,000 mL SL = 400 µg/mL
Stammlösung (SL):	9,250 mL bidest. Wasser + 0,750 mL SL = 300 µg/mL
40 mg BSA mit bidest.	9,500 mL bidest. Wasser + 0,500 mL SL = 200 µg/mL
Wasser ad 10 mL	9,750 mL bidest. Wasser + 0,250 mL SL = 100 µg/mL
	9,875 mL bidest. Wasser + 0,125 mL SL = 50 µg/mL

Durchführung:

- ⇒ Proteinextrakte mit bidest. Wasser je nach zu erwartendem Proteingehalt verdünnen
- ⇒ 50 µL der Probenextrakte in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte geben
- ⇒ 50 µL jeder Standardlösung in je eine Kavität geben
- ⇒ 50 µL bidest. Wasser bzw. Extraktionsmittel in je eine Kavität geben (Blindwert)
- ⇒ 200 µL Lösung 2 zu jeder befüllten Kavität geben
- ⇒ nach mind. 3 und höchstens 15 min im Mikroplattenreader 10 s schütteln
- ⇒ bei 590 nm mittels ELISA-Plattenreader gegen den Blindwert vermessen
- ⇒ die Auswertung erfolgt anhand einer mithilfe der Standardlösungen erstellten Kalibriergeraden
- ⇒ jede Bestimmung ist als Doppelbestimmung durchzuführen

### 8.1.3 Bestimmung des Gesamtstickstoffs

Durchführung nach § 64 LFGB, ASU Nr. L 06.00-7 in der Fassung vom 26. April 2006  
[MEYER 2006]

verwendete Lösungen:

Borsäure-Lösung c(Borsäure): 4 % (g:v)	40 g	Borsäure mit bidest. Wasser ad 1 L
Natronlauge c(NaOH): 35 % (g:v)	1850 g	Natriumhydroxid mit bidest. Wasser ad 5 L
Salzsäure c(HCl): 0,1 M	100 mL	Titrisol-Maßlösung mit bidest. Wasser quantitativ überführen mit bidest. Wasser ad 1 L
Tashiro-Indikator c(Methylrot): 0,026 % (g:v) c(Methylenblau): 0,013 % (g:v)	60 mg 30 mg	Methylrot in 200 mL Ethanol Methylenblau in 30 mL dest. Wasser beide Lösungen vereinigen

Durchführung:

1.) Aufschluss

- ⇒ ca. 2 g Probe (für Blindwertbestimmung durch 2 ml dest. Wasser ersetzen) in Kjeldahlkolben einwiegen
- ⇒ ca. 1 g Selenreaktionsgemisch, 20 mL Schwefelsäure (97 - 98 %ig) und einige Siedesteinchen hinzugeben
- ⇒ Gefäß in den Aufschlussblock stellen, Aufschlussapparatur (Digestion System 6, 1007 Digester) gemäß Betriebsanweisung vorbereiten
- ⇒ Aufschluss durchführen bis Lösung klar und hellgrün ist
- ⇒ Gefäße abkühlen lassen

2.) Destillation

- ⇒ Destillationsapparatur gemäß Betriebsanweisung vorbereiten
- ⇒ Vorlage mit 50 mL 4 %iger Borsäure-Lösung und einigen Tropfen Tashiro-Indikator befüllen und in Destillationsapparatur einsetzen
- ⇒ vorsichtig Natronlauge zugeben
- ⇒ Lösung 9 min destillieren

3.) Titration

- ⇒ Destillate mit Salzsäure-Maßlösung titrieren, Umschlagspunkt grün → grau

Auswertung:

Über den ermittelten Gesamtstickstoffgehalt der Probe errechnet sich nach folgender Formel der Gesamtproteingehalt:

$$\text{Gesamtproteingehalt [\%]} = \frac{(a - b) \cdot F \cdot 1,4008 \cdot U}{E \cdot 10} \quad (8.1)$$

a: Verbrauch der Salzsäure-Maßlösung (0.1 M) im Hauptversuch in mL

b: Verbrauch der Salzsäure-Maßlösung (0.1 M) im Blindversuch in mL

F: Titer der Maßlösung (t: 1.000)

1,4008: 1 mL Salzsäure-Maßlösung (0.1 mL) entspricht 1.4008 mg Stickstoff

U: Umrechnungsfaktor zur Berechnung des Proteingehaltes (für Ei: 6.25)

E: Probeneinwaage in g

### 8.1.4 Enzymallergosorbent-Test (EAST)

#### 1. Bromcyanaktivierung der Scheiben:

modifiziert nach CESKA & LUNDKVIST (1972)

verwendete Lösungen:

Bromcyanlösung	15 g	Bromcyan in 450 mL bidest. Wasser unter Rühren lösen (mit Schutzmaske unter dem Abzug)
0,005 M NaHCO <sub>3</sub> -Lösung	2,1 g	NaHCO <sub>3</sub> mit bidest. Wasser ad 5 L
Natronlauge c(NaOH): 10 (g:v)	10 g	NaOH mit bidest. Wasser ad 100 mL
1 M Natronlauge	4 g	NaOH mit bidest. Wasser ad 100 mL

Durchführung:

- ⇒ 15 g Cellulosepapierscheiben (ca. 5000 Stück) in einem 1-L-Dreihalskolben mit Tropftrichter (250 mL) und pH-Elektrode in 150 mL bidest. Wasser quellen lassen
- ⇒ Bromcyanlösung zu der Papierscheiben-Suspension geben
- ⇒ durch Zutropfen von 1 M Natronlauge auf einen pH-Wert von 10 – 10,5 einstellen und solange einhalten, bis 75 mL Lauge verbraucht sind (ca. 30 min). Der pH-Wert darf nicht über 11,5 steigen, ansonsten ist der Versuch zu wiederholen
- ⇒ Lösung über Büchnertrichter absaugen
- ⇒ Scheiben nacheinander 12 x mit je 375 mL 0,005 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, je 2 x mit je 375 mL bidest. Wasser, Aceton/Wasser (25:75, v/v), Aceton/Wasser (50:50, v/v), Aceton/Wasser (75:25, v/v) und Aceton waschen
- ⇒ bromcyanaktivierte Scheiben lyophilisieren und anschließend bei –20 °C lagern

Entsorgung der Bromcyanabfälle:

- ⇒ Bromcyanlösung in 10 %iger Natronlauge (15 mL/g BrCN) 1 h stehenlassen
- ⇒ bei einem pH-Wert von 10 – 11 einen 50 %igen Überschuss an Natriumhypochlorit-Lösung zugeben, über Nacht stehenlassen
- ⇒ Lösung auf einen pH-Wert von 7 einstellen und den Überschuss an Hypochlorit mit Hydrogensulfit zerstören
- ⇒ Lösung über das Abwasser entsorgen



2. Kopplung der Extrakte:

modifiziert nach CESKA & LUNDKVIST (1972)

verwendete Lösungen:

Inkubationspuffer	(1)	15,6 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O mit bidest. Wasser ad 1 L
	(2)	8,4 g	NaHCO <sub>3</sub> mit bidest. Wasser ad 1 L
	(3)		190 mL (1) und 803 mL (2) mischen, pH auf 7,4 einstellen
	(4)	37, 22 g 2 g 2 mL	EDTA NaN <sub>3</sub> Tween 20 in 800 mL (3) lösen, pH auf 7,4 einstellen
0,5 M NaHCO <sub>3</sub> -Lösung		21,0 g	NaHCO <sub>3</sub> mit bidest. Wasser ad 500 mL, pH auf 8,4 einstellen
0,1 M NaHCO <sub>3</sub> -Lösung		4,2 g	NaHCO <sub>3</sub> mit bidest. Wasser ad 500 mL, pH auf 9,5 einstellen
Ethanolaminpuffer		5 mL	Ethanolamin mit bidest. Wasser ad 500 mL, pH auf 9,2 einstellen
0,1 M Natriumacetatpuffer		4,2 g	Natriumacetat mit bidest. Wasser ad 500 mL, pH auf 4,0 einstellen

Durchführung:

- ⇒ Extrakte so verdünnen, dass eine Proteinkonzentration von ca. 20 µg/mL vorliegt
- ⇒ ca. 300 bromcyanaktivierte Papierscheiben (ca. 0,63 g) und 100 mL Extraktionslösung in einen 250-mL-Jodzahlkolben geben
- ⇒ Lösung über Nacht bei 4 °C rühren
- ⇒ Überstand mit einer Pasteurpipette (Wasserstrahlpumpe) absaugen
- ⇒ Papierscheiben mit 100 mL 0,5 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung waschen, Lösung absaugen
- ⇒ 100 mL Ethanolaminpuffer hinzugeben
- ⇒ 2 h bei Raumtemperatur rühren
- ⇒ absaugen und nacheinander 3 x mit je 100 mL 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, je 2 x mit je 100 mL 0,1 M Natriumacetatlösung und 0,5 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung waschen
- ⇒ Papierscheiben mit 100 mL bidest. Wasser spülen und in einen 250-mL-Rundkolben überführen, Wasser absaugen
- ⇒ Papierscheiben lyophilisieren und anschließend bei -20 °C lagern

### 3. EAST-Bestimmung:

nach Anleitung des Herstellers unter Verwendung des *in vitro* Testkits „Spez. IgE ELISA TR (RV)“ der Firma Allergopharma (Reinbek, Germany).

verwendete Chemikalien (entsprechend dem Testkit):

Waschlösung	enthält Tween 20, PBS
Konjugatlösung	enthält anti-human-IgE, konjugiert mit AP
Substratlösung	enthält MgCl <sub>2</sub>
Färbetabletten	enthält PNPP
Färbelösung	1 Färbetablette in 5 mL Substratlösung lösen
Stopplösung	1 M NaOH
Referenzallergenscheiben	festphasengekoppelter Lieschgrasextrakt
Referenzserum	Kalibrierreihen mit spez. IgE gegen Lieschgras A = 0,35 U/mL (EAST-Klasse 1) B = 1,7 U/mL (EAST-Klasse 2) C = 3,5 U/mL (EAST-Klasse 3) D = 10,0 U/mL (EAST-Klasse 4) E = 50,0 U/mL (EAST-Klasse 5)

Durchführung:

- ⇒ alle Referenzwerte in Doppelbestimmungen durchführen
- ⇒ je eine Papierscheibe in eine Vertiefung (Kavität) einer Mikrotiterplatte geben, 2 Kavitäten zur Bestimmung des Substratleerwertes bleiben frei
- ⇒ je 50 µL Patientenserum bzw. Referenzserum auf die Scheiben pipettieren, Kavitäten zur Bestimmung des Substratleerwertes bleiben frei
- ⇒ Mikrotiterplatte bedecken und 1 h bei 37 °C inkubieren
- ⇒ Kavitäten mit je 250 µL Waschlösung 10 min inkubieren, Lösung mit einer Pasteurpipette (Wasserstrahlpumpe) absaugen, Waschvorgang insgesamt 3 x durchführen
- ⇒ je 50 µL Konjugatlösung auf die Allergenscheiben pipettieren, Kavitäten zur Bestimmung des Substratleerwertes bleiben frei
- ⇒ Mikrotiterplatte bedecken und 1,5 h bei 37 °C inkubieren
- ⇒ Kavitäten mit je 250 µL Waschlösung 10 min inkubieren, Lösung mit einer Pasteurpipette (Wasserstrahlpumpe) absaugen, Waschvorgang insgesamt 3 x durchführen
- ⇒ 200 µL Färbelösung in sämtliche Kavitäten pipettieren
- ⇒ Mikrotiterplatte bedecken und 1 h bei 37 °C inkubieren
- ⇒ 100 µL Stopplösung in sämtliche Kavitäten pipettieren
- ⇒ Mikrotiterplatten 10 sec schütteln
- ⇒ 250 µL aus jeder Kavität in eine korrespondierende Kavität einer leeren Mikrotiterplatte überführen
- ⇒ bei 405 nm im ELISA-Photometer vermessen
- ⇒ Auswertung und Einteilung in EAST-Klassen siehe 4.4

