

**Einfluß der technologischen Verarbeitung auf das
allergene Potential der birkenpollenassoziierten
Lebensmittel Haselnuß, Apfel und Karotte**

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

Michael Wigotzki

aus Hamburg

Hamburg 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1997 bis Oktober 2000 unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie, der Universität Hamburg angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart und Prof. Dr. G. Gercken

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2001

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart und Frau Dr. A. Paschke möchte ich für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. G. Gercken danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Dem Forschungsbereich der Ernährungsindustrie möchte ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Miriam Malerius, Oliver Bendokat, Silke Schubert, Sabine Soehring und Torben Vogel, die mit ihrer großartigen Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Den Mitarbeitern der Abteilung Lebensmittel pflanzlicher Herkunft des Instituts für Lebensmitteltechnologie der Universität Hohenheim, insbesondere Herrn Prof. Dr. habil. R. Carle, Frau Dr. S. Neidhart, Frau P. Hutasingh und Herrn K. Mix, möchte ich für die hervorragende Zusammenarbeit danken.

Den Mitarbeitern der Hautklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf danke ich für ihre Kooperationsbereitschaft bei der Beschaffung von Patientenseren.

Außerdem danke ich allen Kollegen, insbesondere denen der Arbeitsgruppe Lebensmittelallergien für ihre Unterstützung in vielfältiger Weise.

Abschließend möchte ich ganz besonders Katy Zunker für ihre vielen motivierenden Worte und Taten sowie für die kritische Durchsicht des Skripts danken.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Problemstellung	1
1.2	Grundlagen allergischer Reaktionen	2
1.3	Nachweis von Lebensmittelallergien	6
1.4	Pollenassoziierte Lebensmittelallergie	7
1.5	Die Allergien gegen Haselnuß, Apfel und Karotte	8
2	Material	11
2.1	Patientenseren	11
2.2	Die Haselnuß (<i>Corylus avellana</i> L.)	11
2.2.1	Haselnuß-Handelsprodukte	12
2.3	Der Apfel (<i>Malus domestica</i> Borkh.)	12
2.3.1	Fluide Apfelprodukte	12
2.3.2	Apfel-Handelsprodukte	13
2.4	Die Karotte (<i>Daucus carota</i> L.)	13
2.4.1	Fluide Karottenprodukte	14
2.4.2	Karotten-Handelsprodukte	16
2.5	Enzyme	16
3	Methoden	17
3.1	Herstellung der Proteinextrakte	17
3.2	Proteinbestimmung	17
3.3	Enzymallergosorbent-Test (EAST)	18
3.4	EAST-Inhibition	18
3.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	19
3.5.1	SDS-PAGE von Proteinen (14-94 kDa)	19
3.5.2	SDS-PAGE von Proteinen und Peptiden (2.5-94 kDa)	19
3.6	Semidry-Blotting	20
3.6.1	Immunoblot	20
3.6.2	Immunoblot-Inhibition	21
3.7	Unspezifische Proteinfärbungen	21
3.7.1	Silberfärbung	21
3.7.2	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung	22
3.7.3	Kolloidale Goldfärbung	22

4	Ergebnisse	23
4.1	Untersuchungen zur Haselnuß	23
4.1.1	Charakterisierung der Haselnußallergene unter Berücksichtigung verschiedener Sorten	23
4.1.2	Einfluß von Erhitzungsprozessen auf die Allergene der Haselnuß	24
4.1.3	Einfluß des enzymatischen Verdaus auf die Allergenität der Haselnuß	28
4.1.4	Untersuchung des allergenen Potentials handelsüblicher Produkte	31
4.2	Untersuchungen zum Apfel	35
4.2.1	Charakterisierung der Apfelallergene	35
4.2.2	Untersuchung des allergenen Potentials fluider Apfelprodukte	36
4.2.3	Untersuchung des allergenen Potentials eines Warenkorbs	45
4.3	Untersuchungen zur Karotte	49
4.3.1	Charakterisierung der Karottenallergene	49
4.3.2	Einfluß der Erhitzung auf die Allergenität der Karotte	50
4.3.3	Untersuchung des allergenen Potentials fluider Karottenprodukte	53
4.3.4	Untersuchungen des allergenen Potentials eines Warenkorbs	61
5	Diskussion	65
5.1	Haselnuß	65
5.2	Apfel	68
5.3	Karotte	72
5.4	Gesamtbetrachtung und Ausblick	74
6	Zusammenfassung/Summary	75
7	Anhang	79
7.1	Gewinnung der Patientenseren	79
7.2	Proteinextraktion	79
7.2.1	Tiefemperaturextraktion	79
7.2.2	Extraktion der Haselnüsse und Haselnußprodukte	80
7.2.3	Extraktion der enzymatisch behandelten Haselnüsse	80
7.3	Proteinbestimmung	81
7.4	Enzymallergosorbent-Test (EAST)	81
7.4.1	Herstellung der Allergenscheiben	81
7.4.2	EAST-Bestimmung	83
7.5	EAST-Inhibition	84
7.6	SDS-PAGE (NuPAGE™)	85
7.7	Semidry-Blotting	87
7.8	Immunochemische Detektion	88

7.9 Immunoblot-Inhibition	89
7.10 Unspezifische Proteinfärbungen	90
7.10.1 Silberfärbung	90
7.10.2 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung	91
7.10.3 Kolloidale Goldfärbung	91
7.11 Charakterisierung der verwendeten Patientenseren	92
7.12 Untersuchungsmaterial	95
7.12.1 Haselnuß	95
7.12.2 Apfel	100
7.12.3 Karotte	103
7.13 Ergebnisse der EAST-Inhibitionen	107
7.14 Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmittel, Zubehör	126
7.14.1 Chemikalien	126
7.14.2 Geräte	127
7.14.3 Verbrauchsmittel, Zubehör	128
8 Literaturverzeichnis	129

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP	Alkalische Phosphatase
Api g 1	Apium graveolens 1
Apü	Apfelpüree
Art v 1	Artemisia vulgaris 1
AS	Ascorbinsäure
Bet v 1	Betula verucosa 1
Dau c 1	Daucus carota 1
dest.	destilliert
DS	Dekanter saft
EAST	Enzymallergosorbent-Test
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
Ig	Immunglobulin
KZE	Kurzzeiterhitzung
LMA	Lebensmittelallergie
Mal d 1	Malus domestica 1
MG	Molekulargewicht
NC	Nitrocellulose
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAL	Pektatlyase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PL	Pektinlyase
PS	Preßsaft
RAST	Radioallergosorbent-Test
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
TMB	Tetramethylbenzidin
UH	Universität Hohenheim

1 EINLEITUNG

Allergische Erkrankungen sind bereits seit Jahrhunderten bekannt. Schon in der antiken medizinischen Literatur werden entsprechende Reaktionen beschrieben. Die durch Lebensmittel verursachten allergischen Krankheitsbilder sind sehr vielfältig, wodurch sich der hohe zu leistende diagnostische Aufwand erklären läßt. Besonders häufig manifestieren sich Lebensmittelallergien (LMA) am Hautorgan sowie am Gastrointestinaltrakt und an den Atemwegen (RING 1989). Während bei Säuglingen und Kleinkindern die intestinalen Reaktionen überwiegen (BOCK & ATKINS 1990), zeigen sich die LMA bei älteren Kindern und Erwachsenen überwiegend in Form des oralen Allergiesyndroms, gefolgt von kutanen und respiratorischen Manifestationen (SAVAL ET AL. 1993, WÜTHRICH ET AL. 1993). Es können Symptome wie Urtikaria, Quincke-Ödem, Asthma bronchiale, allergische Rhinitis, Vaskulitis oder sogar ausgeprägte anaphylaktische Schocks auftreten (RING 1988, CHANDRA 1997). Die wirksamste und sicherste Therapie besteht bisher nur in einer möglichst konsequenten Karenz der auslösenden Allergene.

Aus verschiedenen epidemiologischen Studien ergeben sich Anhaltspunkte für eine Zunahme allergischer Erkrankungen (ANDRÉ ET AL. 1994, MONERET-VAUTRIN & KANNY 1995). Bezüglich des Anteils der Allergiker an der Gesamtbevölkerung liegen unterschiedliche Schätzungen vor. Für Erwachsene liegen die Angaben zwischen 0.3 % und 2.4 % (NIESTIJL JANSEN ET AL. 1994, YOUNG ET AL. 1994, CASTILLO ET AL. 1996, WÜTHRICH 1996, CHANDRA 1997), bei Kindern wird der Anteil mit 1.3 % bis 8 % zumeist höher eingestuft (BURKS & SAMPSON 1993, CHANDRA 1997, HILL ET AL. 1997). Diese variierenden Schätzungen machen deutlich, daß es sich bei LMA um individuell determinierte Krankheiten, die regional unterschiedlich verteilt sind, handelt.

Die klassische Lebensmittelallergie verläuft in der Regel als Soforttypreaktion unter Beteiligung von Immunglobulinen (Ig) der Klasse E. Bei den Allergenen handelt es sich im allgemeinen um natürlicherweise im Lebensmittel vorkommende Proteine oder Glycoproteine (AULEPP & VIETHS 1992).

1.1 Problemstellung

Obwohl die Strukturen einzelner pflanzlicher Lebensmittelallergene, wie beispielsweise des Mal d 1 des Apfels (VIETHS ET AL. 1995, HSIEH ET AL. 1995), des Api g 1 des Selleries (BREITENEDER ET AL. 1995) oder des Dau c 1 der Karotte (HOFFMANN-SOMMERGRUBER ET AL. 1999) bereits eingehend untersucht und aufgeklärt wurden, ist über diverse weitere allergene Strukturen in pflanzlichen Lebensmitteln nur wenig bekannt. Ebenso fehlen ausführliche Untersuchungen des Einflusses einer technologischen Verarbeitung auf die Allergenität. Diese wurden bisher nur anhand einzelner Obst- und Gemüsesorten, wie etwa des Selleries (JANKIEWICZ ET AL. 1995, JANKIEWICZ ET AL. 1998) oder der Erdnuß (BURKS ET AL. 1992, VIETHS ET AL. 1998, KOPPELMANN ET AL. 1999) durchgeführt. Ansonsten werden lediglich einfache Untersuchungen zur Hitzeempfindlichkeit von Allergenen oder Allergenextrakten beschrieben (DREBORG & FOUCARD 1983, VIETHS ET AL., 1998, STEINHART ET AL. 2001). Eine eingehende Analyse der Allergenität von Zwischenprodukten bei der Obst- und Gemüseproduktion erfolgte bisher ebensowenig wie eine Betrachtung des allergenen Potentials der

Endprodukte. Eine solche Untersuchung ist das Ziel der vorliegenden Arbeit. Als Untersuchungsgut dienen die birkenpollenassoziierten Lebensmittel Haselnuß, Apfel und Karotte. Zunächst wird anhand eines Warenkorbes die Überprüfung des allergenen Potentials diverser Handelsprodukte vorgenommen. Während am Beispiel des Apfels und der Karotte außerdem die Untersuchung definiert hergestellter Zwischen- und Endprodukte der Saftverarbeitung erfolgt, werden am Beispiel der Haselnuß der Einfluß der Sorte, verschiedener Erhitzungsverfahren sowie der in vitro Verdauung auf die Allergenität untersucht. Zur Umsetzung dieser Ziele werden zunächst Proteinextrakte aus den nativen Lebensmitteln sowie aus den unterschiedlichen Zwischen- und Endprodukten gewonnen. Anschließend werden die Proteine mittels elektrophoretischer Verfahren getrennt und die Allergene im Immunoblot charakterisiert. Eine halbquantitative Abschätzung des allergenen Potentials erfolgt unter Verwendung weiterer immunologischer Verfahren, wie der EAST-Inhibition.

1.2 Grundlagen allergischer Reaktionen

Der Begriff Allergie ist auf den Wiener Kinderarzt Clemens VON PIRQUET (1906) zurückzuführen, der damit ganz allgemein eine spezifisch veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus bezeichnete. Heute versteht man unter einer Allergie „eine spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit“ (RING 1988). Als Allergie sind daher einzig diejenigen klinischen Krankheitsbilder zu bezeichnen, deren Symptomatik aus immunologischen Mechanismen hervorgeht (WÜTHRICH 1986). Demzufolge sind allergische Reaktionen auf Lebensmittel klar von weiteren Überempfindlichkeitsreaktionen, die nicht immunvermittelt sind, abzugrenzen. Tabelle 1.1 stellt eine Einteilung nicht-toxischer Lebensmittelunverträglichkeitsreaktionen nach einem Positionspapier der *European Academy of Allergy and Clinical Immunology* dar (BRUIJNZEL-KOOMEN ET AL. 1995).

Tab. 1.1: Klassifizierung nicht-toxischer Lebensmittelüberempfindlichkeitsreaktionen

Immunvermittelt Lebensmittelallergie	Nicht-immunvermittelt Lebensmittelintoleranz	Unbekannte Rolle im Immunmechanismus
IgE-vermittelt Typ I Reaktion	Enzymatische Reaktionen	Zöliakie
Nicht-IgE-vermittelt Immunkomplexreaktion (IgG/IgM, zellvermittelt)	Pharmakologische Reaktionen	Gefäßentzündungen der Haut
	Undefinierte Reaktionen („pseudoallergisch“)	Eosinophile Entzündungen der Magen- und Darm- schleimhäute
		Proteininduzierte Gastroenteropathie
		Zusatzstoffe wie Sulfite oder Azofarbstoffe
		„Ökosyndrom“

Eine entscheidende Rolle bei den immunvermittelten Reaktionen spielen die **Immunglobuline (Ig)**. Ig sind Antikörper, die von Plasmazellen, die ihrerseits aus umgewandelten B-Lymphozyten entstehen, synthetisiert, an die Zelloberfläche gebracht und sezerniert werden. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Markierung, Inhibierung und Neutralisierung von Antigenen. Die Grundstruktur aller Ig ist gleich und besteht, wie Abbildung 1.1 verdeutlicht, aus jeweils zwei identischen schweren (heavy chain) und leichten Polypeptidketten (light chain), die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (ROITT 1993). Die dreidimensionale Gestalt des Antikörpermoleküls ist Y-förmig, wobei die kurzen Arme (Fab-Teil) von je zwei variablen und zwei konstanten Domänen gebildet werden, während der Stiel (Fc-Teil) aus vier konstanten Domänen der beiden schweren Ketten besteht (JANEWAY 1993). In den Fab-Fragmenten (fragment antigen binding) ist die Spezifität des Antikörpers lokalisiert. Der Fc-Teil (fragment crystalline) besitzt für jede Ig-Klasse eine konstante Aminosäuresequenz (konstante Region) und ist für die Vermittlung von Effektorfunktionen zuständig.

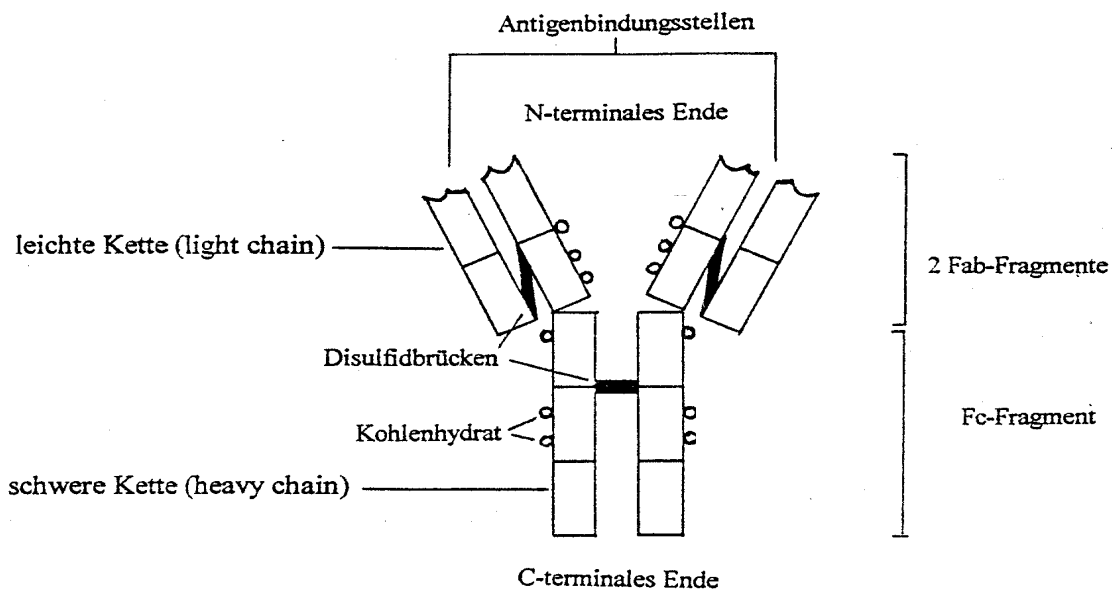


Abb. 1.1: Darstellung eines Antikörpers

Beim Menschen kommen fünf verschiedene Ig-Klassen vor, die sich in der Primärstruktur ihrer schweren Ketten unterscheiden. Es wird zwischen dem IgG, IgA, IgM, IgD sowie dem IgE differenziert. Dabei kommt das IgG, welches sich in vier weitere Subtypen unterteilen lässt, im menschlichen Serum am reichlichsten vor, während das IgE, welches an der allergischen Soforttyp-Reaktion beteiligt ist, normalerweise nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegt (ROITT 1993). Die Immunglobuline der Klasse E rufen die allergische Sofortreaktion hervor, weshalb atopische Erkrankungen sich durch erhöhte IgE-Gehalte im Blut der Patienten auszeichnen. Als ursprüngliche Funktion der IgE-Antikörper wird die Immunabwehr von parasitärem Wurmbefall diskutiert (JANEWAY & TRAVERS 1995).

Als **Antigene** werden Substanzen bezeichnet, die über die Aktivierung von B-Lymphozyten die Produktion spezifischer Antikörper oder über eine Aktivierung von T-Lymphozyten eine spezifische Immunantwort induzieren können. Die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper ist hochspezifisch und beruht auf starken, nichtkovalenten Wechselwirkungen. Als Antigene wirken hauptsächlich Proteine und Glykoproteine.

Allergene sind Antigene, die eine allergische Reaktion im Organismus auslösen. Niedermolekulare Verbindungen mit einem mittleren Molekulargewicht (MG) von 1 kDa wirken allein nicht allergen und können erst nach Konjugation an Proteine, sogenannte Carrier, eine Immunantwort hervorrufen. Solche kleinen Moleküle werden als Haptene bezeichnet (AULEPP & VIETHS 1992). Proteinmoleküle wirken in der Regel erst oberhalb einer molaren Masse von 4 kDa allergen. Hochpotente Allergene haben MG zwischen 10 und 70 kDa. Die untere Grenze wird von der Immunogenität des Moleküls bestimmt, während für die obere Grenze die Permeabilität der Schleimhautmembranen für die Makromoleküle als limitierender Faktor vermutet wird (TAYLOR 1992). Als Hauptallergene werden solche Allergene bezeichnet, gegen die mehr als 50 % eines getesteten Patientenkollektivs spezifische IgE-Antikörper aufweisen. Entsprechend bezeichnet man die übrigen Allergene als Minorallergene.

Die Stelle eines Moleküls, welche die Bindung mit einem spezifischen Antikörper eingeht, bezeichnet man als **Epitop** oder Determinante. Proteinmoleküle tragen mehrere Epitope, allerdings ist ihre Zahl relativ begrenzt. Es wird zwischen Sequenz- und Konformations-epitopen differenziert. Sequenzepitope sind ausschließlich durch ihre Primärstruktur (Aminosäuresequenz) definiert, während Konformationsepitope durch die räumliche Anordnung bestimmt und somit durch die diskontinuierlichen Abschnitte der Polypeptidkette gebildet werden. Die Reaktion eines Antikörpers mit strukturell verwandten Epitopen unterschiedlicher Moleküle wird als Kreuzreaktion bezeichnet (AULEPP & VIETHS 1992).