### 8.1.5 EAST-Inhibition

Die EAST-Inhibition erfolgt modifiziert nach VIETHS et al. (1993a) unter Verwendung des *in vitro* Testkits „Spez. IgE ELISA TR (RV)“ der Firma Allergopharma (Reinbek, Germany).

verwendete Lösungen:

Allergenverdünnungslösung	500 µL	Tween 20 mit bidest. Wasser ad 100 mL
Kartoffelproteinlösung	10 mg	Kartoffelprotein mit Allergenverdünnungslösung ad 10 mL

verwendete Chemikalien (entsprechend dem Testkit):

Waschlösung	enthält Tween 20, PBS
Konjugatlösung	enthält anti-human-IgE, konjugiert mit AP
Substratlösung	enthält MgCl <sub>2</sub>
Färbetabletten	enthält PNPP
Färbelösung	1 Färbetablette in 5 mL Substratlösung lösen
Stopplösung	1 M NaOH

Durchführung:

- ⇒ je eine Papierscheibe in eine Vertiefung (Kavität) einer Mikrotiterplatte geben
- ⇒ jeweils folgende Lösungen auf die Scheiben pipettieren:
  - 50 µL unverdünnter Inhibitorextrakt
  - 50 µL verdünnter Inhibitorextrakt (1:10)
  - 50 µL verdünnter Inhibitorextrakt (1:100)
  - 50 µL verdünnter Inhibitorextrakt (1:1000)
  - 50 µL verdünnter Inhibitorextrakt (1:10000)
  - 50 µL verdünnter Inhibitorextrakt (1:100000)
  - 50 µL verdünnter Inhibitorextrakt (1:1000000)
  - 50 µL Allergenverdünnungslösung (ohne Inhibitor (B<sub>0</sub>))
  - 50 µL Kartoffelproteinlösung (unspezifische Bindung (B<sub>u</sub>))
  - 50 µL Allergenverdünnungslösung (nichtspezifische Bindung (NSB))
- ⇒ je 50 µL Patientenserum (1:2 mit Allergenverdünnungslösung versetzt) auf die Scheiben pipettieren, Kavitäten zur Bestimmung der NSB bleiben frei
- ⇒ Mikrotiterplatte bedecken und 1 h bei 37 °C inkubieren
- ⇒ Kavitäten mit je 250 µL Waschlösung 10 min inkubieren, Lösung mit einer Pasteurpipette (Wasserstrahlpumpe) absaugen, Waschvorgang insgesamt 3 x durchführen
- ⇒ je 50 µL Konjugatlösung auf die Allergenscheiben pipettieren
- ⇒ Mikrotiterplatte bedecken und 1,5 h bei 37 °C inkubieren

- ⇒ Kavitäten mit je 250 µL Waschlösung 10 min inkubieren, Lösung mit einer Pasteurpipette (Wasserstrahlpumpe) absaugen, Waschvorgang insgesamt 3 x durchführen
- ⇒ 200 µL Färbelösung in sämtliche Kavitäten pipettieren
- ⇒ Mikrotiterplatte bedecken und 1 h bei 37 °C inkubieren
- ⇒ 100 µL Stopplösung in sämtliche Kavitäten pipettieren
- ⇒ Mikrotiterplatte 10 sec schütteln
- ⇒ 250 µL aus jeder Kavität in eine korrespondierende Kavität einer leeren Mikrotiterplatten überführen
- ⇒ bei 405 nm im ELISA-Photometer vermessen

Auswertung:

Über die ermittelten Optischen Dichten (OD) der Proben errechnen sich nach folgender Formel die Inhibitionen der Extrakte:

$$\text{Inhibition [\%]} = \frac{B_0 - B}{B_0 - \text{NSB}} \cdot 100 \quad (8.2)$$

$B_0$  : Messwerte ohne Inhibitorsubstanz [Skt]

B: Messwerte der einzelnen Inhibitionsstufen [Skt]

NSB: Nichtspezifische Bindung [Skt]

Die Berechnung der  $C_{50}$ -Werte erfolgt mit folgender Formel:

$$C_{50} - \text{Wert} [\mu\text{g/mL}] = e^{\frac{y-b}{a}} \quad \text{mit} \quad y = a \cdot \ln(x) + b \quad (8.3)$$

y : 50 %ige Inhibition

### 8.1.6 SDS-PAGE

#### 1. Probenvorbereitung:

nach VIETHS et al. (1993b)

verwendete Lösungen:

Probenpuffer (pH 6,8)	3,03 g Tris 2,5 mL Mercaptoethanol 5,0 mL Glycerin 2,0 g SDS 0,01 g Bromphenolblau 150 µL Pyronin Y-Lösung (1 %ig) 40 mL bidest. Wasser pH auf 6,8 einstellen, mit bidest. Wasser ad 50 mL
--------------------------	--

Durchführung:

- ⇒ Probenextrakte und Proteinstandardlösungen (Proteingehalt: 250 – 300 µg/mL) 1:2 mit Probenpuffer versetzen
- ⇒ 3 min bei 90 °C im Wasserbad reduzieren

#### 2. SDS-PAGE (NuPAGE®):

verwendete Lösungen:

Elektrodenpuffer NuPAGE® MES-SDS Running Buffer	97,6 g MES 60,6 g Tris-Base 10,0 g SDS 3,0 g EDTA mit bidest. Wasser ad 500 mL vor Gebrauch 1:20 mit bidest. Wasser verdünnen
---	---

verwendete Gele:

NuPAGE® 4 – 12 % Bis-Tris Gel	Totalamidkonzentration: 4 – 12 % Gel-Maße: 8 cm * 8 cm * 1 mm Gel Typ: 12 well, 15 well, 2D well
----------------------------------	--

Geräteparameter:

Xcell SureLock™ Mini-Cell	Spannung: 200 V (konstant) Stromstärke Anfang: 100 – 115 mA Stromstärke Ende: 60 – 70 mA Dauer: 35 – 55 min
---------------------------	--

Durchführung:

- ⇒ Gel-Kassette aus der Verpackung entnehmen, Klebestreifen auf der Gel-Unterseite entfernen, Kamm herausziehen
- ⇒ Gel-Kassette entsprechend der Novex®-NuPAGE™ Anleitung in der Elektrophoresekammer platzieren
- ⇒ Elektrodenpuffer in die Kammer geben

- ⇒ reduzierte Proteinlösungen mittels HPLC-Spritze oder Pipette mit Gelloader-Tips in die Wells geben (je 5 – 20 µL)
- ⇒ Elektrophoresekammer schließen, Spannung (200 V) anlegen
- ⇒ den Lauf beenden, wenn der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff an der Anode angekommen ist

Zusammensetzung des Molekulargewichtsmarkers (Mark12 Invitrogen®):

Protein	Approx. Molecular Weights (kDa)	
	NuPAGE® MES	Tris-Glycine
Myosin	200	200
β-galactosidase	116.3	116.3
Phosphorylase B	97.4	97.4
BSA	66.3	66.3
Glutamic dehydrogenase	55.4	55.4
Lactate dehydrogenase	36.5	36.5
Carbonic anhydrase	31.0	31.0
Trypsin inhibitor	21.5	21.5
Lysozyme	14.4	14.4
Aprotinin	6.0	6.0
Insulin B chain	3.5	Unresolved Insulin
Insulin A chain	2.5	

NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel with MES stained with Coomassie® stain.      4-20% Tris-Glycine Gel stained with Coomassie® stain.

©1997-2002 Invitrogen Corporation. All rights reserved.  
Coomassie® is a registered trademark of Imperial Chemical Industries.

Bild 8.1: Proteinmarker Mark12 (Invitrogen®)

### 8.1.7 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

#### 1. Probenvorbereitung:

verwendete Lösungen:

Probenpuffer	1,0 mL	Glycerin mit bidest. Wasser ad 50 mL
--------------	--------	---

Durchführung:

- ⇒ Probenextrakte und Proteinstandardslösungen (Proteingehalt: ca. 600 µg/mL) 1:2 mit Probenpuffer versetzen

2. IEF (NuPAGE®):

verwendete Lösungen:

Kathodenpuffer (pH 3-7) NuPAGE™	8,5 g	Lysin (freie Base) mit bidest. Wasser ad 100 mL vor Gebrauch 1:10 mit bidest. Wasser verdünnen
Anodenpuffer NuPAGE™	2,4 mL	o-Phosphorsäure (85 %ig) mit bidest. Wasser ad 100 mL vor Gebrauch 1:50 mit bidest. Wasser verdünnen

verwendete Gele:

NuPAGE™ IEF Gel	pI: 3 – 10 % Gel-Maße: 8 cm * 8 cm * 1 mm Gel Typ: 12 well
-----------------	--

Geräteparameter:

Xcell SureLock™ Mini-Cell	Spannung: 100 V 1 h (konstant) 200 V 1 h (konstant) 500 V 1 h (konstant) Stromstärke Anfang: 5 mA Stromstärke Ende: 6 mA Dauer: 3 h
---------------------------	--

Durchführung:

- ⇒ Gel-Kassette aus der Verpackung entnehmen, Klebestreifen auf der Gel-Unterseite entfernen, Kamm herausziehen
- ⇒ Gel-Kassette entsprechend der Novex®-NuPAGE™ Anleitung in der Elektrophoresekammer platzieren
- ⇒ mittlere Elektroden-Kammer mit Kathodenpuffer befüllen (ca. 200 mL)
- ⇒ äußere Elektroden-Kammer mit Anodenpuffer befüllen (ca. 600 mL)
- ⇒ Proteinlösungen mittels HPLC-Spritze oder Pipette mit Gelloader-Tips in die Wells geben (je 5 – 20 µL)
- ⇒ Elektrophoresekammer schließen
- ⇒ den Lauf nach 3 h beenden

### Zusammensetzung der IEF Markers pH 3 - 7:

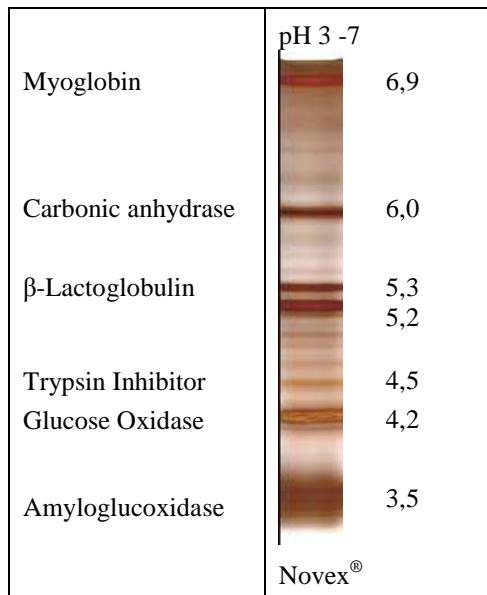


Bild 8.2: IEF-Marker: SERVA Liquid  
Mix 3 - 7

### 8.1.8 Zweidimensionale (2D)-Elektrophorese

nach GÖRG et al. (1988)

Durchführung:

- ⇒ IEF analog 8.1.7 durchführen
- ⇒ einen Well-Streifen der IEF aus dem Gel ausschneiden
- ⇒ Gelstreifen in ein Pyrexglas überführen und mit 5 mL Probenpuffer (siehe 8.1.6) versetzen
- ⇒ 3 min bei 90 °C reduzieren
- ⇒ Gelstreifen auf 2D-Well SDS-PAGE Gel auflegen
- ⇒ elektrophoretische Trennung analog 8.1.6 durchführen



### 8.1.9 Semidry-blotting auf NC-Membranen

modifiziert nach KYHSE-ANDERSEN(1984)

verwendete Lösungen:

Anodenpuffer I pH 10,4 0,3 M Tris	18,15 g 0,05 g 100 mL	Tris NaN <sub>3</sub> Ethanol (96 %ig) mit bidest. Wasser ad 500 mL
Anodenpuffer II pH 10,4 0,025 M Tris	1,52 g 0,05 g 100 mL	Tris NaN <sub>3</sub> Ethanol (96 %ig) mit bidest. Wasser ad 500 mL
Kathodenpuffer pH 7,6 0,04 M EACA	2,6 g 0,05 g 0,05 g 100 mL	6-Aminohexansäure (EACA) SDS NaN <sub>3</sub> Ethanol (96 %ig) mit bidest. Wasser ad 500 mL

Durchführung:

- ⇒ die Blotmembran entsprechend der Größe der Gele zurechtschneiden
- ⇒ Graphitkathode mit bidest. Wasser anfeuchten
- ⇒ 4 Lagen Haushaltstücher mit Kathodenpuffer tränken und auf die Kathode legen
- ⇒ aus der Gel-Kassette entnommenes Gel auf die blauen Haushaltstücher legen
- ⇒ Blotmembran in Anodenpuffer II tränken und luftblasenfrei auf das Gel legen
- ⇒ Bereiche an denen kein Transfer erfolgen soll mit Kunststoffstreifen abdecken
- ⇒ 2 Lagen Haushaltstücher mit Anodenpuffer II tränken und auf Blotmembran legen
- ⇒ 4 Lagen Haushaltstücher mit Anodenpuffer I tränken und auf den Stapel legen
- ⇒ Luftblasen aus dem Stapel rollen
- ⇒ mit bidest. Wasser angefeuchtete Graphitanode auflegen
- ⇒ Semidry-Blot unter den folgenden Bedingungen durchführen:

SDS-Gel:	IEF-Gel:
30 Volt	15 Volt
0.8 mA/cm <sup>2</sup>	0.25 mA/cm <sup>2</sup>
80 min	130 min

- ⇒ NC-Membran bei RT trocknen lassen

### 8.1.10 Immunfärbung auf NC-Membran

Die immunochemische Detektion erfolgt unter Anwendung des Verstärkersystems nach VIETHS et al. (1992b). Die Blockierung der Membran erfolgt nach SCHÜTTE et al. (2005)

verwendete Lösungen:

Blockier-/Wasch-Lösung/ Inkubationspuffer	6,06 g 8,77 g 5 mL	Tris NaCl Tween 20 mit bidest. Wasser ad 1 L
Anti Human IgE vom Kaninchen	25 µL	Anti Human IgE mit Inkubationspuffer ad 100 mL
Anti Kaninchen IgG biotinyliert von der Ziege	16,7 µL	Anti Kaninchen IgG mit Inkubationspuffer ad 100 mL
Streptavidin-HRP	5 µL	Streptavidin-HRP mit Inkubationspuffer ad 100 mL
Umpufferungslösung (pH 6,0)	121,2 mg 80 mL	Tris bidest. Wasser auf pH 6,0 einstellen mit bidest. Wasser ad 100 mL
Färbelösung I (vor Gebrauch frisch ansetzen)	24 mg 80 mg	TMB DONS mit Ethanol (96 %ig) ad 10 mL
Färbelösung II (pH 5,0)	0,94 g 1,82 g 80 mL	Citronensäure Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O bidest. Wasser auf pH 5,0 einstellen mit bidest. Wasser ad 100 mL
Färbelösungs-Gemisch	10 mL 30 mL 20 µL	Färbelösung I Färbelösung II H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Durchführung:

- ⇒ alle Behandlungsschritte erfolgen unter stetigem Schütteln auf einer Schüttelbank
- ⇒ die NC-Membran (siehe 8.1.9) muss von den verwendeten Lösungen immer vollständig benetzt sein
- ⇒ 2 x 20 min mit 15 mL (bzw. 1,5 mL pro Blotstreifen 0,04 cm x 8 cm) Blockierlösung behandeln

Inkubation mit Patientenseren:

- ⇒ über Nacht mit Patientenserum (1:5 in Inkubationspuffer) inkubieren
- ⇒ 3 x 5 min mit Waschpuffer behandeln
- ⇒ 1 h mit Anti Human IgE inkubieren
- ⇒ 3 x 5 min mit Waschpuffer behandeln

Inkubation mit Kaninchen-Antiseren:

- ⇒ über Nacht mit Antikörpern (anti Ovalbumin 1:80000 in Inkubationspuffer) inkubieren
- ⇒ 3 x 5 min mit Waschpuffer behandeln

Weitere Durchführung für beide Inkubationsmethoden:

- ⇒ 1 h mit Anti Kaninchen IgG inkubieren
- ⇒ 3 x 5 min mit Waschpuffer behandeln
- ⇒ 20 min mit Streptavidin-HRP inkubieren
- ⇒ 3 x 5 min mit Waschpuffer behandeln
- ⇒ 1 min mit Umpufferungslösung konditionieren
- ⇒ bis zur gewünschten Färbung mit Färbelösungs-Gemisch behandeln
- ⇒ 15 min mit bidest. Wasser spülen

### 8.1.11 Silberfärbung

nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1986)

verwendete Lösungen:

Fixierlösung	15 mL 5 mL	Ethanol (96 %ig) Eisessig mit bidest. Wasser ad 50 mL vor Gebrauch frisch ansetzen
Inkubationslösung	15 mL 4,3 g 0,1 g 300 µL	Ethanol (96 %ig) Natriumacetat mit bidest. Wasser ad 50 mL direkt vor dem Gebrauch: Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O Glutardialdehyd (25 %ig) mit Inkubationslösung ad 50 mL
Versilberungslösung	0,1 g 10 µL	AgNO <sub>3</sub> mit bidest. Wasser ad 50 mL direkt vor dem Gebrauch: Formaldehydlösung (37 %ig)
Entwicklungslösung (pH 11,8)	1,25 g 40 mL	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> bidest. Wasser auf pH 11,8 einstellen mit bidest. Wasser ad 50 mL
Stopplösung	1,86 g	Titriplex III mit bidest. Wasser ad 100 mL

Durchführung:

- ⇒ alle Behandlungsschritte erfolgen unter stetigem Schütteln auf einer Schüttelbank
- ⇒ das Gel muss von den verwendeten Lösungen immer vollständig benetzt sein
- ⇒ mind. 30 min mit Fixierlösung behandeln
- ⇒ mind. 30 min (oder über Nacht) mit Inkubationslösung behandeln
- ⇒ 5 x 5 min mit bidest. Wasser waschen
- ⇒ 20 min mit Versilberungslösung behandeln

- ⇒ 1 min mit bidest. Wasser waschen
- ⇒ 1 min mit wenig Entwicklungslösung schwenken
- ⇒ bis zur gewünschten Färbung mit Entwicklungslösung behandeln
- ⇒ 15 min mit Stopplösung behandeln
- ⇒ 2 x mit bidest. Wasser waschen

### 8.1.12 Colloidale Coomassie-Brilliant-Blue (CBB)-Färbung

nach NEUHOFF et al. (1988)

verwendete Lösungen:

Fixierlösung	50 mL 3,5 mL	Ethanol (96 %ig) o-Phosphorsäure (85 %ig) mit bidest. Wasser ad 100 mL
Färbelösung	0,1 g 2 mL 10 g 20 mL	CBB G-250 o-Phosphorsäure (85 %ig) Ammoniumsulfat Methanol mit bidest. Wasser ad 100 mL
Inkubationslösung	25 g	Ammoniumsulfat mit bidest. Wasser ad 100 mL
Waschlösung	25 mL	Methanol mit bidest. Wasser ad 100 mL

Durchführung:

- ⇒ alle Behandlungsschritte erfolgen unter stetigem Schütteln auf einer Schüttelbank
- ⇒ das Gel muss von den verwendeten Lösungen immer vollständig benetzt sein
- ⇒ 5 min mit bidest. Wasser waschen
- ⇒ über Nacht mit Färbelösung behandeln
- ⇒ 1 – 3 min mit Inkubationspuffer behandeln
- ⇒ 1 min mit Waschlösung waschen
- ⇒ tagsüber mit Fixierlösung behandeln
- ⇒ diese Arbeitsschritte dreimal wiederholen
- ⇒ zur Reduktion der Hintergrundfärbung mehrfach mit Waschlösung behandeln

nach LANNE & PANFILOV (2004)

verwendete Lösungen:

Fixierlösung	12 g	Trichloressigsäure mit bidest. Wasser ad 100 mL
Inkubationslösung	34 mL 3 mL 17 g	Methanol o-Phosphorsäure (85 %ig) Ammoniumsulfat mit bidest. Wasser ad 100 mL

**Durchführung:**

- ⇒ alle Behandlungsschritte erfolgen unter stetigem Schütteln auf einer Schüttelbank
- ⇒ das Gel muss von den verwendeten Lösungen immer vollständig benetzt sein
- ⇒ mind. 3 h mit Fixierlösung behandeln
- ⇒ 3 x 20 min mit bidest. Wasser waschen
- ⇒ 1 h mit Inkubationslösung behandeln
- ⇒ 20 mg Coomassie-Brilliant-Blue G-250 pro 50 mL Lösung zugeben
- ⇒ 3 – 4 Tage inkubieren
- ⇒ mehrfach mit bidest. Wasser waschen

**8.1.13 Ponceau-Färbung auf NC-Membran**

## verwendete Lösungen:

Färbelösung	1,0 g	Ponceaurot mit 3% Trichloressigsäure ad 50 mL
Entfärbelösung	1,5 mL	Eisessig (100 %ig) mit bidest. Wasser ad 50 mL

**Durchführung:**

- ⇒ alle Behandlungsschritte erfolgen unter stetigem Schütteln auf einer Schüttelbank
- ⇒ die Membran muss von den verwendeten Lösungen immer vollständig benetzt sein
- ⇒ Blotmembran ca. 30 min mit Färbelösung behandeln
- ⇒ Hintergrund mit Entfärbelösung bis zur guten Sichtbarkeit der Banden entfärben