Allergien lassen sich anhand ihrer Pathomechanismen nach COOMBS & GELL (1963) in vier unterschiedliche **Reaktionstypen** einteilen. Bei dieser Klassifizierung handelt es sich lediglich um eine vereinfachte Darstellung, da sich die Mechanismen der Immunantwort sehr oft überschneiden.

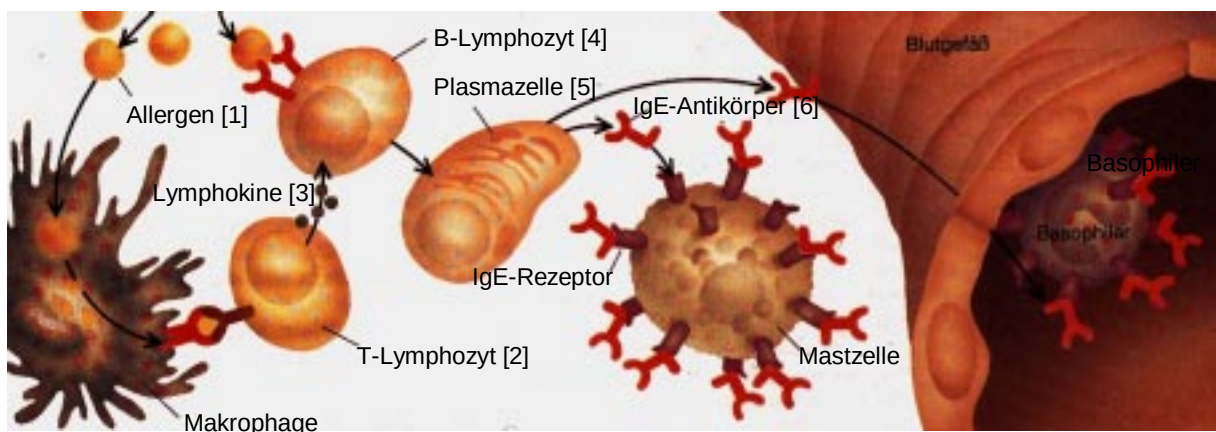


Abb. 1.2: Darstellung der Sensibilisierungsphase (LIECHTENSTEIN 1993)

Makrophagen nehmen ein Allergen auf [1] und präsentieren Fragmente davon an ihrer Oberfläche. Hieran binden spezifische T-Lymphozyten [2] und schütten Lymphokine aus [3]. Diese stimulieren B-Lymphozyten, die ebenfalls das Allergen gebunden haben [4], zur Umwandlung in eine Plasmazelle [5], welche ihrerseits Antikörper gegen das Allergen ausschütten [6]. Diese IgE-Antikörper heften sich an Rezeptoren von im Knochenmark hergestellten Mastzellen und basophilen Granulozyten.

Die **Soforttypreaktion (Typ I)** tritt bei LMA am häufigsten auf (WÜTHRICH 1993), weshalb sie an dieser Stelle eingehender beschrieben wird. Die Reaktion setzt sich aus mehreren Schritten zusammen. Zunächst erfolgt die Sensibilisierung, wozu bereits der einmalige Kontakt mit einem Allergen genügen kann. Abbildung 1.2 verdeutlicht schematisch die Abläufe bei der Sensibilisierung.

Makrophagen nehmen hierbei zunächst das Allergen auf [1] und präsentieren die entstehenden Fragmente T-Lymphozyten [2]. Daher spricht man in diesem Zusammenhang bei den Makrophagen auch von antigenpräsentierenden Zellen. Manche der durch einen Kontakt mit dem Antigen sensibilisierten T-Lymphozyten schütten sogenannte Lymphokine, wie etwa γ -Interferon oder Interleukin 4, aus [3]. Das Interleukin 4 regt eine Reifung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen an [4], welche ihrerseits IgE-Antikörper auszuschleiden vermögen [5]. Bei der Transformation der B-Lymphozyten in Plasmazellen arbeiten die T-Lymphozyten, bzw. verschiedene Unterklassen von ihnen, entweder als Helfer- oder Suppressorzellen (LIECHTENSTEIN 1993). Die Ursache der allergischen Reaktion ist offensichtlich auf eine gestörte Funktion der T-Helferzellen zurückzuführen, die durch die Bildung von Interleukin 4 eine erhöhte Antikörperproduktion verursachen. Hat die Produktion von IgE-Antikörpern erst einmal begonnen, so hält sie für Monate oder noch länger an. Die IgE-Antikörper heften sich an Rezeptoren zweier unterschiedlicher Klassen von Immunsystemzellen [6]: den im Knochenmark hergestellten Mastzellen, die sich im Körpergewebe ansiedeln und den basophilen Granulozyten, die ebenfalls aus dem Knochenmark stammen, jedoch zu weißen Blutkörperchen ausreifen und im Blutstrom zirkulieren. Die Mastzellen und die basophilen Granulozyten werden mit IgE-Antikörpern überhäuft, der Körper ist somit sensibilisiert.

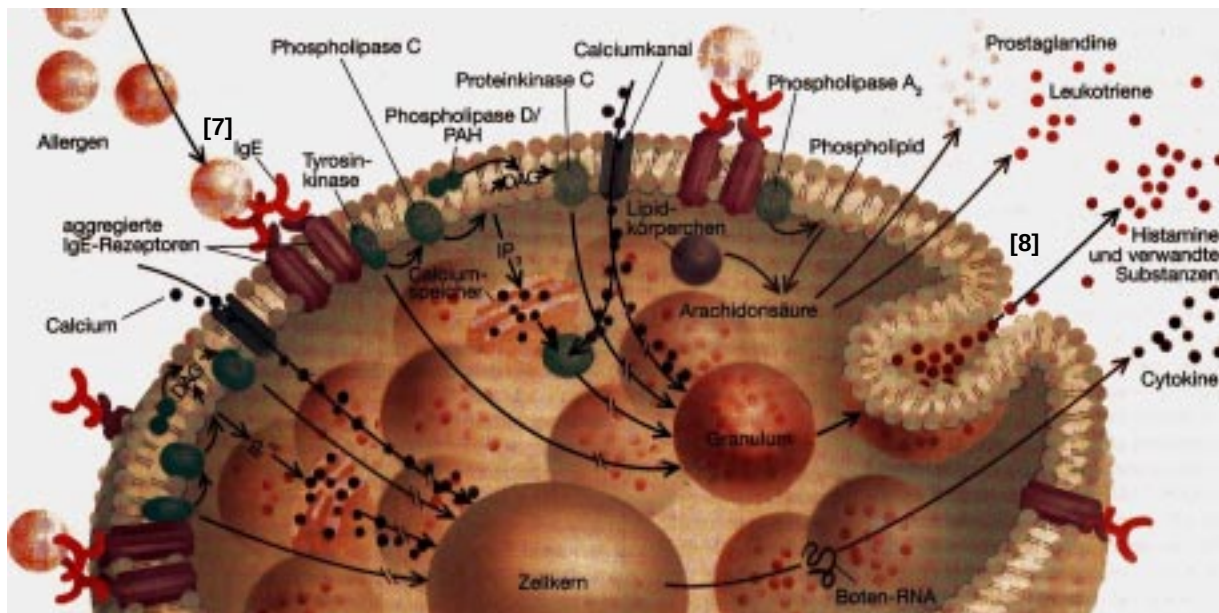


Abb. 1.3: Darstellung der Mediatorfreisetzung (LIECHTENSTEIN 1993)

Werden auf der Oberfläche der Mastzelle zwei IgE-Antikörper überbrückt [7], kommt es durch eine Folge verschiedener Reaktionen zur Degranulation der Mastzelle, wobei präformierte Mediatoren freigesetzt werden [8].

Bei einem späteren weiteren Kontakt des Körpers mit den entsprechenden Allergenen heften sich diese, wie aus Abbildung 1.3 deutlich wird, unmittelbar an die IgE-Antikörper auf den Mastzellen, wobei durch die Allergenepitope zwei benachbarte IgE-Moleküle überbrückt werden [7]. Eine dadurch ausgelöste Enzymaktivierung bewirkt eine Folge von Reaktionen, bei denen substanzgefüllte Granula dazu gebracht werden, mit der Zellmembran zu verschmelzen und ihren Inhalt nach außen zu entleeren [8]. Die dadurch freigesetzten Mediatoren verursachen die unterschiedlichen allergischen Symptome (BUISSERET 1988).

Mediatoren sind aktive Substanzen, die kurzfristig freigesetzt und in der Regel rasch inaktiviert werden. Die Wirkungsweisen der Mediatoren sind vielfältig. Histamin kann beispielsweise sowohl die Schleimbildung in den Epithelien anregen und so zur Verstopfung der Atemwege beitragen, als auch die Bronchien verengen. Prostaglandine und Leukotriene rufen eine Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege oder des Darms hervor und führen so zu typischen allergischen Symptomen. Leukotriene verengen die feinsten Verästelungen der Bronchien und wirken dann hundert bis tausendmal stärker als Histamin oder Prostaglandine (BUISSERET 1988).

Bei der **Zytotoxischen Reaktion (Typ II)** richten sich IgG- bzw. IgM-Antikörper gegen Antigene, die an körpereigene Zellen gebunden sind. Diese körpereigenen Zellen sind damit Ziel der Immunreaktion. Nach einer Antigen-Antikörperbindung kommt es zu einer zytotoxischen Aktion von Killerzellen oder zur komplementvermittelten Lyse. In diese Gruppe gehören beispielsweise die medikamentös induzierten hämolytischen Anämien.

Für die **Immunkomplexreaktion (Typ III)** sind zirkulierende oder gewebsständige Immunkomplexe, die präzipitierende Antikörper vom IgM- oder IgG-Typ enthalten, verantwortlich. Im Zuge der Immunkomplex-induzierten Komplementaktivierung werden hochwirksame Entzündungsmediatoren (insbesondere C3a und C5a) gebildet, die Freisetzungsreaktionen aus Mastzellen und Basophilen bewirken und Granulozyten anlocken. Bei der Phagozytose der Immunkomplexe durch Granulozyten werden lysosomale Enzyme sezerniert, die das Gewebe schädigen. Ein klinisches Beispiel für eine Typ-III-Reaktion ist die allergische Vaskulitis.

Die **Spättypreaktion (Typ IV)** wird von spezifisch sensibilisierten T-Lymphozyten bestimmt. Diese schütten Lymphokine aus, die für die Entzündungsreaktionen verantwortlich sind. Das klinische Bild entwickelt sich erst 24-48 Stunden nach Antigenexposition. Ein häufiges Beispiel für diesen Reaktionstyp stellt das allergische Kontaktekzem dar. Auch die Abstoßung von Transplantaten gehört in diese Gruppe.

1.3 Nachweis von Lebensmittelallergien

Bei der Diagnostik einer Lebensmittelallergie steht zunächst eine gründliche Anamnese im Vordergrund, bei welcher eine Beziehung zwischen der Nahrungsmittelaufnahme und den auftretenden Symptomen hergestellt werden muß. Der zweite Schritt der Diagnostik besteht in der Durchführung von Hauttests mit sowohl kommerziellen Lebensmittelextrakten als auch mit nativen Lebensmitteln. Pricktests haben die größte Bedeutung bei den Hauttests, während der Intradermaltest nur bei gezieltem Verdacht und bei negativem Pricktest angewendet wird. Scratchtests führen häufig zu unspezifischen Ergebnissen und sind daher nicht empfehlenswert (WÜTHRICH 1996). Da Atopiker in bis zu 65 % der Fälle im Hauttest eine falsch-

positive Reaktion auf die getesteten Lebensmittel zeigen, muß die Relevanz einer positiven Hauttestreaktion in einem weiteren Schritt mittels oraler Provokation erfolgen. Da der prädiktive Wert einer offenen Provokation sehr hoch ist, sind bei einem negativen Ergebnis keine weiteren Untersuchungen notwendig. Bei einer positiven offenen Provokation sind doppelblinde, placebokontrollierte Provokationen erforderlich.

Neben den beschriebenen In-vivo-Tests kommt auch verschiedenen In-vitro-Nachweismethoden wie dem Radioallergosorbent-Test (RAST) oder dem Enzymallergosorbent-Test (EAST), bei denen die spezifischen IgE-Antikörper bestimmt werden, eine wichtige Bedeutung zu. Obwohl die verschiedenen Hauttests sowie RAST bzw. EAST empfindliche Nachweismethoden für spezifisches IgE sind, induzieren sie nicht zwingend eine klinische Relevanz (SAMPSON UND HO 1997). Daher gilt der doppelblinde, placebokontrollierte Provokationstest als der einzig akzeptierte Nachweis zur eindeutigen Feststellung einer Lebensmittelallergie (BRUIJNZEEL-KOOMEN ET AL. 1995).

1.4 Pollenassoziierte Lebensmittelallergie

Das Phänomen der pollenassoziierten Lebensmittelallergie wird in zunehmendem Maße seit Mitte der siebziger Jahre beobachtet (VIETHS ET AL. 1993A). Sie ist bei Jugendlichen und Erwachsenen die häufigste Form der LMA. Nach ERIKSSON ET AL. (1982) sind allergische Reaktionen durch pflanzliche Lebensmittel zu etwa 80 % an die Disposition zu einer Pollenallergie gebunden. Am Anfang steht fast immer die Pollinosis, der später die Sensibilisierung gegen die Lebensmittel folgt. Die Kreuzreaktivität beruht auf dem Vorkommen gemeinsamer Epitope auf den unterschiedlichen Lebensmittel- und Pollenallergenen (CALKHOVEN ET AL. 1987, AULEPP & VIETHS 1992). Die von einer inhalativen Sensibilisierung gegen Pollen ausgehenden LMA betreffen nicht nur pflanzliche Lebensmittel, die aus einer botanischen Familie stammen. Häufig werden, wie diverse Beispiele zeigen, die taxonomischen Grenzen überschritten. Die pollenassoziierte LMA tritt überwiegend bei Patienten mit einer Sensibilisierung gegen Birken- bzw. Beifußpollen auf, während eine Sensibilisierung gegen Gräserpollen nur selten mit einer LMA assoziiert ist (ORTOLANI ET AL. 1993, BOCCAFOGLI ET AL. 1994, CABALLERO & MARTIN-ESTEBAN 1998).

Bei Beifußpollenallergikern tritt häufig eine Sensibilisierung gegen Sellerie, Karotten und Umbelliferen auf, weshalb man in diesem Zusammenhang auch vom Sellerie-Karotten-Beifuß-Gewürz-Syndrom spricht (WÜTHRICH & DIETSCHI 1985). In einer Untersuchungsreihe mit Sellerieallergikern wurde in 80 % der Fälle eine Beifußpollensensibilisierung und in 57 % der Fälle eine Karottenallergie nachgewiesen (DIETSCHI ET AL. 1987).

Die Birkenpollenallergie ist hauptsächlich mit einer Sensibilisierung gegen Apfel, Haselnuß, Kiwi, Birne, Kirsche, andere Steinfrüchte, aber auch Sellerie und Karotte assoziiert (HALMEPURO ET AL. 1984, CALKHOVEN ET AL. 1987, EBNER ET AL. 1995, CABALLERO & MARTIN-ESTEBAN 1998, MÖLLER ET AL. 1997). Es ist davon auszugehen, daß 50-93 % der Birkenpollenallergiker gegen Äpfel und Haselnüsse sensibilisiert sind (ERIKSSON ET AL. 1982).

Bisher werden im wesentlichen drei Strukturen für die Kreuzreaktion zwischen Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln verantwortlich gemacht. Die meisten Kreuzreaktionen treten zwischen niedermolekularen Pflanzenproteinen und dem Hauptallergen der Birkenpollen Bet v 1 auf. Beim Bet v 1 handelt es sich um ein Glycoprotein mit einem MG von 17 kDa. Als weiterer Auslöser von Kreuzreaktionen werden in neueren Arbeiten Profilinen beschrieben (VALENTA ET AL. 1992A, VAN REE ET AL. 1992, EBNER ET AL. 1995). Bei den Profilinen handelt

es sich um ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen vorkommende Proteine mit Molekulargewichten zwischen 12 und 16 kDa. Die pflanzlichen Profilinen weisen unabhängig von ihrer botanischen Herkunft hohe Sequenzhomologien von etwa 70 % auf (VALENTA 1992B). Es handelt sich bei Profilinen, wie eine Studie von VALENTA ET AL. (1991) zeigt, um Minorallergene. Lediglich 10 % eines Kollektivs von Birkenpollenallergikern waren gegen das Birkenpollenprofilin Bet v 2 sensibilisiert. Ähnliche Verhältnisse scheinen beim Apfel vorzuliegen (EBNER ET AL. 1991). Eine dritte kreuzreaktive Struktur im Bereich von 60 kDa wurde von HEISS ET AL (1996) identifiziert. Sie findet sich vor allem in Beifußpollen, aber auch in den Pollen der Birke und anderer Bäume, Gräser und Kräuter, sowie in Früchten und Gemüse.

1.5 Die Allergien gegen Haselnuß, Apfel und Karotte

Die **Haselnuß** ist in Europa als Lebensmittel weit verbreitet, weshalb ihr als Auslöser von LMA eine besondere Bedeutung zukommt. Über die Prävalenz von Haselnußallergien werden in diversen Studien verschiedene Angaben gemacht. Die Häufigkeit des Auftretens einer Haselnußallergie bei Patienten mit einer Sensibilisierung gegen Baumpollen wird mit 70-90 % angegeben (JANKIEWICZ ET AL. 1996, DE GROOT ET AL. 1996, BOEHNCKE ET AL. 1998). Laut einer Schweizer Studie sind von insgesamt 402 Erwachsenen mit einer gesicherten LMA 2.5 % gegen Haselnüsse sensibilisiert (WÜTHRICH ET AL. 1993), während nach einer französischen Studie 22 % von insgesamt 580 Patienten mit einer LMA im RAST positiv auf Haselnüsse reagieren (ANDRE ET AL. 1994). Bei Kindern tritt die Haselnußallergie seltener als bei Erwachsenen auf. Die Angaben variieren zwischen 1.4 % von 142 untersuchten Kindern mit einer LMA in einer französischen Studie (RANCE & DUTAU 1997) und 5.4 % von insgesamt 355 an einer LMA leidenden Kindern in einer spanischen Studie (CRESPO ET AL. 1995). Neben auftretenden gastrointestinalen Symptomen (VOCKS ET AL. 1993, ASERO 1997, DIEZ-GOMEZ ET AL. 1999) werden nach dem Haselnußverzehr in Einzelfällen sogar lebensbedrohliche anaphylaktische Schockzustände beschrieben (SAMPSON ET AL. 1992).

Die Typ I Allergie gegen Haselnüsse ist stark assoziiert an Pollenallergene von Bäumen der Ordnung Fagales, wie Birke, Hasel, Erle, Weißbuche und Eiche (HERKENRATH ET AL. 1982, HALMEPURO ET AL. 1984, CALKHOVEN ET AL. 1987, HIRSCHWEHR ET AL. 1992, CABALLERO & MARTIN-ESTEBAN 1998), in einer neueren Studie ist aber auch eine Assoziation zu Beifußpollen nachgewiesen worden (CABALLERO ET AL. 1997). Ferner treten Kreuzreaktionen der Haselnuß zu anderen Nüssen, Kiwi, Sesam- und Mohnsamen sowie Roggenmehl auf (ORTOLANI ET AL. 1988, SEIFERT ET AL. 1988, VOCKS ET AL. 1993, PUMPHREY ET AL. 1999).