**8.1.14 Gewinnung der Patientenserum**

- ⇒ ca. 50 mL Blut in Serumröhrchen (je 7,5 mL) abnehmen
- ⇒ mindestens 30 min abkühlen lassen
- ⇒ 10 Minuten bei 4 °C und 4000 g zentrifugieren
- ⇒ überstehendes, klares Serum (ca. 3 - 4 mL pro Serumröhrchen) in Vials abfüllen
- ⇒ Seren bei - 80 °C lagern

## 8.2 Charakterisierung der Patientenserum

### 8.2.1 EAST-Bestimmungen

Tabella 8.1: EAST-Klassen der Patientenserum

Technische Universität München (Abteilung für Dermatologie und Allergologie)								
Seren-Nr.	IgE [U/mL]	EAST- Klasse	Seren-Nr.	IgE [U/mL]	EAST- Klasse	Seren-Nr.	IgE [U/mL]	EAST- Klasse
1	< 0,35	0	7	< 0,35	0	13	< 0,35	0
2	< 0,35	0	8	< 0,35	0	14	10,473	3
3	< 0,35	0	9	< 0,35	0	15	< 0,35	0
4	< 0,35	0	10	< 0,35	0	16	< 0,35	0
5	0,847	2	11	< 0,35	0	17	0,981	2
6	< 0,35	0	12	< 0,35	0	18	39,503	4

Universitätsspital Zürich (Allergiestation, Dermatologische Klinik)								
Seren-Nr.	IgE [U/mL]	EAST- Klasse	Seren-Nr.	IgE [U/mL]	EAST- Klasse	Seren-Nr.	IgE [U/mL]	EAST- Klasse
19	< 0,35	0	30	< 0,35	0	41	< 0,35	0
20	< 0,35	0	31	13,421	3	42	2,517	2
21	< 0,35	0	32	< 0,35	0	43	< 0,35	0
22	< 0,35	0	33	< 0,35	0	44	< 0,35	0
23	< 0,35	0	34	< 0,35	0	45	< 0,35	0
24	< 0,35	0	35	< 0,35	0	46	< 0,35	0
25	< 0,35	0	36	6,183	3	47	< 0,35	0
26	< 0,35	0	37	< 0,35	0	48	4,287	3
27	< 0,35	0	38	< 0,35	0	49	< 0,35	0
28	0,537	1	39	0,714	2	50	9,875	3
29	< 0,35	0	40	< 0,35	0			

Macedonio Melloni Hospital Mailand (Abteilung für Pädiatrie)								
Seren-Nr.	IgE [U/mL]	EAST- Klasse	Seren-Nr.	IgE [U/mL]	EAST- Klasse	Seren-Nr.	IgE [U/mL]	EAST- Klasse
51	< 0,35	0	62	75,138	4	72	< 0,35	0
52	< 0,35	0	63	< 0,35	0	73	< 0,35	0
53	1,580	2	64	< 0,35	0	74	< 0,35	0
54	< 0,35	0	65	< 0,35	0	75	< 0,35	0
55	< 0,35	0	66	< 0,35	0	76	< 0,35	0
56	4,881	3	67	3,419	2	77	0,375	1
57	< 0,35	0	68	< 0,35	0	78	< 0,35	0
58	< 0,35	0	69	< 0,35	0	79	< 0,35	0
59	9,602	3	70	< 0,35	0	80	< 0,35	0
60	3,003	2	71	< 0,35	0	81	< 0,35	0
61	< 0,35	0						

Universität Wien (Abteilung für Pädiatrie und Juvenile Medizin)								
Seren-Nr.	IgE [U/mL]	EAST- Klasse	Seren-Nr.	IgE [U/mL]	EAST- Klasse	Seren-Nr.	IgE [U/mL]	EAST- Klasse
82	< 0,35	0	87	< 0,35	0	92	17,028	3
83	< 0,35	0	88	< 0,35	0	93	0,470	1
84	0,436	1	89	< 0,35	0	94	0,603	1
85	< 0,35	0	90	12,538	3	95	3,415	2
86	10,583	3	91	< 0,35	0			

## 8.2.2 Einzelerenbestimmungen

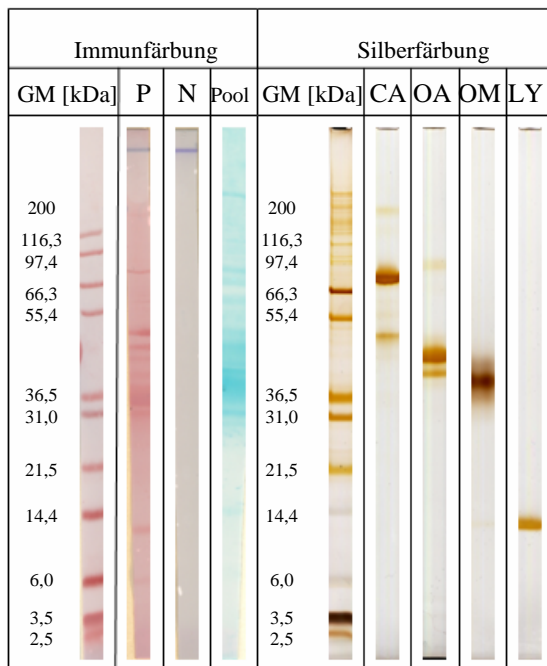


Bild 8.3: Immunoblot des Serenpools und Silberfärbung von Standardproteinen

## 8.3 Proteinextraktionen

### 8.3.1 Quantifizierung des Proteingehaltes der Extrakte

Tabelle 8.2a: Proteinextraktionen, Bestimmung nach BRADFORD (1976)

Nr.	Einwaage Vollei [g]	Proteingehalt 1 [mg/L]	Proteingehalt 2 [mg/L]	Gesamtproteingehalt [mg/L]	Gesamtproteingehalt [mg/g]	MW [mg/g]	CV [%]
1	2,56	2914,4	208,8	3123,2	30,50	30,68	1,31
	2,60	2985,7	183,6	3169,3	30,47		
	2,57	3029,9	176,2	3206,1	31,19		
2	2,57	2465,9	259,9	2725,8	26,52	26,45	3,74
	2,54	2515,5	268,3	2783,8	27,40		
	2,57	2349,4	264,1	2613,5	25,42		
3	2,58	2856,3	173,0	3029,3	29,35	29,41	1,76
	2,57	2813,1	160,2	2973,3	28,92		
	2,59	2954,7	148,7	3103,4	29,96		
4	2,57	5837,7	331,0	6168,7	60,01	60,96	1,67
	2,55	5857,6	347,4	6205,0	60,83		
	2,54	5948,9	354,0	6302,9	62,04		
5	2,59	2367,4	255,2	2622,6	25,31	25,65	1,35
	2,53	2339,9	254,4	2594,3	25,64		
	2,56	2414,0	249,1	2663,1	26,01		

Tabelle 8.2b: Proteinextraktionen, Bestimmung nach BRADFORD (1976)

Nr.	Einwaage Vollei [g]	Protein-gehalt 1 [mg/L]	Protein-gehalt 2 [mg/L]	Gesamt-proteingehalt [mg/L]	Gesamt-proteingehalt [mg/g]	MW [mg/g]	CV [%]
6	2,55	2869,4	177,7	3047,1	29,87	29,76	0,55
	2,56	2874,2	180,9	3055,1	29,83		
	2,56	2843,1	185,3	3028,4	29,57		
7	2,57			4225,2	41,10	40,42	2,12
	2,55	--	--	4150,6	40,69		
	2,55			4024,5	39,46		

Ein mittels der Methode nach BRADFORD (1976) bestimmter Blindwert der 8 M Harnstofflösung beträgt im Mittel 19,85 mg/L (Einzelwerte einer Doppelbestimmung: 19,38 mg/L, 20,32 mg/L).

Für die Proteinbestimmung nach § 64 LFBG, ASU Nr. L 06.00-7 in der Fassung vom 26. April 2006 wurden in einer Dreifachbestimmung jeweils 4 mL der Kontrolllösung (mit 2,57 g Vollei pro 25 mL bidest. Wasser) untersucht. Ein Untersuchungsansatz wies somit einen Proteingehalt von 0,4112 g auf. Es ergaben sich folgende Messwerte:

Tabelle 8.3: Proteinbestimmung nach § 64 LFBG, ASU Nr. L 06.00-7

	Verbrauch der HCl-Maßlösung (0,1 M) [mL]	Proteingehalt [mg/g]	MW [mg/g]	CV [%]
Blindversuch	0	0	0	1
	0	0		
	0	0		
Hauptversuch	5,2	110,71	110,71	1,92
	5,1	108,59		
	5,3	112,84		

Die Berechnung der Proteingehalte erfolgte nach Formel 8.1 (siehe 8.1.3)

### 8.3.2 Quantifizierung des relativen allergenen Potenzials der Proteinextrakte

Tabelle 8.4a: EAST-Inhibition der Proteinextrakte

Konzentration [µg/mL]	Kontrolle		bidest. Wasser		0,15 M NaCl-Lösung		0,2 M Tween 20-Lösung	
	OD [Skt]	Inhibi-tion [%]	OD [Skt]	Inhibi-tion [%]	OD [Skt]	Inhibi-tion [%]	OD [Skt]	Inhibi-tion [%]
4225,2	0,070	94,81	0,112	90,40	0,114	90,19	0,109	90,72
422,52	0,143	87,15	0,134	88,10	0,130	88,51	0,106	91,03
42,252	0,114	90,19	0,138	87,68	0,132	88,31	0,117	89,88
4,2252	0,228	78,24	0,201	81,07	0,178	83,48	0,177	83,59
0,4225	0,456	54,33	0,409	59,26	0,414	58,73	0,488	50,97
0,0423	0,910	6,71	0,926	5,034	0,887	9,12	0,817	16,46
0,0042	0,932	4,40	0,948	2,73	0,971	0,31	0,869	11,01



Tabelle 8.4b: EAST-Inhibition der Proteinextrakte

Konzentration [µg/mL]	8 M Harnstofflösung		PBS-Puffer		0,1 M Acetat- puffer pH 3,8		OD [Skt]	
	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]		
4225,2	0,076	94,18	0,117	89,88	0,124	89,15	<b>BL</b>	0,057
422,52	0,121	89,46	0,120	89,56	0,118	89,77		0,065
42,252	0,258	75,09	0,134	88,10	0,122	89,36	<b>NSB</b>	0,021
4,2252	0,827	15,42	0,178	83,48	0,212	79,92		0,020
0,4225	0,882	9,65	0,469	52,96	0,441	55,90	<b>B0</b>	1,000
0,0423	0,897	8,08	0,865	11,43	0,928	4,82		0,948
0,0042	0,924	5,24	0,901	7,66	0,935	4,09	<b>Bu</b>	1,175 1,203

Die Berechnung der Inhibitionen erfolgte nach Formel 8.2 (siehe 8.1.5)

## 8.4 Technologisch verändertes Vollei zum Einsatz in Fertigprodukte

Tabelle 8.5: EAST-Inhibition der Prozessstufen des Volleies zum Einsatz in Fertigprodukten