Die für die Kreuzreaktivitäten verantwortlichen Allergene der Haselnuß wurden bisher nur in wenigen Studien beschrieben. HIRSCHWEHR ET AL. (1992) identifizierten ein Bet v 1 assoziiertes Protein mit einem MG von 18 kDa als Hauptallergen der Haselnuß. Des weiteren identifizierten sie Minorallergene von 14 kDa, 37 kDa, 46 kDa und 69 kDa. CABALLERO ET AL. (1997) beschreiben zwei Allergene bei 17 kDa und 42 kDa sowie zwei weitere mit MG kleiner 16 kDa. In einer weiteren Studie werden Allergene bei 7 kDa, 9 kDa, 38 kDa, 42 kDa und 50 kDa nachgewiesen (SCHOCKER ET AL. 1999).

Obwohl Haselnüsse als Bestandteile einer Vielzahl von Lebensmitteln, insbesondere von Süßwaren, weit verbreitet sind, gibt es bisher weder ausführliche Studien zum Einfluß der Verarbeitung auf die Allergenität noch zur Untersuchung der Hitzestabilität der einzelnen Allergene (VIETHS ET AL. 1997).

Auch die Allergie gegen **Äpfel** weist in Europa eine hohe Prävalenz auf. In verschiedenen Studien wird der Anteil an Apfelallergikern unter Pollenallergikern mit etwa 40-90 % angegeben (ERIKSON 1982, DREBORG & FOUCARD 1983, HSIEH ET AL. 1995, DE GROOT ET AL. 1996). Der Anteil auf Apfel sensibilisierter Individuen an Patienten mit gesicherter LMA wird in einer Schweizer Studie mit 26 % angegeben (ETESAMIFAR & WÜTHRICH 1998), während in einer französischen Studie mittels RAST ein Anteil an Apfelallergikern von 15 % ermittelt wurde (ANDRE ET AL. 1994). Die Symptome manifestieren sich meist am Gastrointestinaltrakt oder an der Haut, nur selten werden anaphylaktische Reaktionen beobachtet (MÖLLER ET AL. 1997, FERNANDEZ-RIVAS ET AL. 1997, FERNANDEZ-RIVAS & CUEVAS 1999, SANCHEZ-MONGE ET AL. 1999). Kreuzreaktionen werden meist zum Hauptallergen der Birkenpollen Bet v 1 sowie zum Birkenpollenprofilin Bet v 2 beschrieben (EBNER ET AL. 1991 UND 1995, FAHLBUSCH ET AL. 1995, ROSSI ET AL. 1996, FRITSCH ET AL. 1998), aber auch zu verschiedenen Früchten, wie Tomaten, Birnen, Pfirsichen, Kirschen oder Kiwis treten Kreuzreaktionen auf (PETERSEN ET AL. 1996, FERNANDEZ-RIVAS ET AL. 1997, MÖLLER ET AL. 1997, SCHEURER ET AL. 1999).

Als Hauptallergen des Apfels konnte das Protein Mal d 1 mit einem MG von 18 kDa identifiziert werden (EBNER ET AL. 1991, VIETHS ET AL. 1994A, VANEK-KREBITZ ET AL. 1995). Ferner werden das Mal d 2, ein Thaumatin-homologes 31 kDa-Protein (HSIEH ET AL. 1995), das Mal d 3 mit einem MG von 9 kDa (PASTORELLO ET AL. 1999, SANCHEZ-MONGE ET AL. 1999) sowie das Apfelprofilin bei 14-15 kDa beschrieben (VAN REE ET AL. 1992 UND 1995, EBNER ET AL. 1995). Weitere Allergene mit MG von 35 kDa, 50 kDa, 60 kDa und 67 kDa werden zusätzlich erwähnt (VIETHS ET AL. 1992C, HEISS ET AL. 1996, MÖLLER ET AL. 1997).

Eine Sortenabhängigkeit der allergenen Potenz des Apfels wurde erstmals von VIETHS ET AL. (1994A) beschrieben. Während die Sorten *Granny Smith* und *Golden Delicious* eine hohe Allergenität aufweisen, besitzen die Sorten *Gloster* und *Boskoop* ein geringes allergenes Potential, was mit der niedrigeren Konzentration an Mal d 1 in diesen Sorten zu erklären ist. Weitere Untersuchungen zur Sortenabhängigkeit des allergenen Potentials wurden von HSIEH ET AL. (1995) sowie SON ET AL. (1999) durchgeführt. An den Apfelsorten *Golden Delicious* und *Boskoop* wurde außerdem beispielhaft eine Zunahme der Allergenität im Verlauf des Reifeprozesses ermittelt (VIETHS ET AL. 1993A). Zur Stabilität der Apfelallergene existieren bislang einige Arbeiten. So wiesen beispielsweise DREBORG & FOUCARD (1983) anhand von klinischen Hauttests nach dem Erhitzen sowie nach Lagerung homogenisierter Äpfel eine Verminderung der Allergenität nach. JENSEN-JAROLIM ET AL. (1999) stellten beim modellhaften gastrischen Verdau bereits nach einigen Sekunden einen Abbau des Mal d 1 fest.

Obwohl bereits zahlreiche Untersuchungen bezüglich der Allergenität von Äpfeln durchgeführt wurden, fehlen noch immer systematische Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Prozeßparameter auf die Apfelallergene, die über den labortechnischen Maßstab hinausgehen.

Nach einer in der Schweiz durchgeführten Studie waren von 402 Erwachsenen mit gesicherter Lebensmittelallergie 13 % gegen **Karotte** sensibilisiert (WÜTHRICH ET AL. 1993), nach einer französischen Studie reagierten 16 % der untersuchten 580 erwachsenen Allergiker auf Karotte (ANDRE ET AL. 1994). Die Karottenallergie manifestiert sich überwiegend in Lokalreaktionen im Mund- und Rachenraum (PICHLER & STICH 1993), es werden aber auch respiratorische Symptome (QUIRCE ET AL. 1997) sowie anaphylaktische Reaktionen nach dem Verzehr von roher Karotte beschrieben (GOMEZ ET AL. 1996).

Eine Sensibilisierung gegen Karotten tritt selten isoliert auf und ist häufig mit Allergien gegen weitere Pflanzen aus der Familie der Apiaceae, wie Sellerie, Fenchel, Petersilie und andere Gewürze assoziiert. Außerdem bestehen Kreuzreaktionen zu Birken- und Beifußpollen (HELBLING ET AL. 1993, BAUER ET AL. 1996, LEITNER ET AL. 1998). JORDAN-WAGNER (1993) wiesen weitere Kreuzreaktionen zwischen Karotten und Sellerie sowie zwischen Karotten und den zur Familie der Cucurbitaceae gehörenden Gurken und Wassermelonen nach. Für diese Kreuzreaktion ist ein 15 kDa Allergen, welches in Extrakten aus allen vier Lebensmitteln nachgewiesen wurde, verantwortlich.

Das Hauptallergen der Karotte, Dau c 1 mit einem MG von 16 kDa wurde bereits von HOFFMANN-SOMMERGRUBER ET AL. (1999) identifiziert und sequenziert. Weiterhin wurden IgE-bindende Proteine mit MG zwischen 14 und 60 kDa beschrieben. HELBLING ET AL. (1994) detektierten im Immunoblot von Extrakten aus rohen Karotten sieben IgE bindende Proteine mit MG von 17 kDa, 25 kDa, 32 kDa, 36 kDa, 41 kDa, 45 kDa und 61 kDa, während QUIRCE ET AL. (1997) Banden bei MG von 23 kDa, 31 kDa, 42 kDa, sowie zwei weitere schwache Banden zwischen 66 und 87 kDa nachwiesen.

Der Einfluß technologischer Prozesse auf das allergene Potential der Karotte wird in der Literatur kaum beschrieben, es wird jedoch eine Hitzeelabilität vermutet. HELBLING ET AL. (1993) detektierten mittels Immunoblot in gekochten Karotten sowie in deren Kochwasser von ursprünglich sieben Banden im Extrakt von rohen Karotten nur noch eine einzelne Bande bei 17 kDa. Nach WÜTHRICH ET AL. (1990) reduzierte sich die Anzahl positiver Pricktests gegen gekochte Karotten bei 70 Patienten mit Sellerie-Sensibilisierung um etwa die Hälfte verglichen mit der Häufigkeit bei rohen Karotten.

2 MATERIAL

2.1 Patientenserum

Die in dieser Arbeit verwendeten Blutserum stammen von Patienten mit einer Typ I-Allergie bzw. einer Sensibilisierung gegen Haselnuß, Apfel oder Karotte. Die Allergiker wurden in Zusammenarbeit mit der Hautklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf einbestellt. Es wurden die anamnestischen Befunde dokumentiert und den Patienten Blutproben entnommen, aus denen anschließend die Seren gewonnen wurden (vgl. 7.1). Zusätzlich wurde das Serum Mast 127 von der Firma Mast Diagnostica, Reinfeld kommerziell bezogen. Mit allen verwendeten Seren wurde ein EAST durchgeführt (vgl. 7.4.2). Alle verwendeten Seren wiesen EAST-Klassen > 2 auf Haselnuß, Apfel bzw. Karotte auf (Einteilung der EAST-Klassen vgl. 7.4.2). Es wurden zusätzlich aus gleichen Volumenteilen verschiedener Einzelseren Poolseren hergestellt. Diese Poolseren repräsentieren ein breites Patientenkollektiv und dienen zur Ergänzung der mit Einzelseren erhaltenen Ergebnisse. Eine Charakterisierung aller verwendeter Patientenserum sowie die Zusammensetzung der jeweiligen Poolseren ist im Anhang unter 7.11 dargestellt. Das Serum eines nicht atopischen Individuums ohne Anamnese einer Lebensmittelunverträglichkeit (EAST-Klasse 0) dient bei allen Untersuchungen als Negativkontrolle.

2.2 Die Haselnuß (*Corylus avellana* L.)

Der in Europa bis nach Kleinasien weit verbreitete Haselnußstrauch gehört botanisch zur Familie der Birkengewächse (Betulaceae). Die wichtigsten Kultursorten stammen von *Corylus avellana* L. und *Corylus Maxima* MILL. ab. Die auf *Corylus avellana* L. zurückgehenden eher rundlichen Nüsse werden als Zellernüsse bezeichnet, während die eher länglich-walzenförmigen von *Corylus Maxima* MILL abstammenden Nüsse als Lambertsnüsse bekannt sind. Die Hauptanbaugebiete der Haselnuß liegen in der Türkei, den Kaukasischen Republiken, Italien, Frankreich und den USA. Während die USA, Frankreich und Italien die Hauptlieferanten für Nüsse mit Schale sind, werden die Haselnußkerne hauptsächlich aus der Türkei, den Kaukasischen Republiken und Italien geliefert. Die Haselnüsse wachsen an bis zu 5 m hohen Sträuchern und werden im September und Oktober geerntet.

Der größte Teil der Haselnußproduktion geht zur Verwertung in die Süß- und Backwarenindustrie, wo sie unter anderem zu Dauerbackwaren, Haselnußmus, Haselnußmark, Nougat, Schokoladen aber auch zu Nußbutter und Nußöl verarbeitet werden. Nur etwa 20 % der Haselnußernte wird unverarbeitet verwertet.

Als Referenzmaterial sowie für die Untersuchungen des Einflusses verschiedener technologischer und enzymatischer Prozesse dient die aus Kalifornien stammende Sorte *Barcelona*. Diese Haselnüsse werden in der Schale importiert und vertrieben. Als eine weitere Sorte wird die ebenfalls mit Schale gelieferte heimische *Contorta* untersucht. Ferner werden drei weitere nur als Kerne vertriebene Haselnußsorten untersucht: Die aus der Türkei stammenden geschmacklich hochwertigen Nußkerne der Sorte *Levantiner*, die aus Sizilien stammenden Kerne der Sorte *Neapler* sowie die in Livorno und der Gegend um Viterba (Italien) angebauten *Runden Römer*.

2.2.1 Haselnuß-Handelsprodukte

Der untersuchte Haselnuß-Warenkorb setzt sich aus einer breiten Auswahl verschiedener handelsüblicher Produkte, wie beispielsweise Schokoladen, Nuß-Nougat-Cremes, Nougat-Massen, Krokant Backwaren, Keksen, und weiteren Süßwaren zusammen. Die ausgewählten Lebensmittel sind im Anhang unter 7.12.1 dokumentiert.

2.3 Der Apfel (*Malus domestica* Borkh.)

Der Apfel stellt im gemäßigten Klimabereich das bedeutendste Fruchtoobst dar. Es handelt sich dabei um die Sammelbalgfrucht des zur Familie der Rosaceae gehörenden Apfelbaums. Der Kulturapfel als Resultat der Domestikation und Kreuzung aus zahlreichen Malusarten der gemäßigten und subtropischen Breiten besteht aus etwa 20000 Sorten, wobei ständig Neuzüchtungen hinzukommen. Etwa 30 Sorten haben eine größere Marktbedeutung, wobei in Deutschland insbesondere *Jonagold*, *Elstar*, *Golden Delicious*, *Gala*, *Granny Smith*, *Breaburn*, *Cox Orange* und *Gloster* verzehrt werden. Etwa 600000 t Äpfel werden jährlich zum Beispiel aus Chile, Argentinien, Südafrika, Australien und Neuseeland nach Deutschland importiert. Die eigene deutsche Ernte beläuft sich auf 600000 bis 700000 t pro Jahr. Hauptexportländer sind Italien, Frankreich, Österreich und die Niederlande.

Äpfel werden hauptsächlich frisch verzehrt, spielen aber auch in verarbeiteter Form eine bedeutende Rolle. Sie kommen beispielsweise als Mus, Gelee, Saft, Most oder Wein, aber auch in Fruchtzubereitungen, Babynahrung oder als Trockenprodukt vor. In Deutschland werden Äpfel primär zu klarem und keltertrübem Apfelsaft verarbeitet. Sie stellen die mit Abstand wichtigste gekelterte Rohware dar.

2.3.1 Fluide Apfelprodukte

Im Institut für Lebensmitteltechnologie der Universität Hohenheim (UH) werden mittels verschiedener Basistechnologien ein Apfelpüree und fünf verschiedene Apfelsäfte hergestellt. Abbildung 2.1 zeigt dazu ein Produktionsschema. Die Herstellungsverfahren ähneln dabei den in der Industrie angewandten Standardverfahren und unterscheiden sich in der Art der Entsaftung (Preß- oder Dekanterverfahren) sowie bei den Preßsäften durch die Verwendung verschiedener Pressen voneinander. Am Beispiel der Dekantersäfte wird zusätzlich der Einfluß verschiedener Vermahlungsgrade der Maische untersucht. Außerdem wird die Maische unterschiedlichen Standzeiten mit und ohne Zusatz von Ascorbinsäure ausgesetzt. Alle hergestellten Endprodukte werden mittels Kurzzeiterhitzung (KZE) pasteurisiert. Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zwischenstufen sind in Kapitel 7.12.2 näher dargestellt. Das allergene Potential einzelner Produktionsschritte wird in Form einer Stufenkontrolle untersucht. Die Herstellung der unterschiedlichen Apfelprodukte an der UH erfolgt ausschließlich mit Äpfeln der Sorte *Golden Delicious*, die der Versuchsstation für Nutztierbiologie und ökologischen Landbau der Universität Hohenheim entstammen. Die Sorte *Golden Delicious* wurde für die Untersuchungen aufgrund ihres nachgewiesenen hohen allergenen Potentials (VIETHS ET AL. 1994B) ausgewählt.

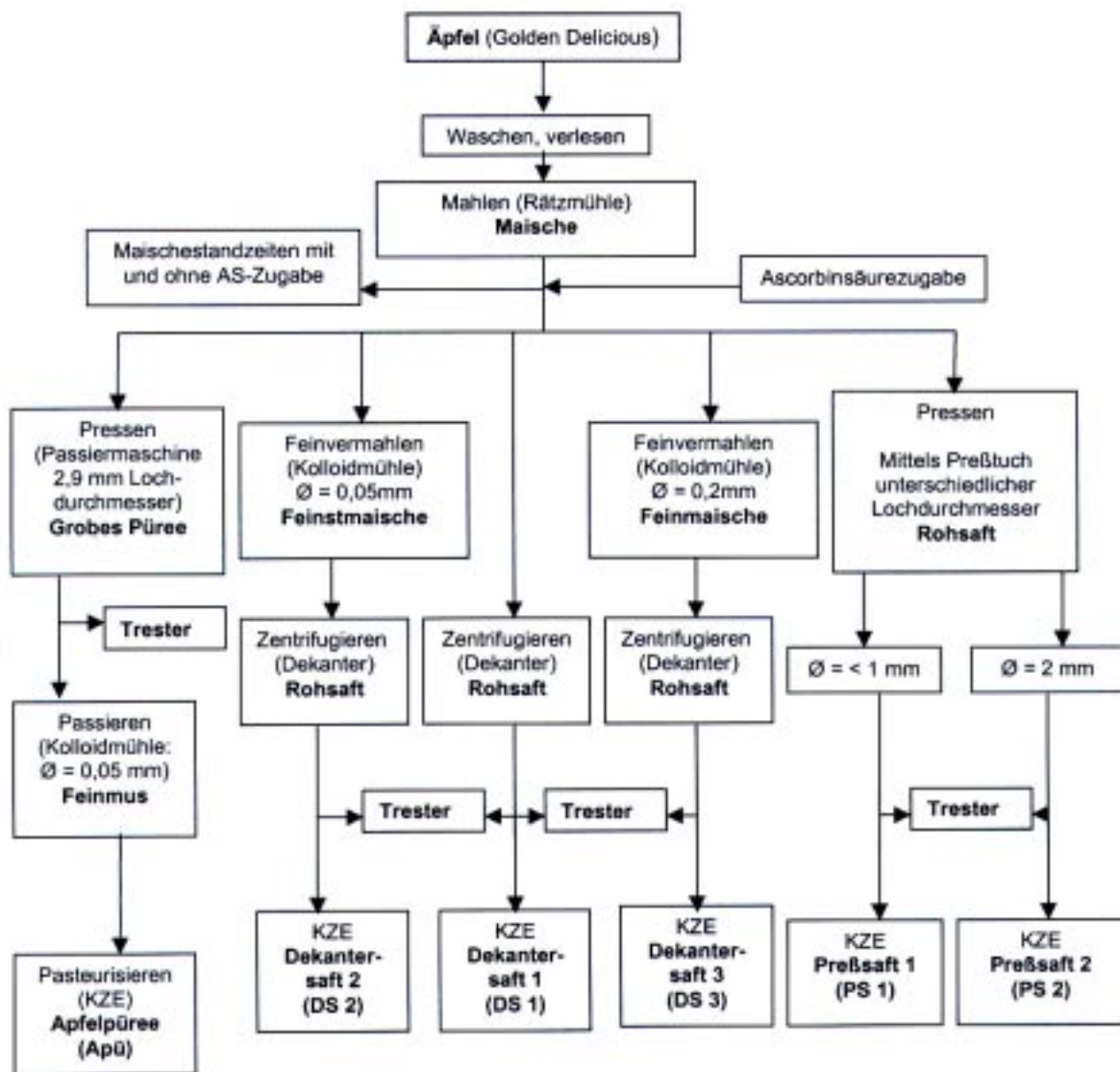


Abb. 2.1: Übersichtsschema der Produktion fluiden Apfelerzeugnisse

2.3.2 Apfel-Handelsprodukte

Der untersuchte Apfel-Warenkorb setzt sich aus zwölf verschiedenen Produkten, wie beispielsweise Säften, Babybrei, Mus, Fruchtaufstrich oder getrockneten Apfelprodukten zusammen. Die ausgewählten Lebensmittel sind ebenfalls in Kapitel 7.12.2 aufgeführt.