Konzentration [µg/mL]	Prozessstufe 1		Prozessstufe 2		Prozessstufe 3		Prozessstufe 4	
	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]
4647,16	1,757	90,13	1,788	88,75	1,699	92,71	1,619	96,27
464,716	1,880	84,66	1,891	84,17	1,737	91,02	1,775	89,33
46,4716	1,953	81,41	1,992	79,68	1,988	79,86	2,006	79,06
4,64716	2,208	70,08	2,483	57,85	2,541	55,27	2,680	49,09
0,464716	3,148	28,28	3,227	24,77	3,367	18,54	3,367	18,54
0,0464716	3,438	15,38	3,338	19,83	3,574	9,34	3,550	10,40
0,00464716	3,550	10,40	3,449	14,90	3,658	5,60	3,683	4,49
Konzentration [µg/mL]	Prozessstufe 5		Prozessstufe 6		Prozessstufe 7		Prozessstufe 8	
	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]
4647,16	1,896	83,95	1,798	88,31	1,934	82,26	3,273	22,72
464,716	2,349	63,81	2,431	60,16	2,567	54,11	3,311	21,03
46,4716	3,016	34,15	3,198	26,06	3,197	26,10	3,507	12,32
4,64716	3,382	17,87	3,449	14,90	3,449	14,90	3,583	8,94
0,464716	3,467	14,10	3,583	8,94	3,599	8,23	3,688	4,25
0,0464716	3,657	5,65	3,693	4,05	3,688	4,27	3,691	4,14
Konzentration [µg/mL]	Prozessstufe 9							
	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]			OD [Skt]		OD [Skt]	
4647,16	3,286	22,14			<b>BL</b>	0,169	<b>B0</b>	3,796
464,716	3,449	14,90				0,173		3,772
46,4716	3,528	11,38			<b>NSB</b>	1,562	<b>Bu</b>	3,810
4,64716	3,574	9,34				1,508		3,849
0,464716	3,629	6,89						
0,0464716	3,653	5,82						

Die Berechnung der Inhibitionen erfolgte nach Formel 8.2 (siehe 8.1.5)

## 8.5 Technologisch verändertes Volleipulver als Additiv in Brät zur Herstellung von Brühwürsten

Tabelle 8.6: EAST-Inhibition der Prozessstufen des Volleipulvers als Additiv in Brät

Prozessstufe 0			Prozessstufe 1					
Konzentration [µg/mL]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	Konzentration [µg/mL]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]			
3922,9	1,773	81,49	7690,72	2,226	0,11			
392,29	1,769	81,76	769,072	2,184	2,03			
39,229	1,924	72,45	76,9072	2,190	1,76			
3,9229	2,071	63,67	7,69072	2,200	1,30			
0,39229	2,563	34,20	0,769072	2,225	0,16			
0,039229	3,064	4,16	0,0769072	2,197	1,44			
0,0039229	3,053	4,82	0,00769072	2,227	0,07			
Prozessstufe 2		Prozessstufe 3		Prozessstufe 4		Prozessstufe 5		
Konzentration [µg/mL]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]
7817,5	1,823	78,53	1,951	70,83	1,539	31,44	1,628	27,38
781,75	1,945	71,19	2,013	67,15	1,571	29,98	1,706	23,83
78,175	2,428	42,29	2,966	10,06	1,607	28,34	1,855	17,03
7,8175	2,895	14,32	3,131	0,18	1,898	15,07	1,994	10,69
0,78175	3,066	4,07	3,118	0,96	2,110	5,40	2,089	6,36
0,078175	3,133	0,06	3,130	0,24	2,184	2,03	2,170	2,67
0,0078175	3,133	0,03	3,131	0,15	2,110	5,40	2,193	1,62
Prozessstufe 6		Prozessstufe 7		Prozessstufe 8		Prozessstufe 9		
Konzentration [µg/mL]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]
7817,5	1,822	18,54	1,882	74,96	2,061	64,27	1,699	24,15
781,75	1,868	16,44	2,179	57,17	2,365	46,06	1,741	22,23
78,175	2,022	9,42	2,757	22,58	2,817	18,96	1,804	19,36
7,8175	2,100	5,86	3,099	2,07	3,102	1,89	2,137	4,17
0,78175	2,150	3,58	3,118	0,93	3,132	0,12	2,120	4,95
0,078175	2,200	1,30	3,131	0,18	3,131	0,18	2,171	2,62
0,0078175	2,223	0,25	3,124	0,57	3,131	0,15	2,158	3,21
Prozessstufe 10		Prozessstufe 11						
Konzentration [µg/mL]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	Inhibi- tion [%]	OD [Skt]	OD [Skt]	OD [Skt]	
7817,5	2,797	17,06	2,822	15,55	<b>BL</b>	0,169	<b>B0</b>	3,149
781,75	2,878	12,06	2,912	9,95		0,198		3,118
78,175	2,939	8,28	2,957	7,20	<b>NSB</b>	1,469	<b>Bu</b>	3,563
7,8175	2,992	5,04	3,054	1,17		1,459		3,611
0,78175	3,070	0,22	3,049	1,51				
0,078175	3,072	0,09	3,069	0,28				
0,0078175	3,073	0,03	3,069	0,25				

Die Berechnung der Inhibitionen erfolgte nach Formel 8.2 (siehe 8.1.5)

## 8.6 Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmittel, Zubehör

### 8.6.1 Chemikalien

Tabelle 8.7a: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Sicherheitshinweise
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	Invitrogen	
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Fluka	
6-Aminohexansäure	Merck	
Ammoniumsulfat	Merck	
Anti Human IgE (Kaninchen)	Dako	
Anti Kaninchen IgG (Ziege)	Dako	
Borsäure	Merck	
Bromcyan	Merck	<b>T+</b> , <b>N</b> R26/27/28-34-50 S9-15-26-28.1-36/37/39-45-61
Citronensäure	Merck	<b>Xi</b> R36 S26
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva	
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	
Diocetylnatriumsulphosuccinat	Fluka	
EAST-Testkit „Spez. IgE ELISA TR (RV)“	Allergopharma	
Eisessig	Merck	<b>C</b> R10-35 S23.2-26-45
Ethanol 96 %	Merck	<b>F</b> R11 S7-16
Ethanolamin	Merck	<b>C</b> R20/21/22-34 S26-36/37/39-45
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck	<b>Xi</b> R36-52/53 S61
Formaldehyd 37 %	Merck	<b>T</b> R20/21/22-36/37/ 38-39/23/24/25-40-43 S26-36/37-45-51
Glutardialdehyd 25 %	Merck	
Glycerin	Merck	
Harnstoff	Merck	
IEF-Anodenpuffer	Invitrogen	
IEF-Kathodenpuffer; pH 3 - 7	Invitrogen	
Kaliumchlorid	Merck	
Kalium-di-Hydrogenphosphat	Merck	
Kartoffelprotein	Eigene Herstellung	
Lysin Freie Base	Merck	
Magnesiumchlorid	Merck	
MES SDS Running Buffer	Invitrogen	
Methanol	Merck	<b>F</b> , <b>T</b> R11-23/24/25-39/23/24/25 S7-16-36/37-45
Methylenblau	Merck	<b>Xn</b> R22
Methylrot	Merck	
MG-Marker (2,5-200 kDa)	Invitrogen	
Natriumacetat	Merck	
Natriumazid	Merck	<b>T+</b> , <b>N</b> R28-32-50/53 S28.1-45-60-61
Natriumchlorid	Merck	
Natrium-di-Hydrogenphosphat-Monohydrat	Merck	
Natriumdodecylsulfat	Serva	<b>F</b> , <b>Xn</b> R11-21/22-36/37/38 S26-36/37
Natriumhydrogencarbonat	Merck	
Natriumhydroxid	Merck	<b>C</b> R35 S26-36/37/39-45
Natriumhydroxid 1 M	Merck	<b>C</b> R34 S26-36/37/39-45
Natriumthiosulfat-pentahydrat	Merck	

Tabelle 8.7b: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Sicherheitshinweise
ortho-Phosphorsäure 85 %	Merck	C R34 S26-36/37/39-45
pI-Marker (pI 3 – 7)	Serva	
p-Nitrophenylphosphat	Sigma	
Ponceaurot	Sigma	
Rinderserumalbumin	Dako	
Salzsäure 1 M	Merck	<b>Xi</b> R36/37/38 S26
Salzsäure 4 M	Merck	<b>Xi</b> R36/37/38 S26
Silbernitrat	Merck	<b>C, N</b> R34-50/53 S26-45-60-61
Streptavidin-	Dako	
Meerrettichperoxidase		
Trichloressigsäure	Merck	<b>C, N</b> R35-50/53 S26-36/37/39-45-60-61
Tris-Hydroxymethyl-	J.P. Baker	<b>Xi</b> R36/38
Aminomethan		
Tris-Hydroxymethyl-	J.P. Baker	<b>Xi</b> R36/37/38 S 26-35-36/37-46
Aminomethan-Base		
Tween 20	Serva	
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck	<b>Xn</b> R22-41 S26-39

## 8.6.2 Geräte

Tabelle 8.8: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Blot-Einheit	Multiphor IINova Blot 2117-250	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Destillationsapparatur	Vapodest 12	Gerhardt (Bonn, Deutschland)
Elektrophorese-Kammer	EI-9001-Xcell II Mini Cell	Novex (San Diego, CA. USA)
ELISA-Plattenreader	Microplate Reader	MRX Dynex Technologies (Frankfurt, Deutschland)
Gefriertrocknungsanlage	Gamma A Beta 1-16	Christ (Osterode, Deutschland) Christ (Osterode, Deutschland)
Kolbenhubpipetten	0,5 – 5 µL 10 – 20 µL 100 – 200 µL 100 – 1000 µL 200 µL (12-Kanal)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kühlschrank	k.A.	k.A.
Kühltruhe (-20 °C)	k.A.	k.A.
Kühltruhe (-80 °C)	KLS 3085-1	Kryotec (Hamburg, Deutschland)
Magnetrührer	k.A.	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
pH-Elektrode	H 6160	Schott (Mainz, Deutschland)
pH-Meter	CG 801	Schott (Mainz, Deutschland)
Schüttler	Typ 3016	GFL (Hannover, Deutschland)
Stepper	Multipette Plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Thermostat	MGW Lauda RMT 6	Lauda (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Vortex	Reax Top	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Waage (fein)	1202 MP	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Waage (grob)	1602 004	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Wasserbad	FS 2	Haake (Karlsruhe, Deutschland)
Wasserstrahlpumpe	k.A.	Brand (Wertheim, Deutschland)
Zentrifuge	3 K 15	Sigma (Osterode, Deutschland)