2.4 Die Karotte (*Daucus carota* L.)

Die auch als Möhre oder Mohrrübe bekannte Karotte gehört zur botanischen Familie der Doldenblütler (Umbelliferae). Als Wildform wächst sie in Asien und Südeuropa, wobei ein exakter Ursprungsort nicht bekannt ist. Die Karotte wird seit etwa 1000 Jahren als Kulturpflanze gehalten und weltweit in gemäßigten und subtropischen Gebieten angebaut. Die Hauptanbaugebiete befinden sich in Europa, Syrien, Afghanistan, Indien, China, Nordamerika, Sibirien und Nordafrika. Der Import nach Deutschland erfolgt hauptsächlich aus Italien, den Nie-

derlanden und Frankreich. Die Karotte zählt zu den weltwirtschaftlich bedeutenden Gemüsearten, von der jährlich bis zu 14 Millionen Tonnen geerntet werden. Durch Züchtung sind zahlreiche Formen entstanden, die von ca. 20 cm langen, spitzen, über mittellange, walzliche bis zu kurzen, runden Rüben variieren. Neben der Form unterscheiden sich die Karottensorten auch bezüglich Farbe und Erntezeit. Im allgemeinen setzt sich die Jahresernte aus etwa 25 % kleinen bis mittelgroßen frühen und 75 % großen späten Karottensorten zusammen. Karotten werden roh und gekocht als Gemüse verzehrt, haben aber auch als Babynahrung oder als Gemüsesäfte eine wesentliche Bedeutung.

2.4.1 Fluide Karottenprodukte

Im Institut für Lebensmitteltechnologie der UH werden analog zum Apfel mittels verschiedener Basistechnologien verschiedene Karottensäfte hergestellt. Zu diesem Zweck werden industrielle Standardverfahren im Technikumsmaßstab unter Herstellung sortenreiner Produkte nachgestellt. Es werden ausschließlich erntefrische Karotten der Sorte *Karotan* verarbeitet, die dem eigenen Versuchsanbau der UH entstammen. Eine geschmackliche Abrundung der Säfte durch die in den Leitsätzen für Gemüsesaft und Gemüseektar vom 28./29. Oktober 1981 angegebenen Zutaten, wie z.B. Speisesalz oder Honig, erfolgt nicht.

Abbildung 2.2 zeigt ein Produktionsschema der Karottensaftherstellung. Zur Entsaftung wird ausschließlich die in der Karottensaftproduktion inzwischen verbreitete Dekantertechnologie eingesetzt (PECORONI & GÜNNIEWIG, 1997), bei der die Mischung von separat produziertem Saft und Püree zur Einstellung des Gemüsemark- bzw. Trubanteils im Gegensatz zu Preßverfahren nicht notwendig ist. Die Dekantertechnologie erlaubt somit eine schnellere und dadurch hygienischere Produktion. Als Basistechnologien bei der Karottensaftherstellung dienen hauptsächlich unterschiedliche Erhitzungsverfahren, wie das Blanchieren sowie die thermische Konservierung durch Hitzesterilisation oder Pasteurisation. Des weiteren werden chemische Faktoren, wie die Säuerung durch Citronensäurezusatz und mechanische Effekte, wie das Messerschälverfahren, berücksichtigt. Außerdem erfolgt die Untersuchung eines intensivierten Zellaufschlusses durch Maischeenzymierung unter Verwendung der Enzyme Pektinlyase (PL) und Pektatlyase (PAL). Die Enzyme werden unmittelbar im Anschluß an die Enzymierung thermisch inaktiviert. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zwischenstufen der Karottensaftproduktion sind ebenfalls in Kapitel 7.12.3 näher dargestellt.

Das allergene Potential einzelner Produktionsschritte wird auch hier in Form einer Stufenkontrolle untersucht. Um Polyphenol-Protein-Reaktionen, die zu einer chemischen Reduktion des allergenen Potentials während der Verarbeitung führen können, auf das technologisch notwendige Maß zu beschränken, wurden alle Musterproduktionen unter Zusatz von Ascorbinsäure und ohne Standzeiten durchgeführt.

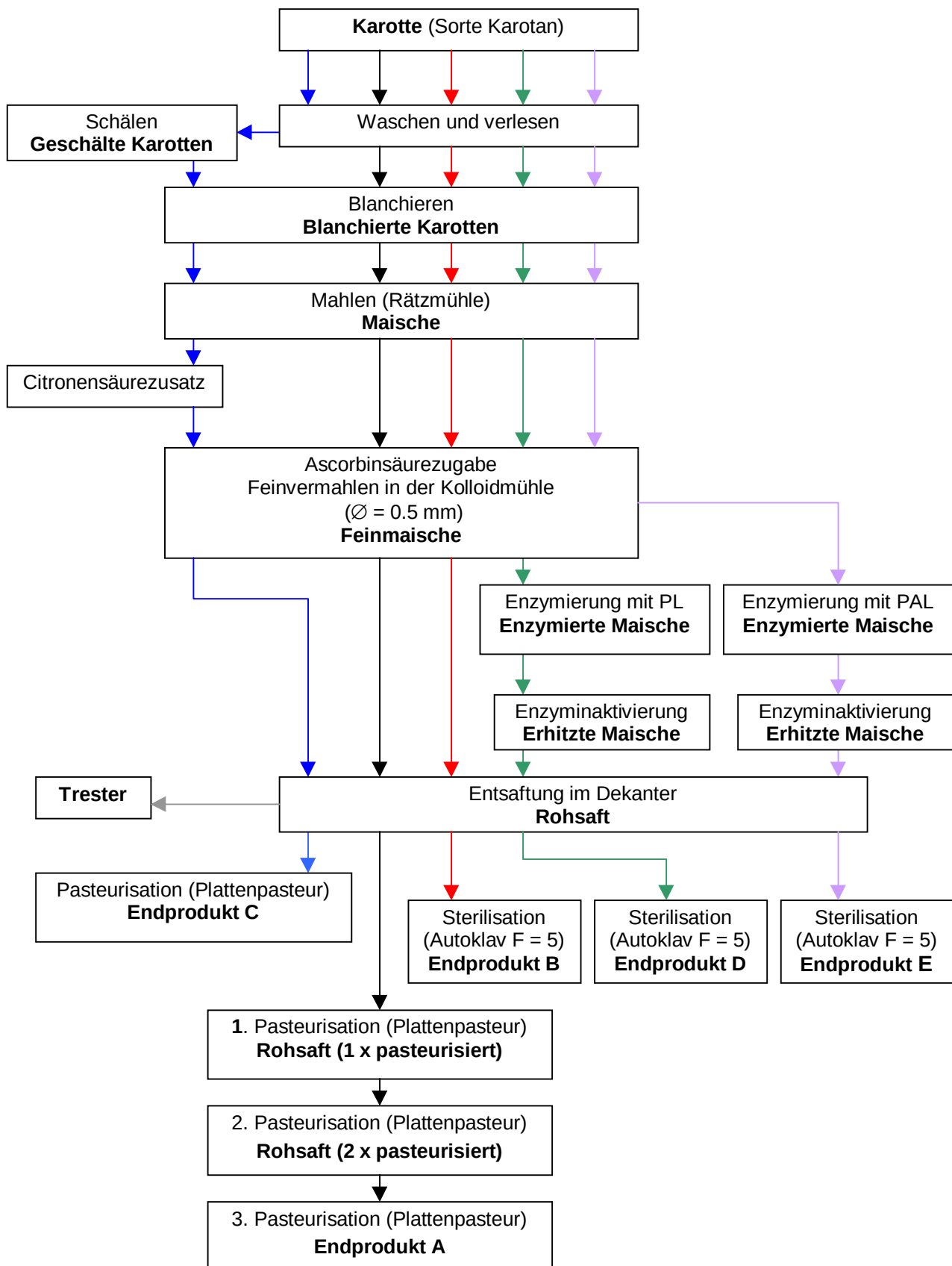


Abb. 2.2: Übersichtsschema der Produktion fluiden Karottenerzeugnisse

2.4.2 Karotten-Handelsprodukte

Der untersuchte Karotten-Warenkorb setzt sich aus verschiedenen Produkten, wie beispielsweise Säften, Konserven, Babynahrung oder getrockneten Karottenprodukten zusammen. Die ausgewählten Lebensmittel sind im Anhang unter 7.12.3 dargestellt.

2.5 Enzyme

Pepsin [EC 3.4.23.1] ist das wichtigste Protein verdauende Enzym des Magens. Es gehört zur Gruppe der Endopeptidasen und wird aus der inaktiven Vorstufe Pepsinogen im sauren Milieu gebildet. Der dabei entstehende Pepsin-Inhibitor-Komplex zerfällt unterhalb von pH 5.4 in aktives Pepsin (MG: 34.5 kDa) und den Inhibitor (MG: 3.1 kDa). Die Spezifität von Pepsin ist relativ breit. Bevorzugt gespalten werden Peptidbindungen am Carboxylende von Phenylalanin, Methionin, Leucin oder Tryptophan, an deren Aminoende eine hydrophobe Aminosäure benachbart ist. Das pH-Optimum von Pepsin liegt bei 1.8-4.0.

Beim **Trypsin** [EC 3.4.21.4] handelt es sich um eine Endopeptidase aus dem Sekret des Pankreas. Das aktive Trypsin (MG: 23.3 kDa) wird in Gegenwart von Calcium durch Enterokinase oder durch Autokatalyse aus der Vorstufe Trypsinogen durch Abspaltung eines Hexapeptids gebildet. Trypsin spaltet Peptidbindungen spezifisch am Carboxylende der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Bindungen mit Prolin am Carboxylende spielen ebenso eine untergeordnete Rolle wie Spaltungen an aromatischen Aminosäuren. Das pH-Optimum liegt bei 7.5-8.5.

Elastase [EC 3.4.21.36] mit einem MG von 25.7 kDa spaltet relativ unspezifisch an der Carboxylseite von Aminosäuren mit ungeladenen, nicht-aromatischen Seitenketten, wie Alanin, Valin, Leucin, Glycin oder Serin. Elastase wird häufig zum Abbau von Elastin und Zellgewebe sowie zur Solubilisierung von Membranproteinen eingesetzt. Das pH-Optimum liegt bei 8.8.

Pankreatin stellt eine Mischung der im Pankreas-Sekret enthaltenen Verdauungsenzyme dar. Hierzu zählen Chymotrypsin, Trypsin, Elastase, Amylasen sowie Lipasen. Das pH-Optimum liegt bei 7.0-8.0.

Proteinase K [EC 3.4.21.14] ist eine Serin-Endopeptidase aus dem Pilz *Tritirachium album*, die Peptidbindungen vorwiegend am Carboxylende von hydrophoben, N-substituierten Aminosäuren spaltet. Häufig wird Proteinase K zum Totalabbau von Proteinen eingesetzt. Ihr pH-Optimum liegt bei 7.5-10.5.

Pektinlyase [EC 4.2.2.10] ist eine Poly[methoxy-galacturonid]-Lyase mit einem MG von 30 kDa. Sie spaltet Pektin eliminativ nach einem Endomechanismus und hat ein pH-Optimum von 7.0.

Pektatlyase [EC 4.2.2.2] ist eine Poly-[1,4- α -D-Galacturonid]-Lyase, die Pektat nicht-hydrolytisch nach einem Endomechanismus spaltet. Sie besitzt ein MG von 30-45 kDa und ein pH-Optimum von 7.0.

3 METHODEN

3.1 Herstellung der Proteinextrakte

Voraussetzung für die Untersuchung der Allergenität pflanzlicher Lebensmittel ist eine möglichst vollständige Isolierung der globulären Proteine und Glycoproteine im nativen Zustand. Dies wird durch den häufig verhältnismäßig geringen Proteingehalt und den hohen Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen im Obst bzw. Gemüse erschwert. Bei der industriell häufig eingesetzten Extraktion des zerkleinerten Gewebes mit wäßrigen Pufferlösungen bei 4 °C kommt es zu einer Zerstörung der Zellkompartimente, wodurch Phenole freigesetzt werden, die durch enzymatische Bräunungsreaktionen zu Melaninen umgesetzt werden. Diese Reaktion führt zu einem Allergenitätsverlust des Extraktes (VIETHS ET AL. 1992A, VIELUF ET AL. 1997).

Bei der von CLEMENTS (1965) entwickelten und von VIETHS ET AL. (1992A) modifizierten Tieftemperaturextraktion wird das pflanzliche Gewebe mit Aceton bei –40 °C homogenisiert, filtriert und der gewaschene Rückstand lyophilisiert. Durch diese Vorbehandlung werden die in Aceton löslichen phenolischen Inhaltsstoffe abgetrennt. Des weiteren wird durch die tiefe Temperatur die Enzymaktivität der Polyphenoloxidasen unterdrückt. Aus dem Lyophilisat (Acetonpulver) werden die Proteine mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) extrahiert. Die Tieftemperaturextraktion wird bei allen festen und halbfesten Apfel- und Karottenprodukten bzw. Zwischenstufen der Saftgewinnung angewendet. Bei den fluiden Apfel- und Karottenprodukten ist eine solche Prozedur nicht möglich, weshalb in diesen Fällen auf eine vereinfachte Variante zurückgegriffen wird. Die flüssigen Produkte werden zunächst gefriergetrocknet, und anschließend erfolgt die Extraktion der Proteine mit PBS aus dem Lyophilisat.

Die Extraktion der Proteine aus der Haselnuß bzw. aus deren Produkten erfolgt ebenfalls durch eine vereinfachte Prozedur bei Raumtemperatur. Eine solche Normaltemperaturextraktion führt im Fall der Haselnuß zu keiner Verringerung des allergenen Potentials. (Durchführung siehe Anhang 7.2)

3.2 Proteinbestimmung

Die Quantifizierung des Proteingehaltes der Allergenextrakte erfolgt nach der photometrischen Methode von BRADFORD (1976). Als Farbreagenz wird Coomassie-Brilliant-Blau G 250 verwendet. Die Farbreaktion beruht auf der Anlagerung der negativ geladenen Farbstoffmoleküle an die Aminogruppen der Proteine und führt zu einem blauen Protein-Farbstoff-Komplex, der bei 590 nm photometrisch vermessen werden kann. Die Messung kann ohne weitere Aufarbeitung aus den Allergenextrakten durchgeführt werden. Die quantitative Bestimmung erfolgt unter Verwendung einer Kalibriergeraden mit Rinder-Serum-Albumin als Referenzprotein. (Durchführung siehe Anhang 7.3)

3.3 Enzymallergosorbent-Test (EAST)

Der EAST ist eine enzymimmunologische Methode zur Messung des freien, spezifischen IgE im Blutserum und stellt eine Variante des RAST dar. Er zählt zu den wichtigsten in vitro-Untersuchungen bei der Diagnose einer Lebensmittelallergie. Das Prinzip des EAST geht aus Abbildung 3.1 hervor. Zunächst erfolgt eine kovalente Bindung der entsprechenden Allergene an nach der Methode von CESKA & LUNDKVIST (1972) hergestellte bromcyanaktivierte Cellulosescheiben. Diese werden mit Patientenserum inkubiert, wobei spezifische IgE-Antikörper an die festphasengebundenen Allergene binden. Das spezifische IgE wird anschließend mit einem mit alkalischer Phosphatase (AP) gelabelten anti-IgE versetzt. Nach einer enzymatischen Farbreaktion erfolgt eine photometrische Detektion.

Die Auswertung des EAST über Referenzseren mit bekanntem IgE-Gehalt gegen Lieschgras ermöglicht die Einteilung der Patientenserum anhand ihres IgE-Gehaltes in die EAST-Klassen 0 bis 4. Die vier Referenzseren bilden dabei die unteren Klassengrenzen und weisen IgE-Gehalte von 0.35 U/mL (EAST-Klasse 1), 0.7 U/mL (EAST-Klasse 2), 3.5 U/mL (EAST-Klasse 3) und 17.5 U/mL (EAST-Klasse 4) auf. Die Einheit 1 U entspricht dabei 2.4 ng IgE. (Durchführung siehe Anhang 7.4)

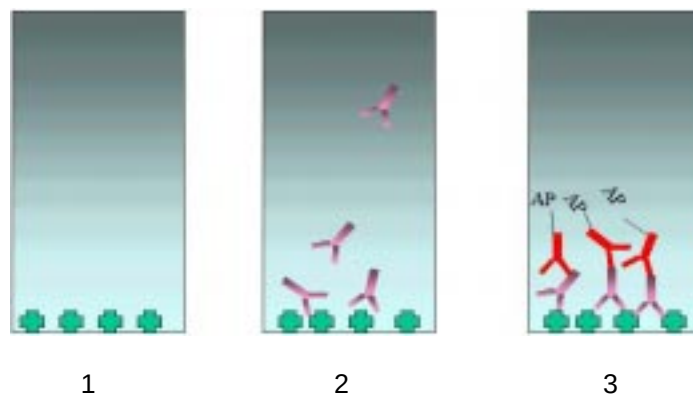


Abb. 3.1: Prinzip des EAST

Eine Cellulosescheibe mit gebundenem Allergen (1) wird mit Patientenserum inkubiert, wobei spezifische IgE-Antikörper an die festphasengebundenen Allergene binden (2). Anschließend wird das spezifische IgE mit alkalischer Phosphatase (AP) gelabeltem anti-IgE versetzt (3). Die AP wird in einer enzymatischen Farbreaktion mit p-Nitrophenylphosphat zum gelbgefärbten p-Nitrophenolat umgesetzt und anschließend photometrisch detektiert.

3.4 EAST-Inhibition

Bei der EAST-Inhibition handelt es sich um einen kompetitiven Hemmtest, bei dem ein Patientenserum mit bekanntem Gehalt an spez. IgE vor der EAST-Bestimmung (vgl. 3.3) mit einer Inhibitorlösung versetzt wird. Als Inhibitorlösungen werden beispielsweise die Proteinextrakte der untersuchten Warenkorbbprodukte bzw. Produktionszwischenstufen eingesetzt. Die festphasengebundenen Allergene konkurrieren mit den in den Inhibitorlösungen vorliegenden Allergenen um das spez. IgE aus dem Patientenserum. Je größer das IgE Bindungsvermögen der inhibierenden Extrakte ist, desto stärker nimmt das Meßsignal ab, wodurch ei-

ne relative Quantifizierung des allergenen Potentials möglich ist. Als Serum wird üblicherweise ein aus unterschiedlichen Patientenseren zusammengestelltes Poolserum verwendet. In den Untersuchungen werden jeweils Verdünnungsreihen der Inhibitorextrakte eingesetzt, um die Proteinkonzentrationen, die zu einer 50 %igen Verminderung des Meßsignals führen (C_{50} -Wert), bestimmen zu können. Über die C_{50} -Werte kann die allergene Potenz verschiedener Extrakte miteinander verglichen werden. Generell gilt, daß die allergene Aktivität eines Extraktes umso höher ist, je niedriger sein C_{50} -Wert liegt. Bei der Bestimmung wird zusätzlich als Vergleichstest eine homologe Inhibition mit dem nativen Proteinextrakt als Inhibitor durchgeführt, wodurch es zu einer starken Reduzierung der IgE-Bindung kommt (MÖLLER ET AL. 1997). Ein Vergleich der C_{50} -Werte des nativen Extraktes bei der homologen Inhibition mit denen der Inhibitorextrakte aus unterschiedlichen Verarbeitungsstufen ermöglicht die relative Quantifizierung untereinander. Die Auswertung erfolgt graphisch anhand von Inhibitionskurven, die sich aus der Abhängigkeit der prozentualen Inhibition von der logarithmisch aufgetragenen Proteinkonzentration des Inhibitorextraktes ergeben. Die maximale bei einer bestimmten Proteinkonzentration erreichte Inhibition ist ein zusätzliches Kriterium für das allergene Potential eines Inhibitorextraktes. (Durchführung siehe Anhang 7.5)

3.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

In der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine ausschließlich nach ihrem MG getrennt. Hierzu werden die Proteine mit dem anionischen Detergenz SDS beladen und die Disulfidbrücken reduktiv mit 2-Mercaptoethanol gespalten. Das resultierende Ladungs-/Masse-Verhältnis der SDS-Protein-Micellen ist für alle Proteine, mit Ausnahme von Glycoproteinen, gleich. Die Trennung erfolgt in sogenannten restriktiven Gelen, die aufgrund ihrer engen Poren die Wanderung großer Micellen stärker behindern als die kleineren Micellen, weshalb die resultierende Wanderungsgeschwindigkeit proportional zum MG der Proteine ist. Ausgewertet wird mit Hilfe von Markerproteinen. Als Trennmedium fungiert ein Polyacrylamidgel, welches sich durch seine hohe chemische und mechanische Stabilität auszeichnet. Hergestellt wird es durch eine chemische Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit N,N'-Methylenbisacrylamid als Vernetzer.