### 8.6.3 Verbrauchsmittel und Zubehör

Tabelle 8.9: *Verwendete Verbrauchsmittel und Zubehör*

<b>Verbrauchsmittel bzw. Zubehör</b>	<b>Modell/Ausführung</b>	<b>Hersteller</b>
Blotmembranen	Nitrocellulose. 0.2 µm	Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland)
Extraktionsröhrchen	50 mL	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Färbe-Kunststoffschalen	8 Kammern	Bio Rad (Herkules, CA. USA)
Filterpapier (Cellulose)	Faltenfilter 110 mm Rundfilter 6 mm	Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland)
Haushaltstücher		Vileda (Weinheim, Deutschland)
IEF-Gele	NuPAGE IEF 3-7, 1 mm, 12 well	Invitrogen (San Diego. CA. USA)
Mikrotiterplatten	Minisorb, 96 Kavitäten	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Pipettenspitzen		Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Probengefäße	Glas 4 mL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Safe Lock. 2 mL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
SDS-PAGE-Gele	NuPAGE 4-12 % Bis-Tris, 1 mm, 12 & 2D well	Invitrogen (San Diego. CA. USA)



## 9 Literatur

### A

- AABIN B, POULSEN LK, EBBEHØJ K, NØRGARD A, FRØKIAER H, BINDSLEV-JENSEN C, BARKHOLT V (1996) Identification of IgE-binding egg white proteins: comparison of results obtained by different methods, *Int Arch Allergy Immunol* **109**: 50-57
- AALBERSEE RC (2000) Structural biology of allergens, *J Allergy Clin Immunol* **106**: 228-238
- AIGNER A, NEUMANN S (1997) *Immunochemie*, 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Berlin
- ALESSANDRI C, CALVANI M JR, ROSENGARTEN L, MADELLA C (2005) Anaphylaxis to quail egg, *Allergy* **60**: 128-133
- ALLERGOPHARMA (2005) Allergopharma Spez. IgE TR (RV), Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von allergenspezifischem IgE in Serum oder Plasma, Mikrotiterversion für 100 Tests, Joachim Ganzer KG, D-21465 Reinbek, Germany
- AMERSHAM BIOSCIENCES (1997) Automated silver and coomassie staining of polyacrylamide gels, *Protocol Guide*, 80-6343-34
- ANET J, BACK JF, BAKER RS, BARNETT D, BURLEY RW, HOWDEN EH (1985) Allergens in the white and yolk of hen`s egg. A study of IgE binding by egg proteins, *Int Arch Aller A Imm* **77**: 364-371
- ASTWOOD JD, LEACH JN, FUCHS RL (1996) Stability of food allergens to digestion in vitro, *Nat Biotechnol* **14**: 1269-1273
- AULEPP H, VIETHS S (1992) Probleme der Nahrungsmittelallergie, *Dtsch Lebensm Rundsch* **88**: 171-179

### B

- BARKHOLT V, BESLER M, SAMPSON HA (2000) Hen`s egg white (*Gallus domesticus*), *Internet Symposium on Food Allergens* **2**: 1-29
- BAXENDALE W, COURTENAY JS, PHILLIPS AW, ZOLA H (1971) Some properties of pigeon and other avian serum proteins, *Int J Biochem* **2**: 419

- BEARDEN JC JR. (1977) Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay, *Biochim Biophys Acta* **533**: 525-529
- BERNHISEL-BROADBENT J, DINTZIS HM, DINTZIS RZ (1994) Allergenicity and antigenicity of chicken egg Ovomuroid (Gal d III) compared with Ovalbumin (Gal d I) in children with egg allergy and in mice, *J Allergy Clin Immunol* **93**: 1047-1059
- BERKELMANN T, STENSTEDT T (1998) 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles and methods, Amersham Pharmacia Biotech Inc, Sweden
- BESLER M, PETERSEN A, STEINHART H, PASCHKE A (1999) Identification of IgE-binding peptides derived from chemical and enzymatic cleavage of ovomucoid (Gal d 1), *Internet Symposium on Food Allergens* **1**: 1-12
- BESLER M, STEINHART H, PASCHKE A (2000) Allergens of animal origin. Stability and allergenicity of processed foods, *Internet Symposium on Food Allergens* **2**: 171-184
- BIER M, TERMINIELLO L, DUKE JA, GIBBS RJ, NORD FF (1953) Investigations on proteins and polymers. X. Composition and fractionation of ovomucoid, *Arch Biochem Biophys* **47**: 465-473
- BISCHOFF SC, MANNS MP (1996) The scientific basis for food allergy, *Medizinische Klinik (Munich, Germany)* **91**: 389-395
- BISCHOFF SC, MANNS MP (2001) Food allergies, *Der Internist* **42**: 1108-1117
- BJÖRKSTEN L, HALMEPURO L, HANNUKSELA M, LAHTI A (1980) Extraction and properties of apple allergens, *Allergy* **35**: 671-677
- BONOMI F, IAMETTI S, CASTAGNA C, DALL'AGLIO GF, ROVERE PP (1999) Proteolysis of bovine beta-lactoglobulin and chicken egg ovalbumin during treatment at high pressure, *Proceedings of the International Conference, Heidelberg*, 289-292
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* **72**: 248-254
- BRIDGMAN PW (1914) The coagulation of albumen by pressure, *J Biol Chem* **19**: 511-512
- BRUIJNZEEL-KOOMEN C, ORTOLANI C, AAS K, BINDSLEV-JENSEN C, BJÖRKSTEN B, WÜTHRICH B (1995) Adverse reactions to food (position paper) *Allergy* **50**: 623-635



---

## C

- CANFIELD R (1963) The amino acid sequence of egg white lysozyme, *J Bio Chem* **238**: 2698-2707
- CAPONI L, MIGLIORINI P (1999) Antibody usage in the lab, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- CESKA M, LUNDKVIST U (1972) A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE, *Immunochem* **9**: 1021-1030
- COMPTON SJ, JONES CJ (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Anal Biochem* **151**: 369-374
- COOKE SK, ROWE BA, EIGENMANN PA, HUANG SK, SAMPSON HA (1996) Allergenic properties of ovomucoid, the dominant egg protein, *J Allergy Clin Immunol* **97**: 331
- COOMBS RRA, GELL PGH (1963) The classification of allergic reactions underlying disease, Clinical aspects of immunology, Davis, Philadelphia
- COOMBS RRA, MCLAUGHLAN P (1984) Allergenicity of food proteins and its possible modifications, *Ann Allergy* **53**: 592-596
- CRESPO JP, PASCUAL C, BURKS AW, HELM RM, ESTEBAN MM (1995) Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain, *Pediatr Allergy Immunol* **6**: 39-43

## D

- DEAN T (1997) Prevalence of allergic disorders in early childhood, *Pediatr Allergy Immunol* **8**: 27-31
- DE GROOT J, DE JONGH HHJ (2003) The presence of heat-stable conformers of ovalbumin affects properties of thermally formed aggregates, *Protein Engineering* **16**: 1035-1040
- DE MAAT-BLEEKER F, VAN DIJK AG, BERRENS L (1985) Allergy to egg yolk possibly induced by a sensitization to bird serum antigens, *Ann Allergy* **54**: 245-248
- DESERT C, GUÉRIN-DUBIARD C, NAU F, JAN G, VAL F, MALLARD J (2001) Comparison of different electrophoretic separations of hen egg white proteins, *J Agric Food Chem* **49**: 4553-4561

DÉSORMEAUX A, BLOCHET JE, PÉZOLET M, MARION D (1992) Amino acid sequence of a non-specific wheat phospholipid transfer protein and its conformation as revealed by infrared and Raman spectroscopy. Role of disulfide bridges and phospholipids in the stabilization of the alpha-helix structure, *Biochim Biophys Acta* **1121**: 137-152

DEUTSCH HF, MORTON JT (1956) Immunochemical properties of heated ovomucoid, *Arch Biochem Biophys* **64**: 19-25

DJURTOFT R, PETERSEN HS, AABIN B, BARKHOLT V (1991) Studies of food allergens: soybean and egg proteins, *Adv Exp Med Biol* **289**: 281-293

## E

EIGENMANN PA, HUANG SK, HO DG (1995) Characterization of T-cell clones and cell lines specific to ovomucoid, *J Allergy Clin Immunol* **95**: 366-371

ELSAYED S, APOLD J, HOLEN E, VIK H, FLORVAAG E, DYBENDAL T (1991) The structural requirements of epitopes with IgE binding capacity demonstrated by three major allergens from fish, egg and tree pollen, *Scand J Clin Lab Inv* **51**: 17-31

ELSAYED S, HAMMER ASE, KALVENES MB, FLORVAAG E, APOLD J, VIK H (1986) Antigenic and allergic determinants of ovalbumin. I. Peptide mapping, cleavage at the methionyl peptide bonds and enzymic hydrolysis of native and carboxymethyl OA, *Int Arch Aller A Imm* **279**: 101-107

ESTEBAN MM (1992) Adverse food reactions in childhood: Concept, importance, and present problems, *J Paediatrics* **121**: S1-S3

## F

FERNÁNDEZ SS, PADILLA AP, MUCCIARELLI S (1999) Protein extraction from *Atriplex lampa* leaves: Potential use as forage for animals used for human diets, *Plant Foods for Human Nutrition* **54**: 251-259

FU TJ, ABBOTT UR, HATZOS C (2002) Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid. A comparative study, *J Agric Food Chem* **50**: 7154-7160

## G

GALLATI H, PRACHT L (1985) Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, *J Clin Chem Clin Biochem* **23**: 453-460

- GEHA R (1995) Immunreaktion in Abwesenheit einer Infektion. in: Janeway C, Travers P (Hrsg.) Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag-Heidelberg, 489-538
- GÖRG A, POSTEL W, GÜNTHER S (1988) The current status of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, *Electrophoresis* **9**: 531-546
- GU J, MATSUDA T, NAKAMURA R (1986) Immunochemical identification of the allergens in egg white, *J Allergy Clin Immunol* **71**: 481-486
- GUTTMANN A (1996) Capillary sodium dodecyl-sulfate gel electrophoresis of proteins, *Electrophoresis* **17**: 1333-1341

## H

- HANDMAN E, JARVIS HM (1985) Nitrocellulose-based assays for the detection of glycolipids and other antigens: Mechanism of binding to nitrocellulose, *J Immunol Meth* **83**: 113-123
- HELENIUS A, MCCASLIN DR, FRIES E, TANFORD C (1979) Properties of detergents, *Methods Enzymol* **56**: 734-749
- HENZGEN M, VIETHS S, REESE I, ERDMANN S, FUCHS T, JÄGER L, KLEINE-TEBBE J, LEPP U, NIGGEMANN B, SALOGA J, VIELUF I, ZUBERBIER T, WERFEL T (2005) Nahrungsmittelallergien durch immunologische Kreuzreaktionen, *Allergo J* **14**: 48-59
- HEUKESHOVEN J, DERNICK R (1986) Neue Ergebnisse zum Mechanismus der Silberfärbung, Radola BJ (ed.), Elektrophoreseforum 86, Eigenverlag München, 22-27
- HIROSE J, KITABATAKE N, KIMURA A, NARITA H (2004) Recognition of native and/or thermally induced denatured forms of the major food allergen, ovomucoid, by human IgE and mouse monoclonal IgG antibodies, *Biosci Biotechnol Biochem* **68**: 2490-2497
- HOFFMANN DR (1983) Immunochemical identification of the allergens in egg white, *J Allergy Clin Immunol* **71**: 481-486
- HOFFMANN D, GUENTHER MD (1988) Occupational allergy to avian proteins presenting as allergy to ingestion of egg yolk, *J Allergy Clin Immunol* **81**: 484-488
- HOLEN E, ELSAYED S (1990) Characterization of four major allergens of hen egg-white by IEF/SDS-PAGE combined with electrophoretic transfer and IgE-immunoautoradiography, *Int Arch Allergy Appl Immunol* **91**: 136-141

**I**

ILLGNER (2000) Einfluss von hydrostatischem Druck und Temperatur auf die Antigenität von  $\beta$ -Lactoglobulin, Diplomarbeit, Fachhochschule Weihenstephan

**J**

JÄGER L, WÜTHRICH B (2002) Nahrungsmittelallergien und -intoleranzen, 2. Auflage, Urban & Fischer, München, Jena

JANEWAY CA, TRAVERS P (1995) Immunologie, Spektrum Verlag, Heidelberg

JANKIEWICZ A, BALTES W, BÖGL KW, DEHNE LI, JAMIN A, HOFFMANN D, HAUSTEIN D, VIETHS S (1997) Influence of Food Processing on the Immunochemical Stability of Celery Allergens, *J Sci Food Agric* **75**: 359-370

JEONG EJ (1998) A study on the allergenicity of egg protein, *Han'guk Sikip'um Yongyang Hakhoechi* **11**: 228-236

**K**

KALLWEIT E, FRIES R, KIELWEIN G, SCHOLTYSEK S (1988) Qualität tierischer Nahrungsmittel, 1. Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

KAJOSAARI M (1982) Food allergy in Finnish children aged 1 to 6 years, *Acta Paediatr Scand* **71**: 815-819

KANNY G, MONERET-VAUTRIN DA, FLABBÉE J, BEAUDOUIN E, MORISSET M, THEVENIN F (2001) Population study of food allergy in France, *J Allergy Clin Immunol* **108**: 133-140

KATO I, SCHRODE J, KOHR WJ, LASKOWSKI M JR (1987) Chicken Ovomuroid: determination of its amino sequence, determination of the trypsin reactive site, and preparation of all three of its domains, *Biochemistry-US* **26**: 193-201

KATO Y, OZAWA E, MATSUDA T (2001) Decrease in antigenic and allergenic potentials of ovomucoid by heating in the presence of wheat flour: Dependence on wheat variety and intermolecular disulfide bridges, *J Agric Food Chem* **49**: 3661-3665

KOCH C, JENSEN SS, OSTER A, HOUEN G (1996) A comparison of the immunogenicity of the native and denatured forms of a protein, *APMIS* **104**: 115-125

- KONISHI Y, KURISAKI J, KAMINOGAWA S, YAMAUCHI K (1985) Determination of antigenicity by radioimmunoassay and of trypsin inhibitory activities in heat or enzyme denatured ovomucoid, *J Food Sci* **50**: 1422-1426
- KOVACS-NOLAN J, ZHANG JW, HAYAKAWA S, MINE Y (2000) Immunochemical and structural analysis of the pepsin-digested egg white ovomucoid, *Int Arch Allergy Immunol* **48**: 6261-6266
- KREFT D, BAUER R, GÖRLICH R (1995) Nahrungsmittelallergene – Charakteristika und Wirkungsweise, de Gruyter, Berlin, New York
- KYHSE-ANDERSEN J (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J Biochem Biophys Methods* **10**: 203-209

## L

- LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4, *Nature* **227**: 680-685
- LANGELAND T (1982a) A clinical and immunological study of allergy to hen`s egg white. II. Antigens in hen`s egg white studied by crossed immunoelectrophoresis (CIA), *Allergy* **37**: 323-333
- LANGELAND T (1982b) A clinical and immunological study of allergy to hen`s egg white. III. Allergens in hen`s egg white studied CRIE, *Allergy* **37**: 521-530
- LANGELAND T (1983) A clinical and immunological study of allergy to hen`s egg white. VI. Occurrence of protein cross-reacting with allergens in hen`s egg white as studied in egg white from turkey, duck, goose, seagull, and in hen egg yolk, and hen and chicken sera and flesh, *Allergy* **38**: 399-412
- LANGELAND T (1985) Allergy to hen`s egg white in atopic dermatitis, *Acta Derm Venereol (Stockh)* **114**: 109-112
- LANGELAND T, HARBITZ O (1983) A clinical and immunological study of allergy to hen`s egg white. V. Purification and identification of a major allergen (antigen 22) in hen`s egg white, *Allergy* **38**: 131-139
- LANNE B, PANFILOV O (2004) Protein staining influences the quality of mass spectra obtained by peptide mass fingerprinting after separation on 2-D gels. A comparison of staining with Coomassie Brilliant Blue and Sypro Ruby, *Journal of Proteome Research* **4**: 175-179
- LEBENSMITTEL- UND FUTTERMITTELGESETZBUCH (LFGB) § 64 i. d. Fassung vom 26. April 2006, ASU (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren), Nr. L 06.00-7, Referenzmethoden Gesamtstickstoffbestimmung

- LEDUC V, DEMEULEMESTER C, POLACK B, GUIZARD C, LE GUERN L, PELTRE G (1999) Immunochemical detection of egg-white antigens and allergens in meat products, *Allergy* **54**: 464-472
- LEE YH (1992) Food-processing approaches to altering allergenic potential of milk-based formula, *J Pediatr* **121**: 47-50
- LEHRER SB, HORNER WE, REESE G (1996) Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology *Cri Rev Food Sci Nutr* **36**: 553-564
- LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT (2005) Agrarmärkte Jahresheft 2005, Teilauszug: Eier und Schlachtgeflügel ([http://www.lfl.bayern.de/iem/agrarmarktpolitik/15911/linkurl\\_0\\_11\\_0\\_0.pdf](http://www.lfl.bayern.de/iem/agrarmarktpolitik/15911/linkurl_0_11_0_0.pdf))
- LICHTENSTEIN L (1993) Allergy and the immune system, *Sc Am* **269**: 117-124

## M

- MARTINEZ A, FERNANDEZ-RIVAS M, MARTINEZ J, PALACIOS R (1997) Improvement of fruit allergenic extracts for immunoblotting experiments, *Allergy* **52**: 155-161
- MATSUDA T, WATANABE K, NAKAMURA R (1982) Immunochemical studies of the thermal denaturation of ovomucoid, *Biochim Biophys Acta* **707**: 121-128
- MATSUDA T, WATANABE K, NAKAMURA R (1983) Immunochemical and physical properties of peptic digested ovomucoid, *J Agric Food Chem* **31**: 942-946
- MATSUDA T, TSURUTA K, NAKABE Y, NAKAMURA R (1985) Reduction of ovomucoid immunogenic activity on peptic fragmentation and heat denaturation, *Agric Biol Chem* **49**: 2237-2241
- MCLAUGHLAN P, ANDERSON KJ, WIDDOWSON EM, COOMBS RRA (1981) Effect of heat on anaphylactic sensitising capacity of cow's milk, goat's milk, and various infant formulae fed to guinea pigs, *Arch Dis Child* **56**: 165-171
- MEANS GE, FEENEY RE (1971) Chemical modification of proteins, CA: Holden-Day, San Francisco, USA 198-204
- MERCK (2006) METHODENBESCHREIBUNG, 1.10306. Bioquant<sup>®</sup> Protein (nach Bradford-Methode), Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
- MEYER AH, Lebensmittelrecht, Verlag C. H. Beck München, Stand: 1. Februar 2006
- MICROSOFT (2004) Microsoft Encarta Enzyklopädie, Microsoft Cooperation
- MINE Y, ZHANG JW (2002) Comparative studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins, *J Agric Food Chem* **50**: 2679-2683

- MÖLLER M, PASCHKE A, VIELUF D, KAYMA M, VIETHS S, STEINHART H (1997) Characterization of allergens in kiwi fruit and detection of cross-reactivity with allergens of birch pollen and related fruit allergens, *Food Agric Immunol* **9**: 107-121
- MOHRING A (2000) Optimierung der Isolierung von Allergenen mittels Affinitätschromatographie am Beispiel der Mango (*mangifera indica*), Diplomarbeit
- MORISSET M, MONERET-VAUTIN DA, KANNY G, GUÉNARD L, BEAUDOUIN E, FLABBÉE J, HATAHET R (2003) Thresholds of clinical reactivity to milk, egg, peanut and sesame in immunoglobulin E-dependent allergies: evaluation by double-blind or single-blind placebo-controlled oral challenges *Clin Exp Allergy* **33**: 1046-1051

## N

- NATALE M, BISSON C, MONTI G, PELTRAN A, GAROFFO LP, VALENTINI S, FABRIS C, BERTINO E, COSCIA A, CONTI A (2004) Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry, *Mol Nutr Food Res* **48**: 363-369
- NEUGEBAUER J (1988) A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry, *Calbiochem Biochemicals*
- NEUHOFF V, AROLD N, TAUBE D, ERHARDT W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250, *Electrophoresis* **9**: 255-262
- NISBET AD, SAUNDRY RH, MOIR AJG, FOTHERGILL LA, FOTHERGILL JE (1981) The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin, *Eur J Biochem* **115**: 335-345
- NØRGAARD A, BINDSLEV-JENSEN C (1992) Egg and milk allergy in adults, *Allergy* **47**: 503-509

## O

- ORTOLANI C, BRUIJNZEEL-KOOMEN C, BENGTTSSON U, BINDSLEV-JENSEN C, BJÖRKSTÉN B, HØST A, ISPANO M, JARISH R, MADSEN C, NEKAM K, PAGANELLI R, POULSEN LK, WÜTHRICH B (1999) Controversial aspects of adverse reactions to food (position paper), *Allergy* **54**: 27-45

## P

- PASTORELLO EA, TRAMBAIOLI C (2001) Isolation of food allergens, *J Chromatogr B* **756**: 71-84
- PENG HJ, CHANG ZN, TSAI LC, SU SN, SHEN HD, CHANG, CH (1998) Heat denaturation of egg-white proteins abrogates the induction of oral tolerance of specific Th2 immune response in mice, *Scand J Immunol* **48**: 491-496
- PERLMANN G (1952) Enzymatic dephosphorylation of ovalbumin and plakalbumin, *J Gen Physiol* **35**: 711-726
- PIERCE J, SUELTER CH (1977) An evaluation of the Coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination, *Anal Biochem* **81**: 478-480

## R

- READ SM, NORTHCOTE DH (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G dye binding assay for protein, *Anal Biochem* **116**: 53-64
- RHODES MB, BENNETT N, FEENEY RE (1960) Trypsin and chymotrypsin inhibitors from avian egg whites, *J Biol Chem* **235**: 1686-1693
- RICHARDS MP, HUANG TL (1997) Metalloprotein analysis by capillary isoelectric focusing, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **690**: 43-54
- RING J (1988) Klinik und Einteilung allergischer Erkrankungen. in: Angewandte Allergologie, Medizin Verlag GmbH, München
- ROITT IM, BROSTOFF J, MALE DK (1995) Immunology, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

## S

- SAMPSON HA (1991) Immunologic mechanism in adverse reactions to foods, *Immunology and Allergy Clinics of North America* **11**: 701-716
- SCHÄFER T, BREUER K (2003) Epidemiology of food allergies, *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie und verwandte Gebiete* **54**: 112-120
- SCHEIBENZUBER M (2002) Molekulare und klinische Auswirkungen einer Hochdruckbehandlung von allergenen Lebensmitteln, Dissertation, Technische Universität München