3.5.1 SDS-PAGE von Proteinen (14-94 kDa)

Zur Trennung der Proteine im MG-Bereich von 14-94 kDa wird das NuPAGE-System der Firma Novex (San Diego, CA, USA) verwendet, welches sich durch gute Reproduzierbarkeit und hohe Bandenschärfe bei geringer Trennzeit auszeichnet. Das System basiert auf einem Bis-Tris-HCl gepufferten Polyacrylamidgel mit einer Totalacrylamidkonzentration von 10%. (Durchführung siehe Anhang 7.6)

3.5.2 SDS-PAGE von Proteinen und Peptiden (2.5-94 kDa)

Zur Trennung der Proteine und Proteinfragmente nach enzymatischer Behandlung werden Tricin gepufferte Gele der Firma Novex mit einer Totalacrylamidkonzentration von 16 % verwendet. Tricin-Gele ermöglichen die Trennung von Proteinen und Peptiden mit einem MG bis zu 2.5 kDa. (Durchführung siehe Anhang 7.6)

3.6 Semidry-Blotting

Das Übertragen von elektrophoretisch getrennten Proteinen aus dem Trärgel auf eine immobilisierende Membran erfolgt mittels Semidry-Blotting nach KHYSE-ANDERSEN (1984) mit zwei horizontalen Graphitelektroden, zwischen denen mit Puffer getränkte Elektrodentücher, eine Blotmembran aus Nitrocellulose (NC) und das Gel angeordnet werden. Die ohne Denaturierung fest auf dieser Membran haftenden Proteine können nicht diffundieren oder eluiert werden und sind, anders als im Gel, frei zugänglich für spezifische Ligandenbindungen mit Makromolekülen, wie z.B. Antigenen oder Antikörpern. Der Bindungsmechanismus der Makromoleküle mit der NC ist vermutlich durch hydrophobe Effekte zu erklären (HANDMAN & JARVIS 1985). Ein Grund für diese Vermutung ist, daß bei einem pH-Wert von 8, bei welchem ein Protein-Blotting üblicherweise durchgeführt wird, sowohl NC als auch die daran adsorbierten Proteine negativ geladen sind. Ein weiterer Grund ist die Beobachtung, daß nichtionische Detergenzien an NC adsorbierte Proteine eluieren können. Ungeklärt ist bisher, inwieweit die durch die SDS-PAGE denaturierten Proteine beim Semidry-Blotting eine Renaturierung erfahren.

Die Bindungskapazität der NC-Membranen für Proteine ist abhängig von der Porengröße. Je feiner die Porung, umso mehr Proteine können gebunden werden. Die verwendete NC hat eine Porengröße von 0.2 µm. Beim Semidry-Blotting wird ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet (VIETHS ET AL. 1992B). (Durchführung siehe Anhang 7.7)

3.6.1 Immunoblot

Die Kombination des Proteintransfers auf eine immobilisierende Membran mit anschließender immunochemischer Detektion bezeichnet man als Immunoblot. Dabei werden zunächst, um Störungen der immunochemischen Detektion zu vermeiden, die nach dem Transfer freigebliebenen Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran mit Magermilchpulver blockiert (JOHNSON ET AL. 1984).

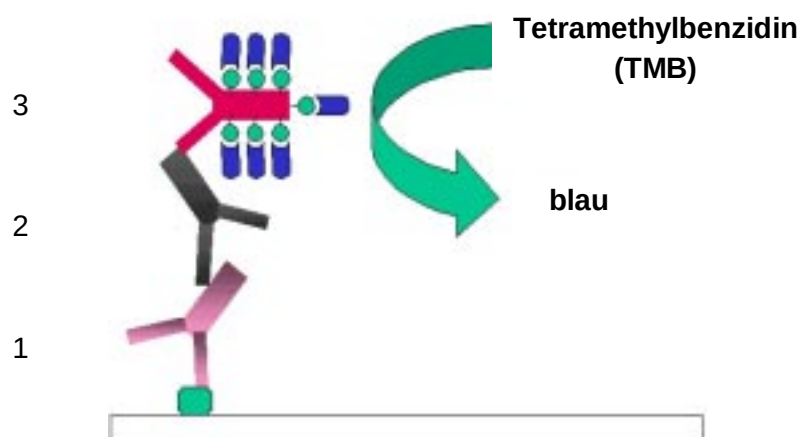


Abb. 3.2: Prinzip des Immunoblots

Die IgE Antikörper der Patientenseren binden an die getrennten und immobilisierten Allergene (1). Die IgE-Antikörper werden mit Kaninchen Anti-Human-IgE (2) und mehrfach biotinyliertem Anti-Kaninchen IgG von der Ziege inkubiert (3). An das Anti-Kaninchen IgG binden mehrere Streptavidin-Meerrettichperoxidase-(HRP)-Moleküle, woraus sich ein Verstärkungseffekt ergibt. Es schließt sich eine enzymatische Farbreaktion an, aus der eine Blaufärbung der Allergene resultiert.

Zur Erhöhung der Empfindlichkeit der immunochemischen Detektion wird ein Verstärkersystem nach VIETHS ET AL. (1992B) verwendet. Bei diesem Verstärkersystem werden die an die Allergenbanden gebundenen IgE-Antikörper zunächst mit einem Anti-Human IgE aus dem Kaninchen und anschließend mit einem aus der Ziege gewonnenen mehrfach biotinylierten Anti-Kaninchen IgG inkubiert. An die Biotinmoleküle erfolgt im folgenden Schritt die Bindung von mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiertem Streptavidin. Bei der anschließenden enzymatischen Farbreaktion wird als Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt, welches unter der katalytischen Wirkung der HRP unter Einwirkung von Wasserstoffperoxid zunächst ein blau gefärbtes Radikalkation bildet, welches anschließend zum gelbgefärbten 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-di-immoniumsalz weiteroxidiert wird (GALLATI & PRACHT 1985). (Durchführung siehe Anhang 7.8)

3.6.2 Immunoblot-Inhibition

Bei der Immunoblot-Inhibition wird zunächst ein nativer Proteinextrakt elektrophoretisch getrennt. Vor der sich anschließenden immunologischen Detektion wird das Patientenserum mit dem auf die allergene Aktivität zu prüfenden Proteinextrakt, dem Inhibitor, inkubiert. Als Inhibitoren werden sowohl die Extrakte aus den verschiedenen Verarbeitungsstufen der Haselnuß-, Apfel- und Karottenprodukte als auch die enzymatisch behandelten Haselnußproben verwendet. Die Anwesenheit von Allergenen im Inhibitorextrakt führt aufgrund der Konkurrenzreaktion zwischen gelöstem und gebundenem Allergen zu einer Schwächung bzw. Löschung von Banden auf der NC-Membran (MÖLLER ET AL. 1997). Die Durchführung wird durch eine homologe Inhibition mit dem nativen Proteinextrakt sowie durch Prüfung auf unspezifische Inhibition mit Ovalbumin und dem Serum einer nicht allergisch reagierenden Person kontrolliert. Als Allergikerserum wird, wie auch bei der EAST-Inhibition (vgl. 3.4) ein aus verschiedenen Patientenseren zusammengesetztes Poolserum verwendet. Die Immunoblot-Inhibition dient zur weiteren Absicherung und bietet gegenüber der EAST-Inhibition den Vorteil, daß eine genauere Aussage darüber erfolgen kann, welche Allergene inhibiert werden. (Durchführung siehe Anhang 7.9)

3.7 Unspezifische Proteinfärbungen

Zur Visualisierung des Gesamtmusters der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im Acrylamidgel werden zwei unspezifische Detektionsmethoden, die Silberfärbung nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1986) sowie die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung nach FLING & GREGERSON (1986) verwendet. Die unspezifische Färbung der Proteine auf NC-Membranen erfolgt mit der kolloidalen Goldfärbung nach DANSCHER & NOORGARD (1983).

3.7.1 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist die empfindlichste, unspezifische Färbemethode für Proteine. Ihre Empfindlichkeit liegt bei etwa 0.05-0.1 ng/mm². Die Proteine werden nach der Methode von HEUCKESHOVEN & DERNICK (1986) mit Essigsäure fixiert und mit Glutardialdehyd, welches die Vernetzung der Proteine bewirkt, inkubiert. Anschließend erfolgt in einer Silbernitratlösung die Komplexbildung der Proteine und des Gels mit Silberionen. Die an die Proteine gebunde-

nen Silberionen besitzen ein höheres Normalpotential als die an das Gel gebundenen. Aus diesem Grund werden sie bevorzugt reduziert. Die Verwendung von Formaldehyd als Reduktionsmittel verstärkt diesen Effekt, da sein Redoxpotential zwischen dem Normalpotential der proteingebundenen und dem der gelgebundenen Silberionen liegt. (Durchführung siehe Anhang 7.10.1)

3.7.2 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung

Die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung ist eine um den Faktor 100 weniger empfindliche Färbemethode als die Silberfärbung. Bei dieser Methode werden alle Proteinfractionen durch Anlagerung des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau R-250 unspezifisch gefärbt. Die Nachweisempfindlichkeit beträgt ca. 30 ng pro Bande. Die Proteine im Gel werden dabei nach einer modifizierten Methode nach FLING & GREGERSON (1986) mit Essigsäure fixiert und mit Coomassie Brilliant-Blau R-250 angefärbt. In einem nachfolgenden Waschschrift wird der Hintergrund wieder entfärbt, und die Proteine werden als blaue Banden sichtbar. (Durchführung siehe Anhang 7.10.2)

3.7.3 Kolloidale Goldfärbung

Die kolloidale Goldfärbung nach DANSCHER & NOORGARD (1983) zur unspezifischen Anfärbung von Proteinen auf NC-Membranen beruht auf der selektiven Anlagerung von HAuCl_4 -Molekülen an die Proteine. Die Sensitivität ist um den Faktor 60 höher als bei der Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (MOEREMANS ET AL. 1985) und liegt im Bereich der Silberfärbung. Nach EGGER UND BIENZ (1987) bleibt bei dieser Färbemethode die Immunreaktivität erhalten, so daß eine sich anschließende Immunfärbung möglich ist. (Durchführung siehe 7.10.3)

4 ERGEBNISSE

4.1 Untersuchungen zur Haselnuß

4.1.1 Charakterisierung der Haselnußallergene unter Berücksichtigung verschiedener Sorten

Unter Verwendung des zur Verfügung stehenden Patientenkollektivs erfolgte zunächst eine Charakterisierung der Haselnußallergene anhand eines Proteinextraktes der Haselnußsorte *Barcelona*. Der mittels SDS-PAGE getrennte Extrakt wurde durch einen Semidry-Blot auf eine NC-Membran transferiert und anschließend immungefärbt. Abbildung 4.1 stellt das Ergebnis eines solchen Immunoblots dar. Die einzelnen Blotstreifen wurden mit 14 Patientenseren, in denen mittels EAST spezifische Antikörper gegen Haselnußproteine nachgewiesen wurden (vgl. 7.11) sowie dem Serum eines nicht sensibilisierten Patienten als Negativkontrolle inkubiert. Eine Zuordnung der Allergene hinsichtlich ihrer Molekulargewichte erfolgt anhand eines mittels kolloidaler Goldlösung angefärbten MG-Markers.

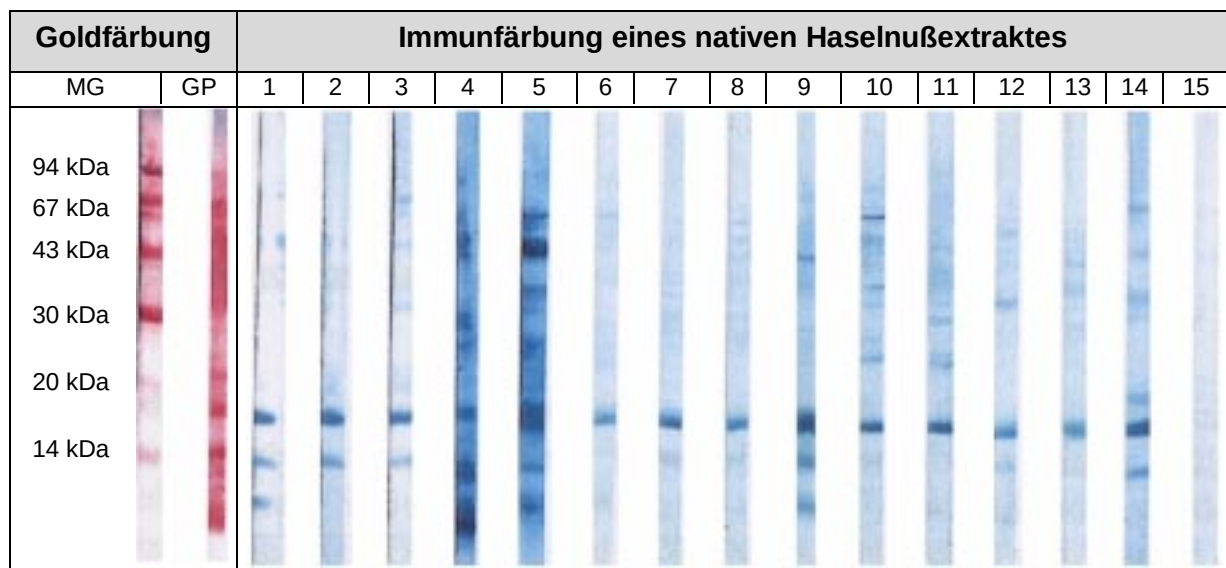


Abb. 4.1: Immunoblot eines Haselnußextraktes der Sorte *Barcelona*

MG: MG-Marker, PG: Gesamtproteinextrakt, 1: LS, 2: UW, 3: TS, 4: JGM, 5: AS, 6: BvW, 7: SKö, 8: IK, 9: EO, 10: HN, 11: TR, 12: SMO, 13: PW, 14: JA, 15: Kontrolle

Mit allen verwendeten Patientenseren wird deutlich ein Allergen im MG-Bereich von 18 kDa detektiert. Zusätzlich wird mit 11 der 14 Seren eine Allergenbande im Bereich von 14 kDa nachgewiesen, welche jedoch weniger intensiv angefärbt ist. Neben diesen beiden Allergenen wird besonders mit den Seren JGM, AS, HN, TR und JA eine Vielzahl an Minorallergenen im oberen MG-Bereich von 30-67 kDa detektiert. Aber auch im Bereich < 10 kDa sind mit einem Teil der Patientenseren (z.B. LS, JGM, AS und EO) Banden erkennbar. Die Seren der Patienten JGM und AS mit einem sehr hohen Sensibilisierungsgrad detektieren im ge-

samten MG-Bereich intensiv gefärbte Allergenbanden. Unter Verwendung des Serums eines Nichtallergikers als Negativkontrolle können mittels Immunfärbung keine Banden detektiert werden, weshalb eine unspezifische Färbung ausgeschlossen wird.

Zur Untersuchung einer möglichen Sortenabhängigkeit des allergenen Potentials von Haselnüssen wurden vier unterschiedliche Sorten aus den Anbaugebieten Deutschland (*Contorta*), Türkei (*Levantiner*), Italien (*Runde Römer*) und Sizilien (*Neapler*) mit der aus Kalifornien stammenden Sorte *Barcelona* (Referenzmaterial) verglichen. In der unspezifischen Silberfärbung zeigen die Proteinextrakte dieser Sorten weder in den Bandenmustern noch in der Intensität einzelner Proteinbanden Unterschiede (nicht dargestellt). Dieses kann durch die Untersuchung mittels SDS-PAGE/Immunoblot bestätigt werden. Mit keinem der verwendeten Patientenseren sind wesentliche Unterschiede in den Mustern der IgE-bindenden Proteine zu beobachten. Hinsichtlich der Intensität der detektierten Allergenbanden sind ebenfalls nur sehr geringe Unterschiede feststellbar (nicht dargestellt).

Mittels EAST-Inhibition können, wie aus Abbildung 4.2 deutlich wird, auch kaum Unterschiede im allergenen Potential der fünf untersuchten Sorten nachgewiesen werden. An die Festphase sind die Proteine der Sorte *Barcelona* gekoppelt. Weiterhin wird ein zu gleichen Anteilen aus 13 Patientenseren zusammengesetztes Poolserum (vgl. Anhang 7.11) eingesetzt. Die Inhibitionskurven der fünf untersuchten Sorten haben einen ähnlichen Verlauf. Die C_{50} -Werte variieren lediglich zwischen 14 mg/L und 92 mg/L (vgl. Anhang 7.13).

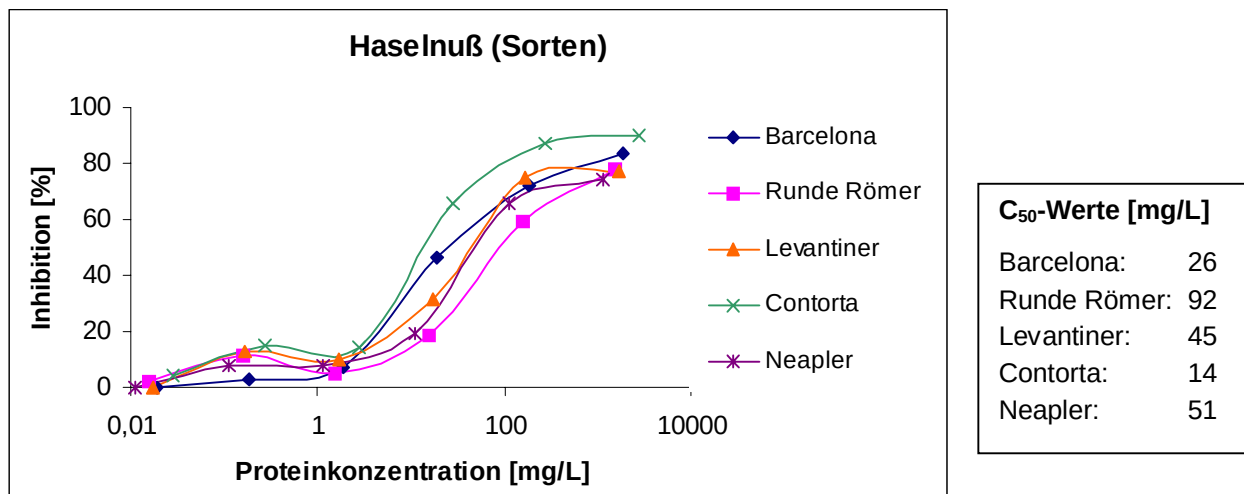


Abb. 4.2: EAST-Inhibitionsgraphen verschiedener Haselnußsorten

4.1.2 Einfluß von Erhitzungsprozessen auf die Allergene der Haselnuß

Die Untersuchung des Einflusses von Erhitzungsprozessen auf das allergene Potential der Haselnüsse erfolgte exemplarisch anhand von Erhitzungsversuchen im Trockenschrank. Der Erhitzungsprozeß wurde jeweils durch eine Veränderung der Temperatur sowie der Erhitzungsdauer variiert. Die Untersuchungen wurden mit der Referenzsorte *Barcelona* durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Erhitzung der Haselnüsse bei einer konstanten Temperatur von 100 °C. Die Erhitzungsdauer variierte zwischen 15 min und 90 min. Des weiteren wurde bei einer konstanten Erhitzungsdauer von 15 min die Temperatur verändert (155 °C – 185 °C).