- SCHMIDT F, SCHMID M, JUNGBLUT PR, MATTOW J, FACIUS A, PLEISSNER KP (2003) Iterative data analysis is the key for exhaustive analysis of peptide mass fingerprints from proteins separated by two-dimensional electrophoresis, *J Am Soc Mass Spectrom* **14**: 943-956
- SCHÖBERL H (1999) Physikalisch-chemische und strukturelle Auswirkung einer hydrostatischen Hochdruckbehandlung auf Lebensmittel, Dissertation, Technische Universität München
- SCHORMÜLLER J (1968) Handbuch der Lebensmittelchemie, Band III/2. Teil, Tierische Lebensmittel, Eier, Fleisch, Fisch, Buttermilch, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- SCHÜTTE L, GREMEL S, STEINHART H, PASCHKE A (2005) Comparison and optimisation of blocking and incubation systems to investigate milk allergens, macromolecules and their degradation products in food - physiological, analytical and technical aspects, *Proceedings of the International Conference Euro Food Chem XIII*, Hamburg, Germany, 21<sup>th</sup> - 23<sup>th</sup> Sept., **1**: 142-145
- SEDMAK JJ, GROSSBERG SE (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250, *Anal Biochem* **79**: 544-552
- SOUCI SW, FACHMANN W, KRAUT H (1991) Lebensmitteltabellen für die Praxis; herausgegeben von der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching bei München, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- SPECTOR T (1978) Refinement of the Coomassie Blue method of protein quantification, *Anal Biochem* **786**: 142-146
- STAINES N, BROSTOFF J, JAMES K (1997) Immunologisches Grundwissen, 3. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin
- STANLEY JS, BANNON GA (1999) Biochemistry of food allergens, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* **17**: 279-291
- STEVENS FC, FEENEY RE (1963) Chemical modification of avian ovomucoid, *Biochem* **2**: 1346-1352
- STOTT DI (1989) Immunoblotting and dot blotting, *J Immunol Meth* **119**: 153-187
- SZEPFALUSI Z, EBNER C, PANDJAITAN R, ORLICEK F, SCHEINER O, BOLTZ-NITULESCU G, KRAFT D, EBNER H (1994) Egg yolk alpha-livetin (chicken serum albumin) is a cross-reactive allergen in the bird egg syndrome, *J Allergy Clin Immunol* **93**: 932-942

**T**

- TAKAGI K, TESHIMA R, OKUNUKI H, SAWADA JI (2003) Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion, *Biol Pharm Bull* **26**: 969-973
- TAL M, SILBERSTEIN A, NUSSER E (1980) Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer, *J Biol Chem* **260**: 9976-9980
- TAYLOR SL, LEMANSKE RF JR, BUSH RK (1987) Food allergens: structure and immunologic properties, *Ann Allergy* **59**: 93-99
- TOWBIN H, GORDON J (1984) Immunoblotting and dot blotting – current status and outlook, *J Immunol Meth* **72**: 3131-3140
- TRAVIS J (1971) Human pancreatic enzymes: Interaction of human trypsin with chicken ovomucoid, *Biochem Biophys Res Commun* **44**: 793

**U**

- URISU A, ANDO H, MORITA Y, WADA E, YASAKI T, YAMADA K, KOMADA K, TORII S, GOTO M, WAKAMATSU T (1997) Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white, *J Allerg Clin Immunol* **100**: 171-176

**V**

- VIETHS S, SCHÖNING B, BALTES W (1992a) Allergy to fruits and vegetables in pollensensitive patients: Allergen characterisation by IgE immunoblotting and peroxidase staining, *Food Agr Imm* **4**: 181-197
- VIETHS S, SCHÖNING B, BROCKMANN S, AULEPP H (1992b) Untersuchungen zur Allergie gegen Lebensmittel pflanzlicher Herkunft: Herstellung und Charakterisierung von Obst- und Gemüseextrakten für serologische Untersuchungen; *Dtsch Lebensm Rundsch* **88**: 239-243 & 273-278
- VIETHS S, SCHÖNING B, AULEPP H, BALTES W (1993a) Identifizierung kreuzreagierender Allergene in Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln, *Lebensmittelchemie* **47**: 49-53
- VIETHS S, SCHÖNING B, JANKIEWICZ A (1993b) Occurrence of IgE binding allergens during ripening of apple fruits, *Food Agric Immunol* **5**: 93-105
- VIETHS S, SCHÖNING B, PETERSEN A (1994) Characterization of the 18-kDa apple allergen by two dimensional immunoblotting and microsequencing, *Int Arch Allergy Immunol* **104**: 399-404

VIETHS S (1996) Lebensmittelallergien und andere Unverträglichkeitsreaktionen gegen Lebensmittel, Jahresbericht des Paul-Ehrlich-Instituts, Langen

VIETHS S, JANKIEWICZ A, AULEPP H, HAUSTEIN D (1997) Allergy to heated and processed foods, 8th International Paul Ehrlich Seminar, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, 250-252

VON PIRQUET C (1906) *Allergie Münch med Wschr* **30**: 1457

## W

WAHLI W, DAWID IB, RYFFEL GU, WEBER R (1981) Vitellogenesis and the vitellogenin gene family, *Science* **212**: 298-304

WALSH BJ, BARNETT D, BURLEY RW, ELLIOT C, HILL DJ, HOWDEN MEH (1988) New allergens from hen`s egg white and egg yolk, *Int Arch Allergy Appl Immunol* **87**: 81-86

WALSH BJ, ELLIOT C, BAKER RS, BARNETT D, BURLEY RW, HILL DJ, HOWDEN MEH (1987) Allergenic cross-reactivity of egg-white and egg-yolk proteins, *Int Arch Allergy Appl Immunol* **84**: 228-232

WARNER RC (1954) The proteins, Neurath H, Bailey K. eds, Academic press, London

WESTERMEIER R (1990) Elektrophorese-Praktikum, VCH-Verlag, Weinheim

WILLIAMS J (1962) Serum proteins and the livetins of hen`s-egg yolk, *Biochem J* **83**: 346-355

WILLIAMS J, ELLERMAN TC (1982) The primary structure of hen ovotransferrin, *Eur J Biochem* **122**: 297

WITTEMANN AM, AKKERDAS JA, VAN LEEUWEN J, VAN DER ZEE JS, AALBERSEE RC (1994) Identification of a cross-reactive allergen (presumably tropomyosin) in shrimp, mite and insects, *Int Arch Allergy Appl Immunol* **105**: 56

WÜTHRICH B (1993) Nahrungsmittelallergie, *Allergologie* **16**: 280-287

WÜTHRICH B (1996) Zur Nahrungsmittelallergie: Begriffsbestimmung, Diagnostik, Epidemiologie, Klinik, *Schweiz Med Wochenschr* **126**: 770-776

WÜTHRICH B, SCHINDLER P, LEUENBERGER P, ACKERMANN-LIEBRICH U (1995) Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (Sapaldia study), *Int Arch Allergy Immunol* **106**: 149-156

WÜTHRICH B, SCHINDLER P, LEUENBERGER P, ACKERMANN-LIEBRICH U (1999) Atopische Sensibilisierung, Luftverschmutzung und respiratorische Erkrankungen in der Schweiz (Sapaldia-Studie), *Allergologie* **22**: 267-274

WYSS M, HUWYLER T, WÜTHRICH B (1996) „Bird-egg“ and „eggbird-syndrome“. Kreuzsensibilisierung zwischen inhalativen und ingestiven Vogelproteinen, *Allergologie* **14**: 275-278

## Y

YOSHITADA N, YOSHINOBU F, NOBORU N, TOSHITAKA Y (1980) Pasteurization and quality maintenance of eggs for industrial use. IX. Disc gel electrophoretic evaluation of heat-denatured egg proteins for detecting pasteurized liquid eggs, *Rakuno Kagaku, Shokuhin no Kenkyu* **29**: A85-A90

YOUNG E, STONEHAM MD, PETRUCKEVITCH A, BARTON J, RONA R (1994) A population study of food intolerance, *Lancet* **343**: 1127-1130

## Z

ZIERMANN A (2005) Mikrobiologische Kriterien für Milch, Milchprodukte und andere Lebensmittel in Europa, Inaugural-Dissertation

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben:

Name: Sabine Gremmel  
Geburtsdatum: 05.08.1978  
Geburtsort: Bremerhaven

## Ausbildung:

Promotion:	2003 – 2007	Themengebiet: „Lebensmittelallergien“, Universität Hamburg
Studium:	1998 – 2006	Studium der Lebensmittelchemie, Universität Hamburg
	2007	Abschluss: Staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin
	2003	Erste Lebensmittelchemische Staatsprüfung; Diplom in Lebensmittelchemie
Schulbildung:	1995 – 1998	Berufsbildende Schulen Schiffdorf, Abschluss: Abitur
	1991 – 1995	Gymnasium Loxstedt, Erweiterter Sekundarabschluss I
	1989 – 1991	Orientierungsstufe Loxstedt
	1985 – 1989	Grundschule Loxstedt

## Berufstätigkeit:

Arbeitsverhältnis:	2006 – 2007	praktisches halbe Jahr im Rahmen der Zweiten Lebensmittelchemischen Staatsprüfung am Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg
	2003 – 2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Universität Hamburg



## Vorträge, Poster und Publikationen

- GREMMEL S, PASCHKE A (2007) Book chapter “Egg allergenicity” in: “Managing allergens in food”, ed.: C Mills, H Wichers, K Hofmann-Sommergruber, CRC Press, Woodhead Publishing Limited
- GREMMEL S, STEINHART H, PASCHKE A: „Allergen ist nicht gleich Allergen! Lebensmittelunverträglichkeiten und Senkung der Allergenität durch Küchenpraxis & Co.“ *Vortrag* - Fortbildung: Gütegemeinschaft Diät und Vollkost e.V. in Bad Sassendorf, März 2006
- GREMMEL S, SCHÜTTE L, STOYANOV S, HAMMER G, STEINHART H, PASCHKE A (2005) Immunochemical detection of egg-white allergens in processed meat products Allergen; Proceedings of the EURO FOOD CHEM XIII, 09/2005, Volume 1, 136-140
- GREMMEL S, SCHÜTTE L, STOYANOV S, HAMMER G, STEINHART H, PASCHKE A: “Macromolecules and their degradation products in food - physiological, analytical and technological aspects: Immunochemical detection of egg-white allergens in processed meat products” *Vortrag* - EURO FOOD CHEM XIII in Hamburg, September 2005
- SCHÜTTE L, GREMMEL S, STEINHART H, PASCHKE A: “Comparison and Optimisation of Blocking and Incubation Systems to Investigate Milk Allergens” *Poster* - EURO FOOD CHEM XIII in Hamburg, September 2005
- GREMMEL S, STEINHART H, PASCHKE A (submitted) Comparison of different extraction solutions for hen’s egg allergen analysis
- GREMMEL S, KRATZIN H, SCHALLER R, FRITSCHÉ R, STEINHART H, PASCHKE A (submitted) *In vitro* determination of the allergenic potential of technologically altered hen’s egg