Eine Auswahl von mittels SDS-PAGE getrennten und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Proteinextrakten der erhitzten Haselnüsse zeigt Abbildung 4.3.

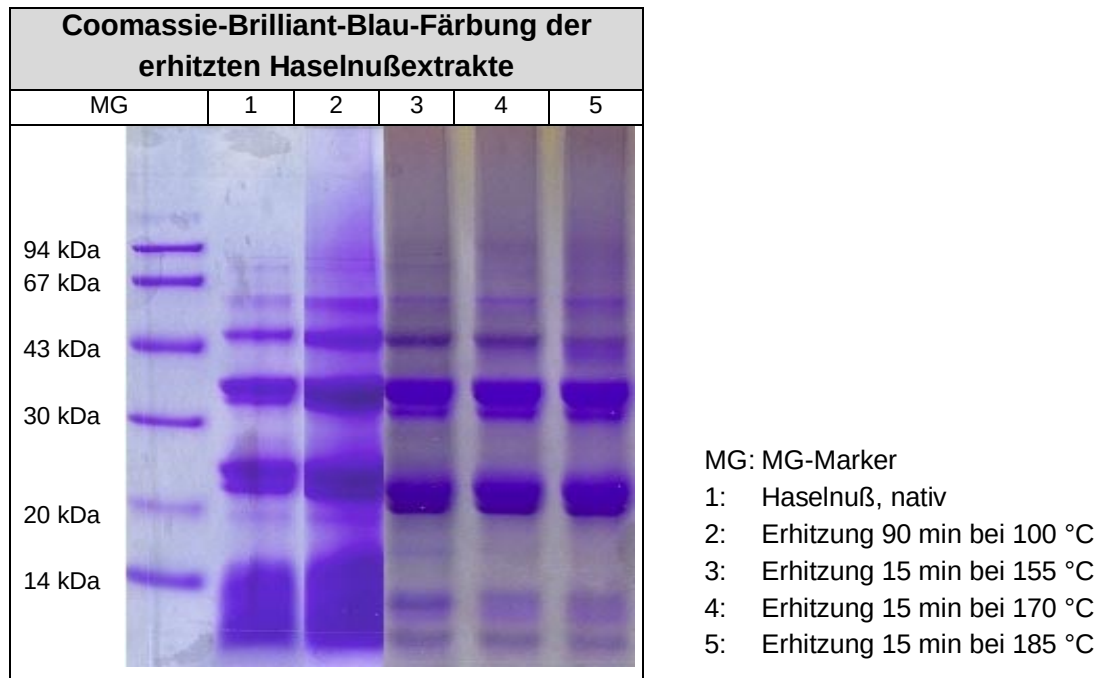


Abb. 4.3: Gesamtproteinmuster erhitzter Haselnüsse

Die Bandenmuster der mittels SDS-PAGE getrennten Extrakte aus den erhitzten Haselnüssen sind ähnlich und unterscheiden sich nur unwesentlich vom nativen Proteinextrakt, welcher zahlreiche Proteinbanden im MG-Bereich von etwa 5 kDa bis 90 kDa zeigt. Besonders intensive Banden sind in den Bereichen von < 14 kDa, 20-25 kDa, 30-35 kDa sowie 43 kDa zu erkennen. Das bereits im Immunoblot als Hauptallergen der Haselnuß bestimmte Protein mit einem MG von 18 kDa wird erst nach einer Erhitzungstemperatur von 170 °C und 185 °C nicht mehr detektiert.

Die Abbildungen 4.4 und 4.5 zeigen die Ergebnisse einer mit den aus den erhitzten Haselnußchargen gewonnenen Proteinextrakten durchgeführten EAST-Inhibition. An die Festphase sind wiederum die Proteine der Sorte *Barcelona* gekoppelt, mit welcher die Erhitzungsversuche durchgeführt wurden. Es wurde das bereits beschriebene aus 13 Patientenseren zusammengesetzte Poolserum eingesetzt.

Aus Abbildung 4.4 wird deutlich, daß die Inhibitionsgraphen der aus den unterschiedlich lange bei einer konstanten Temperatur von 100 °C erhitzten Haselnüsse gewonnenen Proteinextrakte nahezu identisch verlaufen und sich auch vom Graphen des nativen, auch an die Festphase gekoppelten Extraktes (homologe Inhibition) nicht unterscheiden. Entsprechend variieren auch die C_{50} -Werte nur unwesentlich zwischen 18 mg/L bei den 15 min erhitzten Haselnüssen und 26 mg/L bei der homologen Inhibition (vgl. Anhang 7.13). Offensichtlich hat eine Erhitzung der Haselnüsse auf 100 °C unabhängig von einer Erhitzungsdauer bis zu 90 min keinen Einfluß auf das allergene Potential.

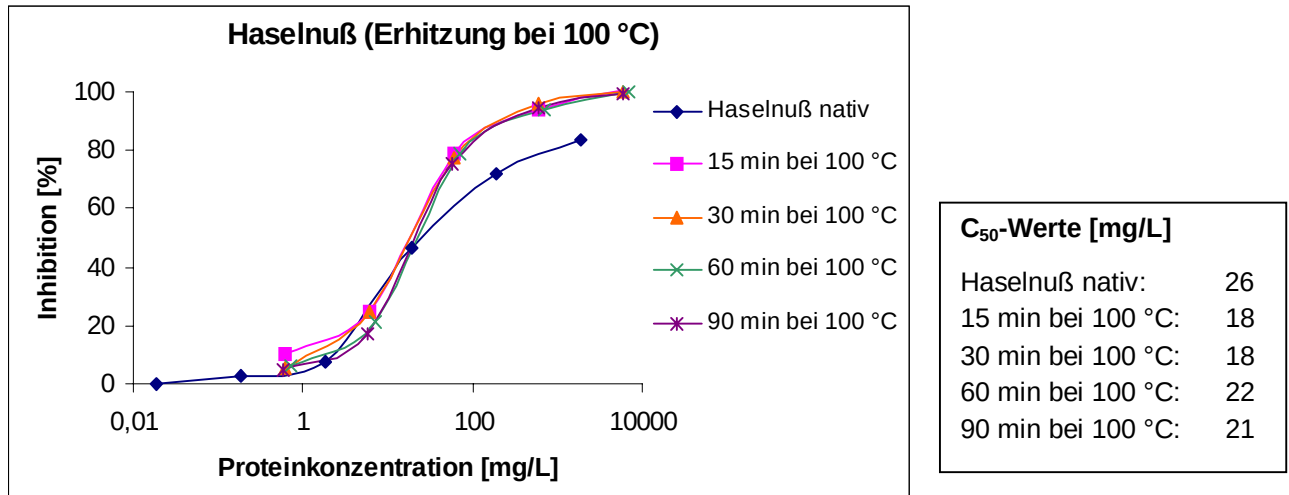


Abb. 4.4: EAST-Inhibitionsgraphen erhitzter Haselnüsse ($T_{\text{konstant}} = 100\text{ °C}$)

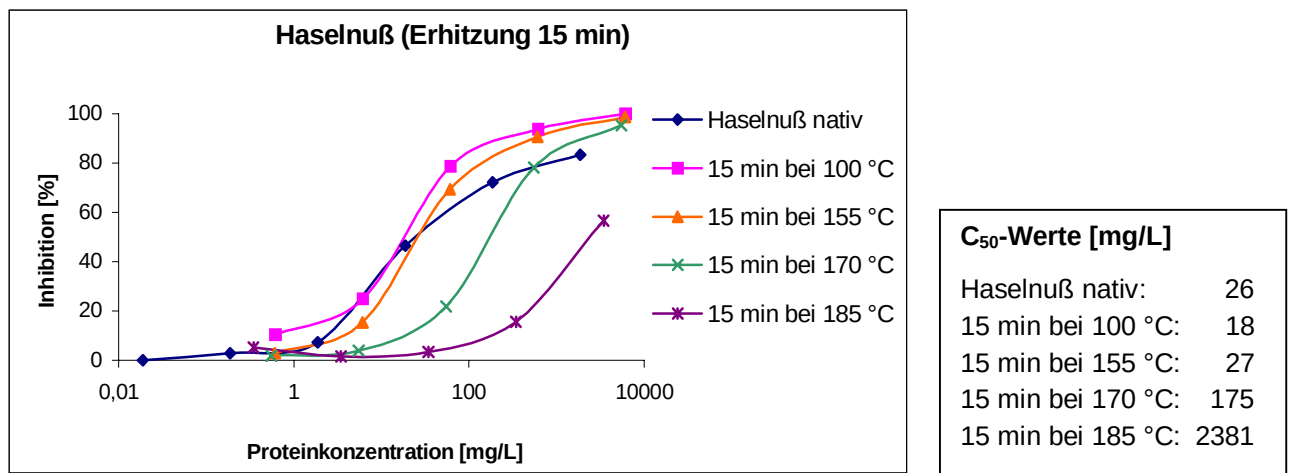


Abb. 4.5: EAST-Inhibitionsgraphen erhitzter Haselnüsse ($t_{\text{konstant}} = \text{min}$)

Die Inhibitionsgraphen der Extrakte aus den jeweils 15 min bei unterschiedlichen Temperaturen erhitzten Haselnüsse zeigen, wie aus Abbildung 4.5 deutlich wird, sehr unterschiedliche Verläufe und werden mit zunehmender Temperatur flacher. Entsprechend variieren auch die C_{50} -Werte. Die auf 100 °C erhitzten Haselnüsse weisen einen C_{50} -Wert von 18 mg/L auf. Der C_{50} -Wert der auf 155 °C erhitzten Haselnüsse ist mit 27 mg/L nur geringfügig höher und fast identisch mit dem der homologen Inhibition (26 mg/L). Die Allergenität bleibt zunächst nahezu unverändert. Oberhalb einer Temperatur von 155 °C nimmt das allergene Potential der Inhibitorextrakte deutlich ab. Der C_{50} -Wert der auf 170 °C erhitzten Haselnüsse beträgt 175 mg/L, der der auf 185 °C erhitzten Nüsse 2381 mg/L (vgl. Anhang 7.13). Demnach hat die angewandte Erhitzungstemperatur einen erheblichen Einfluß auf das allergene Potential der Haselnüsse.

Die Ergebnisse eines Immunoblots der aus den bei 155 °C und 185 °C erhitzten Haselnüssen gewonnenen Proteinextrakte zeigt Abbildung 4.6. Die Blotstreifen wurden mit sieben ausgewählten Patientenseren sowie dem Serum einer nichtsensibilisierten Person als Negativkontrolle inkubiert. Eine Charakterisierung der Allergenbanden hinsichtlich ihres MG erfolgte wiederum anhand eines kolloidal goldgefärbten MG-Markers.

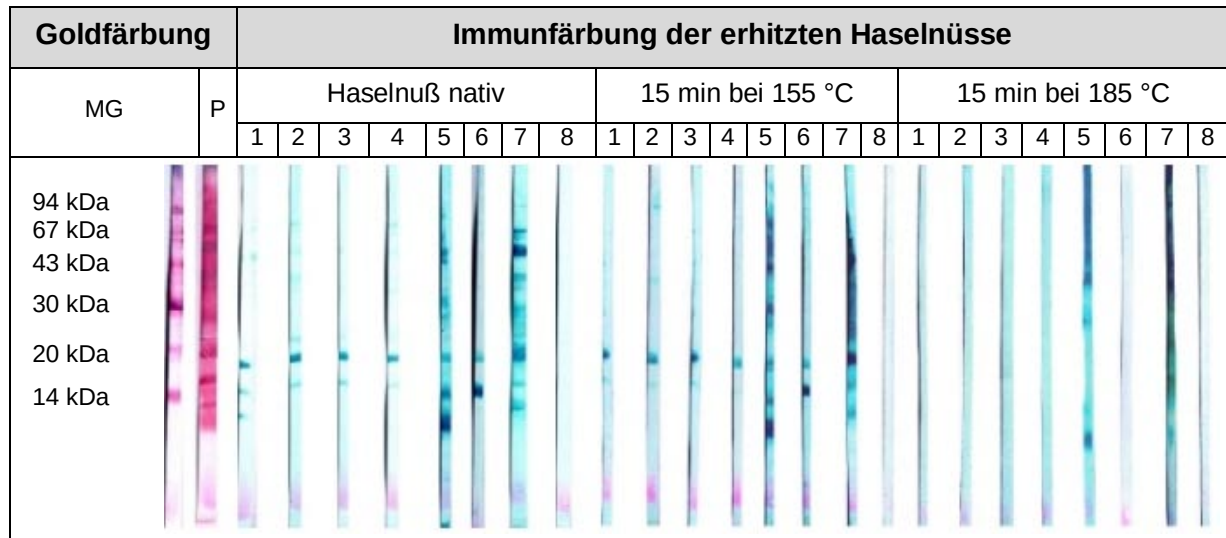


Abb. 4.6: Immunoblot unterschiedlich erhitzter Haselnüsse

MG: MG-Marker, P: Gesamtproteinextrakt, 1: LS, 2: JA, 3: UW, 4: TS, 5: JGM, 6: St 12, 7: AS, 8: Kontrolle

Es wird deutlich, daß die Proteinextrakte der auf 155 °C erhitzten Haselnüsse ein dem nativen, nicht erhitzten Referenzmaterial entsprechendes Allergenmuster zeigen. Auf allen Streifen ist deutlich das 18 kDa Hauptallergen zu erkennen. Auch das 14 kDa Allergen wird von mehreren Seren detektiert. Die Seren der stark sensibilisierten Patienten JGM und AS detektieren zusätzlich eine Vielzahl an Proteinbanden im MG-Bereich < 10 kDa sowie 20-90 kDa. Ein identisches Bandenmuster zeigen die Extrakte der 90 min bei 100 °C erhitzten Haselnüsse, weshalb auf eine Abbildung verzichtet wird. Für die 15 min bei 185 °C erhitzten Haselnüsse ergibt sich ein deutlich abweichendes Bild. Es werden mit keinem der Seren die Allergene bei 18 kDa oder 14 kDa detektiert. Die Seren der stark sensibilisierten Patienten JGM und AS detektieren jedoch nach wie vor Banden im Bereich < 10 kDa sowie zwischen 45 und 90 kDa. Hierbei scheint es sich um sehr thermostabile Allergenstrukturen zu handeln. Die mittels Immunoblot erzielten Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der EAST-Inhibition überein. Eine Verringerung des allergenen Potentials von Haselnüssen erfolgt offensichtlich erst bei Temperaturen oberhalb von 155 °C.

4.1.3 Einfluß des enzymatischen Verdaus auf die Allergenität der Haselnuß

Zur Untersuchung des Einflusses eines enzymatischen Verdaus auf die Allergene der Haselnuß, wurden Nüsse der Sorte *Barcelona* mit den Enzymen Pepsin, Pankreatin, Trypsin, Elastase und Protease verdaut. Da bei der proteolytischen Behandlung kleinere Proteinfragmente und Peptide entstehen, erfolgte die Trennung der Proteinextrakte beim Immunoblot in Tricin-gepufferten Gelen (vgl. Anhang 7.6.2). Für die unspezifische Proteinfärbung nach HEUCKESHOVEN & DERNICK (1986) erfolgte aufgrund der besseren Visualisierung eine Trennung in einem herkömmlichen 10 %igen Acrylamidgel. Abbildung 4.7 zeigt das Ergebnis einer solchen unspezifischen Silberfärbung. Die Proteingehalte der Extrakte aus den enzymatisch behandelten Haselnüssen liegen bei etwa 2000 mg/L und sind miteinander vergleichbar, lediglich der Extrakt nach 240 min Pepsinverdau hat einen geringeren Proteingehalt von etwa 1000 mg/L (vgl. Anhang 7.12).

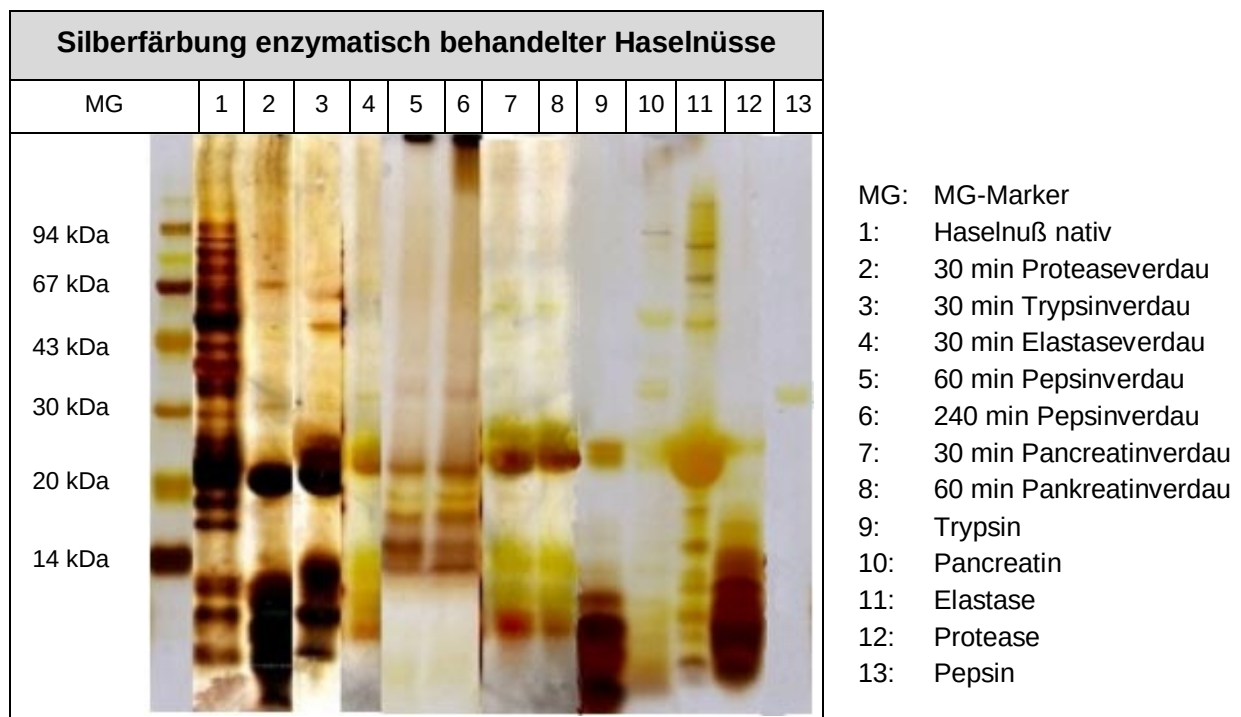


Abb. 4.7: Gesamtproteinmuster von enzymatisch behandelten Haselnüssen und Enzymen

Sämtliche enzymatischen Behandlungen führen zu einem deutlichen Abbau der Proteine mit MG > 20 kDa. Die Enzyme Elastase, Protease und Trypsin bewirken einen zusätzlichen Abbau von Proteinen mit MG von 16 kDa und 18 kDa. Nach dem Pepsinverdau sind noch Proteine im Bereich zwischen 14 kDa und 20 kDa detektierbar, während Proteine mit MG von > 20 kDa und < 14 kDa stark abgebaut werden. Die Behandlung mit Pankreatin führt schließlich zu einem deutlichen Abbau aller Proteine > 14 kDa. Da sämtliche Enzympräparate mit Ausnahme des Pepsins Proteinbanden bei 20 kDa sowie im Bereich < 14 kDa aufweisen, ist eine Unterscheidung zwischen Enzympräparat und Haselnußproteinen in diesen MG-Bereichen nicht möglich.

Die Untersuchung des allergenen Potentials der mit Verdauungsenzymen behandelten Haselnüsse erfolgte wiederum sowohl mittels EAST-Inhibition unter Verwendung des bereits beschriebenen Poolserums als auch mittels Immunoblot. Nach 30 minütiger Behandlung mit den Enzymen Protease, Elastase und Trypsin können mittels Immunoblot unter Verwendung von sieben Seren von gegen Haselnuß sensibilisierten Patienten in keinem der Extrakte IgE-bindende Proteine nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Dies wird durch die in Abbildung 4.8 dargestellten Ergebnisse der EAST-Inhibition bestätigt. Während die homologe Inhibition mit einem Proteinextrakt der nativen, unverdauten Haselnüsse eine typische Inhibitionskurve mit einem C_{50} -Wert von 35 mg/L zeigt, erreicht keiner der Extrakte aus den mit Protease, Elastase oder Trypsin verdauten Proben Inhibitionen von über 30 % (vgl. Anhang 7.13), was einer nur sehr schwachen allergenen Aktivität dieser Extrakte gleichkommt. Kontrollversuche mit den Enzympräparaten als Inhibitorextrakte ergeben lediglich Inhibitionen kleiner 2 % (nicht dargestellt).

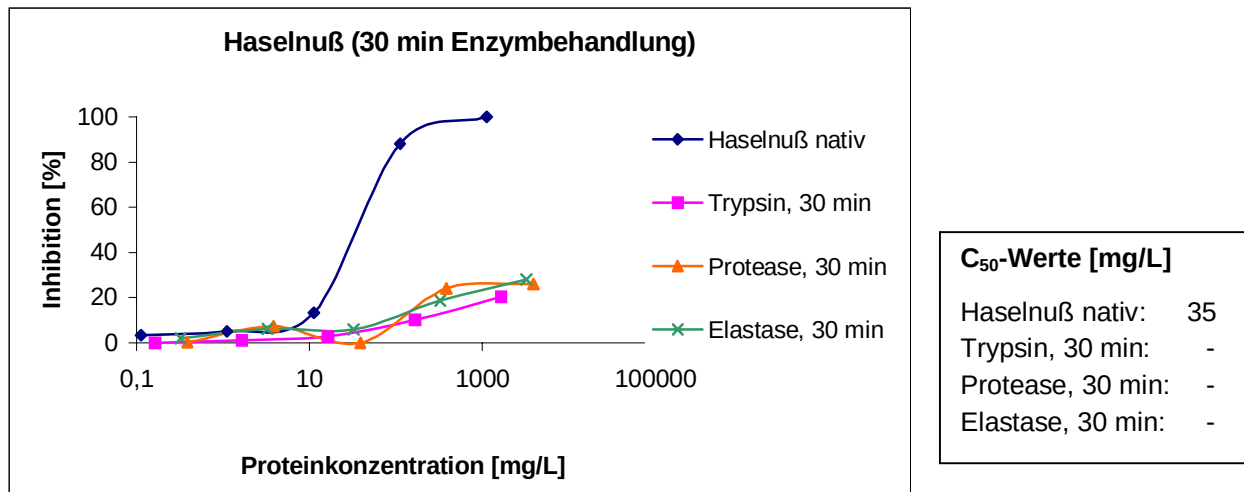


Abb. 4.8: EAST-Inhibitionsgraphen enzymbehandelter Haselnüsse I

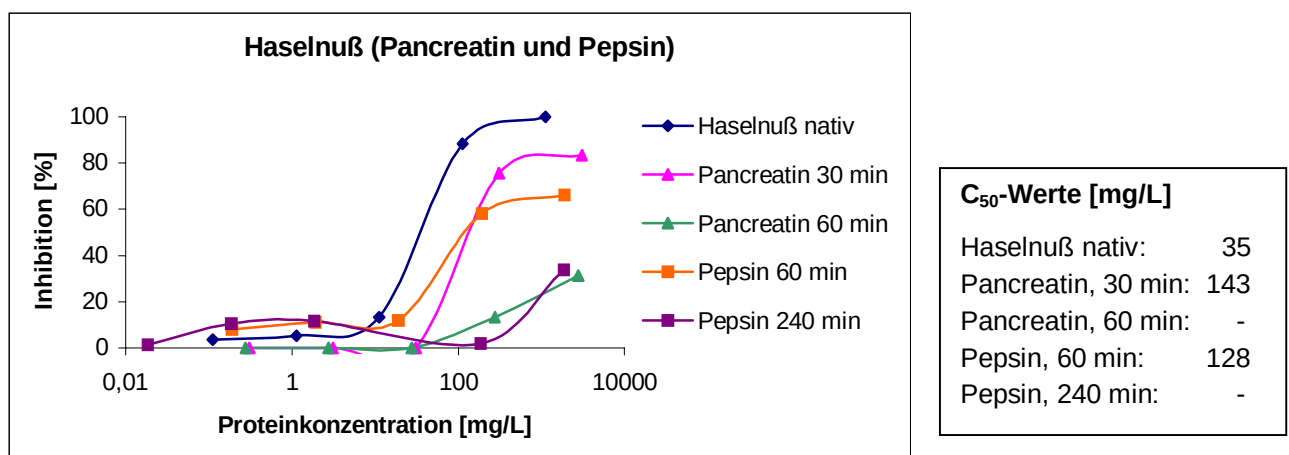


Abb. 4.9: EAST-Inhibitionsgraphen enzymbehandelter Haselnüsse II

Die in Abbildung 4.9 dargestellten Graphen resultieren aus Inhibitionsversuchen mit Haselnußproteinextrakten nach enzymatischer Behandlung mit Pepsin (60 min und 240 min) und Pankreatin (30 min und 60 min). Es zeigt sich, daß eine 60 minütige Behandlung mit Pepsin zu einer leichten Abflachung der Inhibitionskurve und damit zu einer verminderten Inhibition führt. Der C_{50} -Wert liegt mit 128 mg/L entsprechend höher als bei der homologen Inhibition (35 mg/L). Demnach erfolgt eine geringe Abnahme des allergenen Potentials. Ein 240 minütiger Pepsinverdau führt zu einer deutlichen Verringerung des allergenen Potentials, wobei eine maximale Inhibition von nur noch etwa 35 % erreicht wird (vgl. Anhang 7.13).

Der Extrakt der 30 min mit Pankreatin behandelten Haselnüsse zeigt mit einem C_{50} -Wert von 143 mg/L im Vergleich zur homologen Inhibition (35 mg/L) nur eine geringe Schwächung der Allergenität. Bereits nach 60 minütiger Behandlung ist allerdings auch in diesem Fall eine starke Abnahme des allergenen Potentials zu beobachten. Die maximal erreichte Inhibition liegt nur bei etwa 31 %. In Kontrollversuchen zeigen weder Pepsin noch Pankreatin inhibierende Eigenschaften (nicht dargestellt).

Die in der EAST-Inhibition erzielten Ergebnisse können, wie aus den Abbildungen 4.10 und 4.11 deutlich wird, mittels SDS-PAGE in einem 16 % Acrylamidgel und anschließendem Immunoblot bestätigt werden. Die Blotstreifen werden mit sieben ausgewählten Patientenseren sowie dem Serum einer nichtsensibilisierten Person als Negativkontrolle inkubiert. Eine Charakterisierung der Allergenbanden hinsichtlich ihres MG erfolgt anhand von Markerproteinen mit geringen MG.

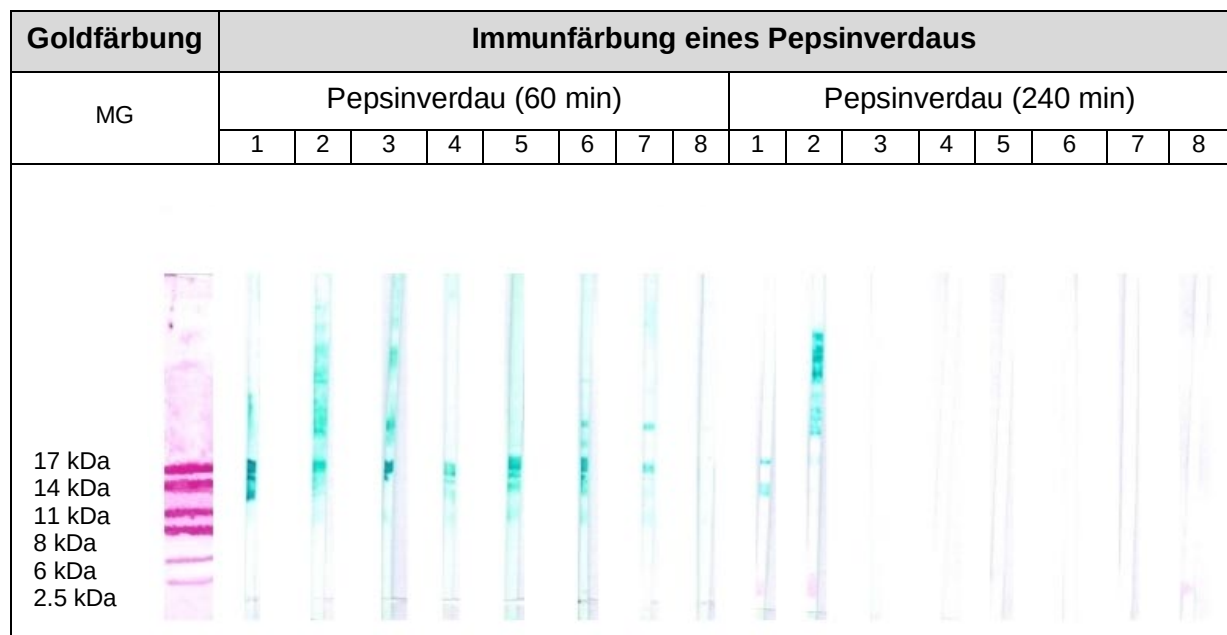


Abb. 4.10: Immunoblot von Haselnüssen nach Pepsinverdau

MG: MG-Marker, 1: MM, 2: KDH, 3: TR, 4: UW, 5: JA, 6: TV, 7: LS, 8: Kontrolle

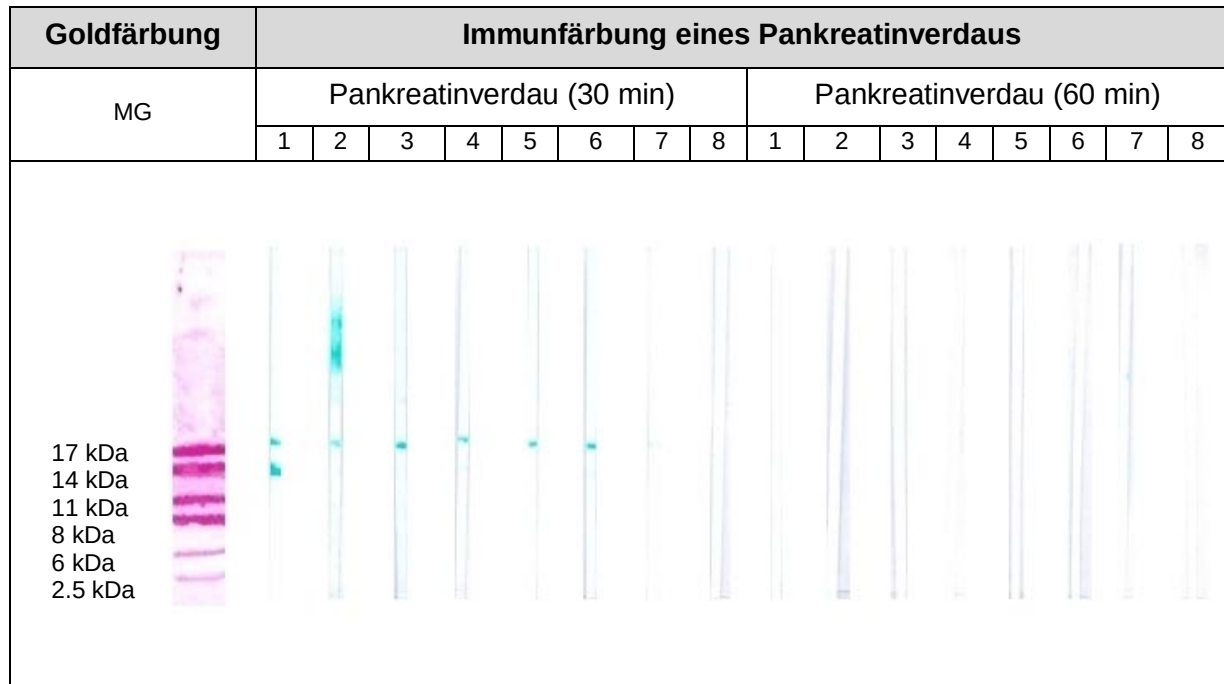


Abb. 4.11: Immunoblot von Haselnüssen nach Pankreatinverdau

MG: Molekulargewichtsmarker, 1: MM, 2: KDH, 3: TR, 4: UW, 5: Ja, 6: TV, 7: LS, 8: Kontrolle

Auch nach einer 60 minütigen Behandlung mit Pepsin zeigt sich, wie aus Abbildung 4.10 deutlich wird, mit sämtlichen verwendeten Patientenseren eine im Vergleich zum nativen Haselnußextrakt praktisch unveränderte Detektion der Haselnußallergene. Nach einer Pepsinbehandlung von 240 min hat sich das allergene Potential deutlich verringert, mit den Seren MM und KDH erfolgt dennoch eine schwache Detektion.

Nach 30 minütiger Pankreatinbehandlung wird, wie in Abbildung 4.11 zu erkennen ist, von den Seren TR, TV und LS eine Allergenbande bei etwa 30 kDa nicht mehr detektiert, während jedes Serum weiterhin das 18 kDa Hauptallergen der Haselnuß visualisiert. Serum MM detektiert zusätzlich das 14 kDa Allergen. Eine 60 minütige Behandlung mit Pankreatin führt zu einer Eliminierung der allergenen Aktivität.

4.1.4 Untersuchung des allergenen Potentials handelsüblicher Produkte

Anhand eines Warenkorbes wurden exemplarisch Haselnußprodukte aus dem Handel auf ihr allergenes Potential hin geprüft. Die untersuchten Produkte stellen eine Auswahl dar, die im wesentlichen das breite Produktspektrum der Süßwaren abdeckt. Aufgrund der Vielfältigkeit der untersuchten Produkte werden diese in Schokoladen, Nougatmassen und weitere Produkte, wie Backwaren oder Krokant unterteilt. Von sämtlichen untersuchten Produkten wurde zunächst das Gesamtproteinmuster mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung visualisiert (Abbildung 4.12). Bei diversen Produkten wurden die Proteinextrakte aus den zuvor isolierten Nüssen gewonnen. Dadurch konnten Matrixeinflüsse eliminiert werden. Bei den Produkten, bei denen eine Isolierung der Nüsse nicht möglich war, wurden die Proteinextrakte aus dem gesamten Produkt gewonnen (vgl. Kapitel 7.12).

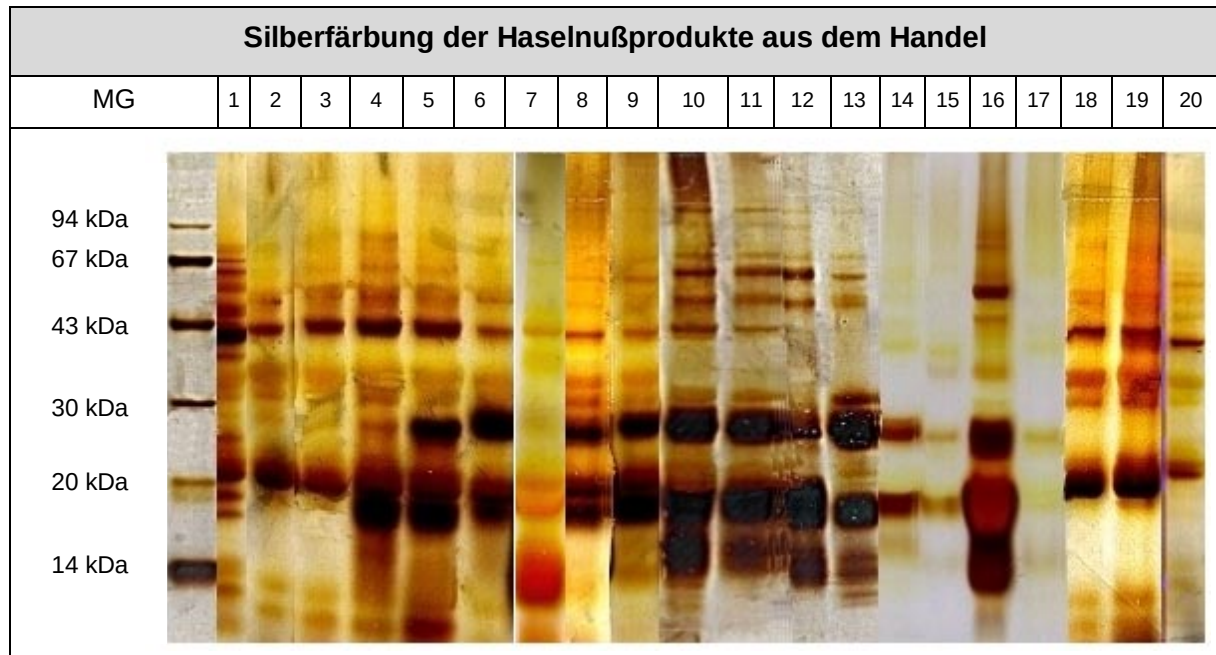


Abb. 4.12: Gesamtproteinmuster der Proteinextrakte der Haselnußprodukte aus dem Handel

MG: MG-Marker, 1: Haselnuß nativ, 2: Schokolade 3, 3: Schokolade 2, 4: Schokolade 5, 5: Schokolade 1, 6: Schokolade 4, 7: Vollmilchschokolade (Kontrolle), 8: Nougat 2, 9: Nougat 1, 10: Nougat 6, 11: Nougat 5, 12: Nougat 4, 13: Nougat 3, 14: Florentiner, 15: Haselnußkuchen, 16: Haselnuß-Tafel, 17: Mürbegebäck, 18: Krokant 1, 19: Krokant 2, 20: Müsli-Riegel

Wie aus Abbildung 4.12 deutlich wird, gleichen die Proteinbandenmuster der Extrakte aus Schokoladen, Nougat-Massen, Krokant und Müsli-Riegel bis auf geringe Unterschiede denen des nativen Haselnußproteinextraktes. Die Extrakte 10-13 und 16 zeigen zusätzliche Proteinbanden im Bereich der niedrigen Molekulargewichte, bei denen es sich vermutlich um Milchproteine handelt. Der aus der Vollmilchschokolade gewonnene Proteinextrakt weist im Bereich < 30 kDa deutliche Milchproteinbanden auf. Die aus unterschiedlichen Backwaren gewonnenen Extrakte zeigen nur schwach angefärbte Banden.

Auch bei den Haselnuß-Warenkorbprodukten erfolgte eine relative Quantifizierung der Allergenität mit Hilfe der EAST-Inhibition unter Verwendung des bereits beschriebenen Poolserums. Für die graphische Darstellung wurden die Produkte aufgrund der Übersichtlichkeit in drei Gruppen unterteilt.

In Abbildung 4.13 sind die Inhibitionskurven der Proteinextrakte aus den Nüssen der untersuchten Schokoladen dargestellt. Obwohl die IgE-Bindungsaktivität aller Extrakte (C_{50} -Werte 366 mg/L bis 1586 mg/L) im Vergleich zu dem aus unverarbeiteten Nüssen der Sorte *Barcelona* gewonnenen nativen Extrakt (C_{50} -Wert 26 mg/L) reduziert wird, deuten die Kurvenverläufe darauf hin, daß jeder der Extrakte und somit auch jedes untersuchte Produkt eine Restallergenität aufweist. Die mit einem Extrakt aus Vollmilchschokolade durchgeführte Negativkontrolle führt, wie man anhand der Abbildung 4.13 deutlich erkennen kann, zu keiner nennenswerten Inhibition (vgl. Anhang 7.13).

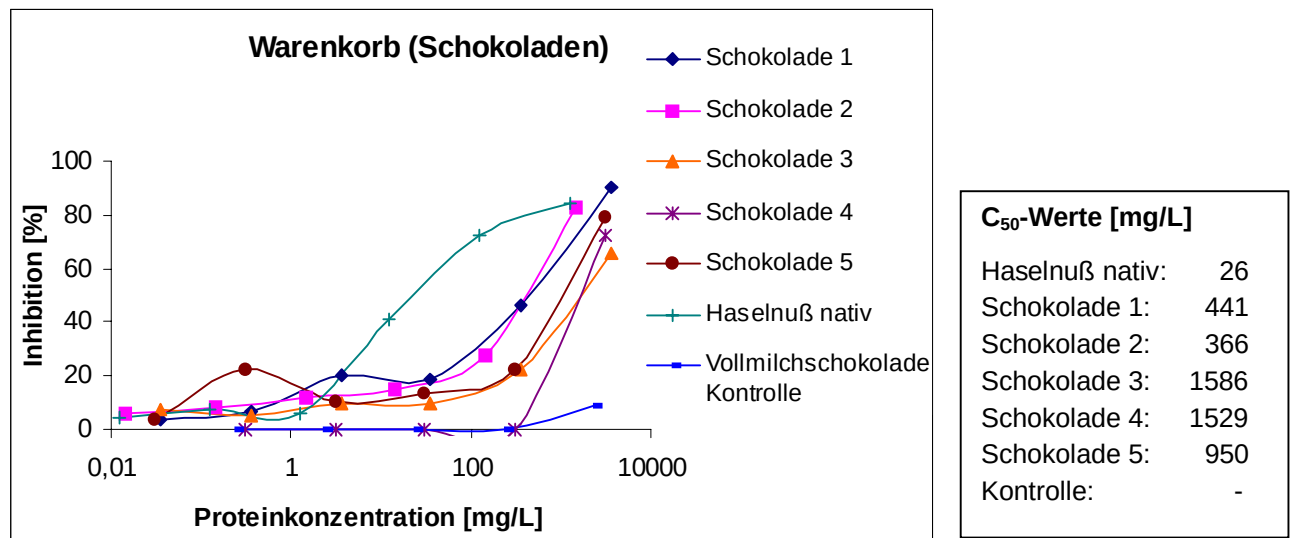


Abb. 4.13: EAST-Inhibitionsgraphen von Haselnußschokoladen

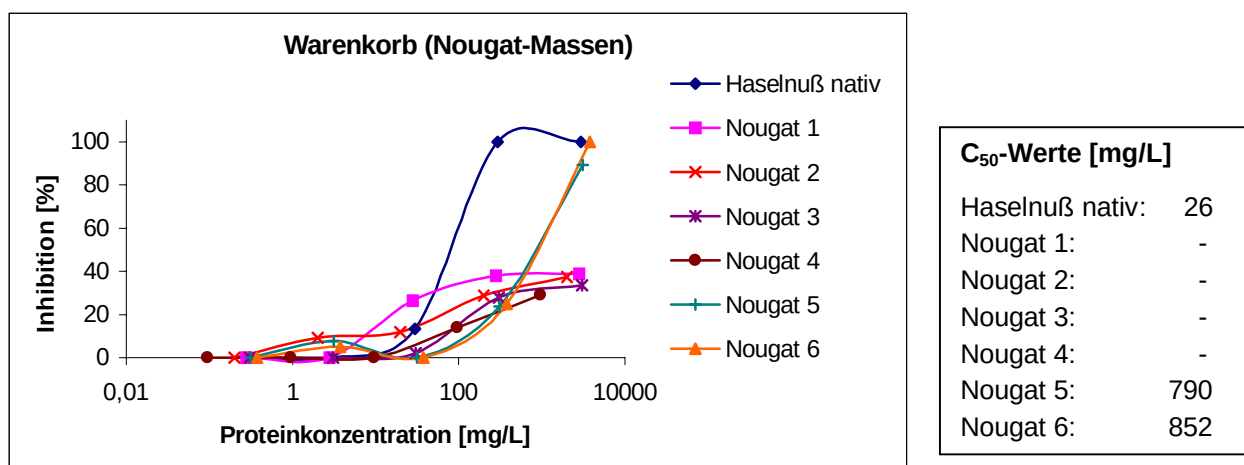


Abb. 4.14: EAST-Inhibitionsgraphen von Haselnuß-Nougatmassen

Abbildung 4.14 zeigt die Ergebnisse der EAST-Inhibitionen unterschiedlicher Haselnuß-Nougatmassen. Es ist deutlich erkennbar, daß das allergene Potential sämtlicher aus diesen Produkten gewonnener Extrakte deutlich abgenommen hat. Während die Extrakte Nougat 4 und Nougat 5, welche den Füllungen aus zwei unterschiedlichen Nuß-Nougat-Schokoladen entsprechen, mit 790 mg/L und 852 mg/L sehr ähnliche C₅₀-Werte erreichen, zeigen die übrigen Nougat-Extrakte maximale Inhibitionen von weniger als 40 % (vgl. Anhang 7.13).

In Abbildung 4.15 sind schließlich die EAST-Inhibitionsgraphen der aus den übrigen Warenkorbprodukten gewonnenen Proteinextrakte dargestellt. Während die allergene Aktivität des aus den Nüssen eines Müsliriegels gewonnenen Proteinextraktes mit einem C₅₀-Wert von 63 mg/L der des nativen Extraktes (C₅₀-Wert 26 mg/L) ähnlich ist, zeigt sich eine deutliche Reduzierung der IgE-Bindungsaktivität in den übrigen aus Haselnußkrokant oder –gebäck gewonnenen Extrakten. Ein allergenes Restpotential ist dennoch in allen untersuchten Extrakten vorhanden (vgl. Anhang 7.13).

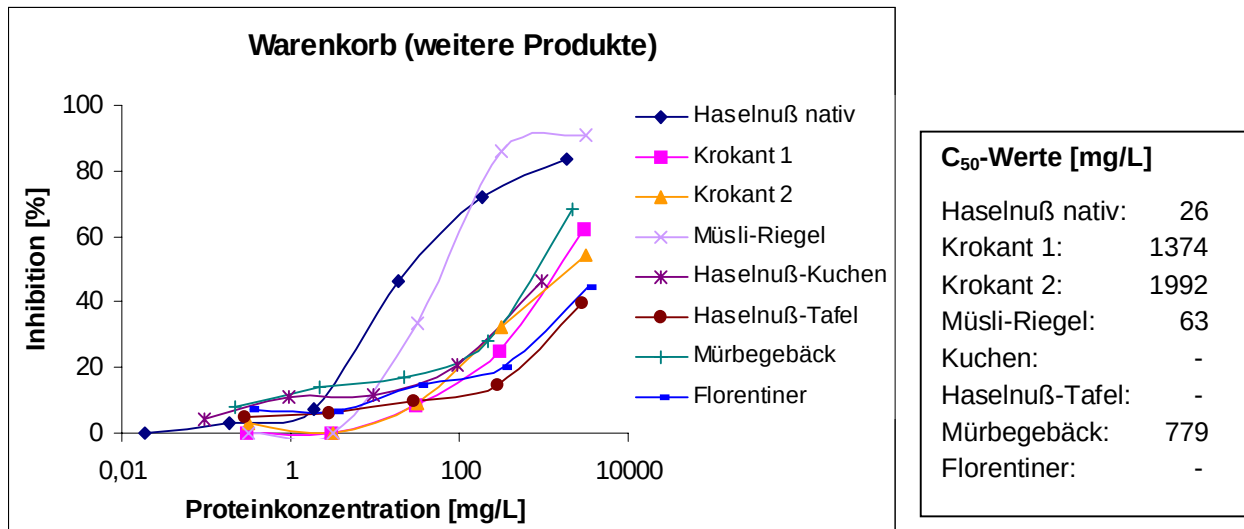


Abb. 4.15: EAST-Inhibitionsgraphen von weiteren Haselnußprodukten

Eine Bestätigung der mittels EAST-Inhibition durchgeführten Ergebnisse erfolgte wiederum im Immunoblot. In fünf der aus den untersuchten Produkten gewonnenen Proteinextrakte (Schokolade 1, Schokolade 2, Nougat 4, Nougat 5 und Müsli-Riegel) konnten mittels Immunoblot IgE-bindende Strukturen nachgewiesen werden. In den Proteinextrakten der übrigen Produkte konnten keine Allergenbanden detektiert werden. Abbildung 4.16 zeigt exemplarisch die Immunfärbungen der Extrakte aus Schokolade 2, Nougat 6 sowie dem Müsli-Riegel. In allen drei Extrakten werden mit allen verwendeten Patientenseren Allergenbanden detektiert. Es treten lediglich leichte Unterschiede in der Intensität der Färbung auf. So werden die Allergene im Extrakt der Schokolade 2 schwächer detektiert als in den Extrakten aus der Nougatmasse 6 und dem Müsli-Riegel.

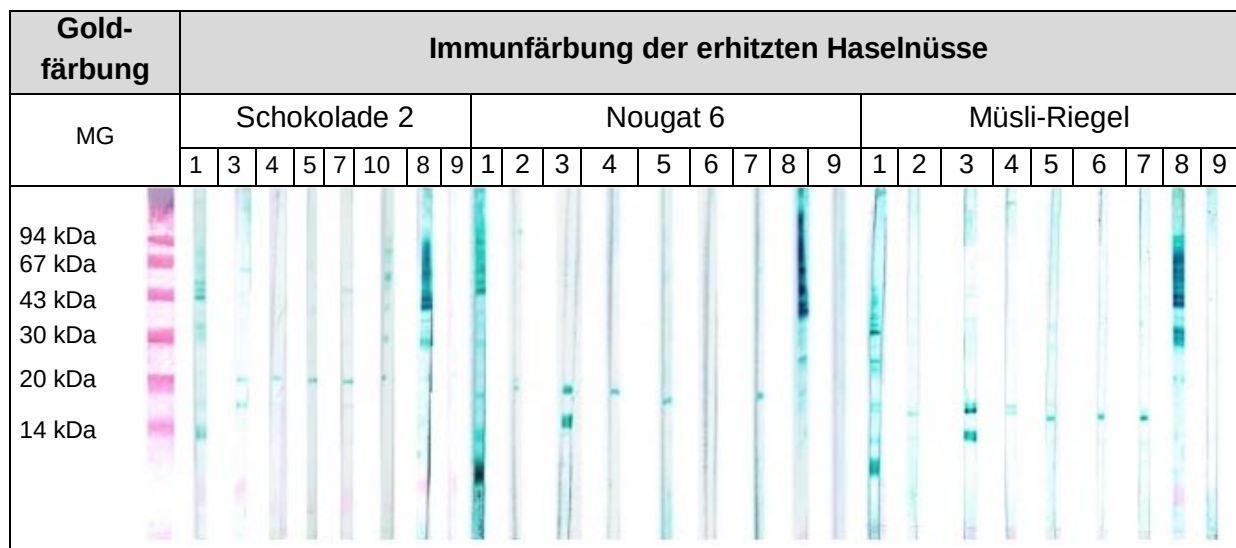


Abb. 4.16: Immunoblot von Haselnußprodukten

MG: MG-Marker, 1: JGM, 2: UW, 3: MM, 4: TS, 5: JA, 6: TV, 7: LS, 8: KDH, 9: Kontrolle, 10: TR

4.2 Untersuchungen zum Apfel

4.2.1 Charakterisierung der Apfelallergene

Zur Charakterisierung der Apfelallergene wurden die Proteine der Apfelsorte *Golden Delicious* wiederum mittels SDS-PAGE getrennt, auf eine NC-Membran transferiert und anschließend immungefärbt. Zusätzlich wurden der MG-Marker und der Apfelextrakt unspezifisch mit kolloidaler Goldlösung gefärbt.

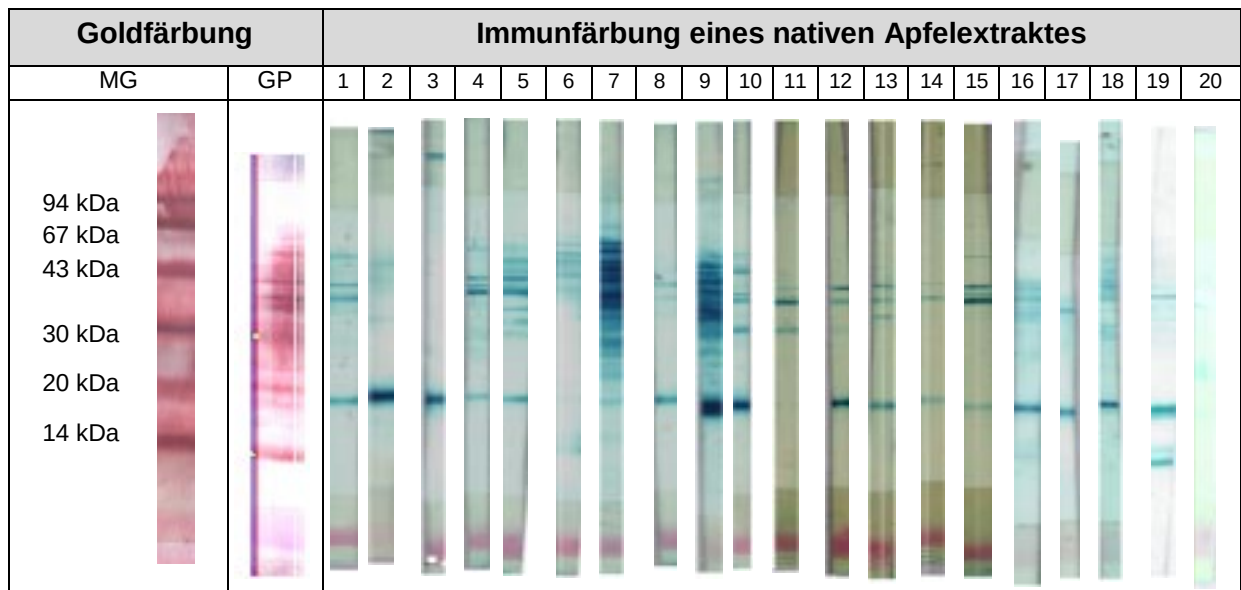


Abb. 4.17: Immunoblot eines Apfelextraktes der Sorte *Golden Delicious*

MG: MG-Marker, GP: Gesamtproteinextrakt, 1: TB, 2: UH, 3: PK, 4: UK, 5: IK, 6: RD, 7: UW_o, 8: UW, 9: SK, 10: HS, 11: MF, 12: KK, 13: SM, 14: BvW, 15: TV, 16: SW, 17: IS, 18: CF, 19: DS, 20: Kontrolle

Abbildung 4.17 zeigt den Immunoblot eines Apfelextraktes unter Verwendung verschiedener Einzelseren gegen Apfel sensibilisierter Patienten. Aus diesen 19 Seren setzt sich auch das für die weiteren Untersuchungen verwendete Poolserum zusammen (vgl. Kapitel 7.11). Mit Ausnahme der Seren 6 und 11 zeigen alle Seren eine positive Detektion des Hauptallergens Mal d 1 mit einem MG von 18 kDa. Weiterhin zeigen alle Seren ausgenommen die Seren der Patienten 2 und 3 ein IgE-bindendes Protein bei ca. 37 kDa. Auch die Bande bei 43 kDa ist mit Ausnahme der Seren 2, 3 und 6 mit allen Seren visualisierbar. Diese allergene Bande ist jedoch in den einzelnen Fällen weniger stark als die 18 kDa-Bande gefärbt. Neben den Hauptallergenen werden von diversen Seren, insbesondere von Serum 7 und 9, weitere allergene Banden im Bereich von 30 bis 67 kDa detektiert. Die Immunfärbung mit den Seren 6, 7, 16 und 19 zeigt eine zusätzliche Bande mit einem MG von 14 kDa, wobei es sich vermutlich um das bereits in der Literatur beschriebene Apfel-Profilin handelt. Unspezifische Bindungen können ausgeschlossen werden, da in der mit dem Serum eines Nichtallergikers durchgeführten Negativkontrolle (20) keine Allergenbanden detektiert werden.

4.2.2 Untersuchung des allergenen Potentials flüider Apfelprodukte

Die Untersuchung des allergenen Potentials flüider Apfelprodukte erfolgte anhand von fünf naturtrüben Apfelsäften sowie einem Apfelpüree, welche im Institut für Lebensmitteltechnologie der UH hergestellt wurden. Dabei wurden von den Zwischen- und Endprodukten (vgl. Kapitel 2.3.1) Proteinextrakte hergestellt, die auf ihr allergenes Potential hin untersucht wurden. Wiederum erfolgt neben der Visualisierung des Gesamtproteinmusters mittels Silberfärbung die Prüfung auf die Allergenität der Extrakte mittels Immunoblot und EAST-Inhibition unter Verwendung eines Poolserums. Darüber hinaus wurde die Allergenität der Endprodukte mittels Immunoblot unter Verwendung von Einzeleren verschiedener Allergiker sowie mittels Immunoblot-Inhibition überprüft.

4.2.2.1 Untersuchung der Maischen

Die Maische stellt bei allen durchgeführten Versuchsreihen den ersten Produktionsschritt dar und besteht aus verlesenen, in der Rätzmühle grob vermahlenden Äpfeln. Die mittels Silberfärbung detektierten Gesamtproteinmuster aller hergestellten Maischeextrakte sowie des nativen Apfelextraktes sind in Abbildung 4.18 dargestellt.

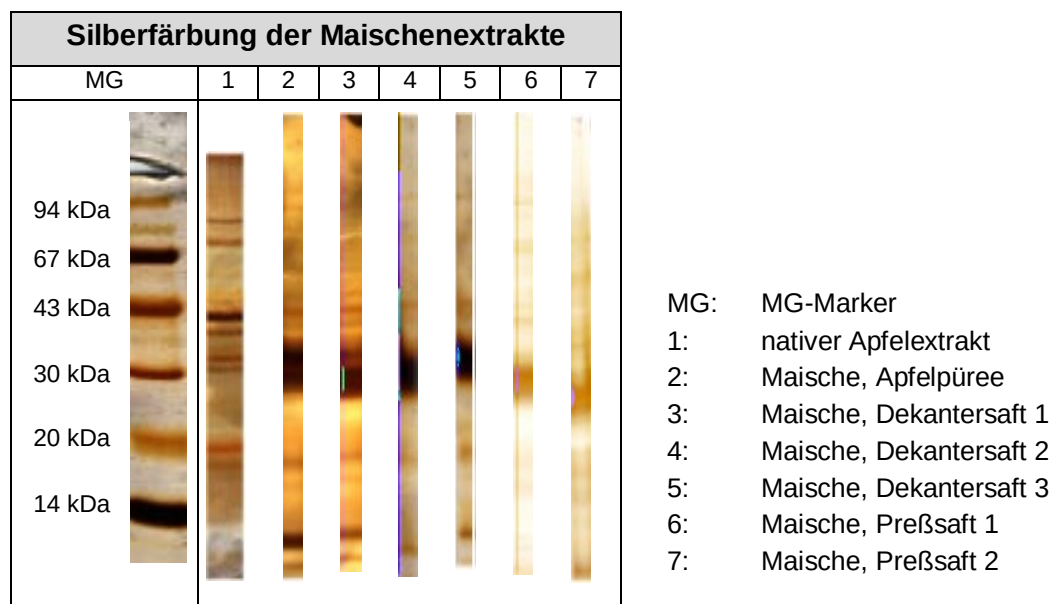


Abb. 4.18: Gesamtproteinmuster der Extrakte der unterschiedlichen Maischen

Der native Extrakt zeigt zahlreiche Proteinbanden im Bereich von 14 und 94 kDa. Besonders gut detektiert werden die Proteine mit einem MG von jeweils 18, 30 und 43 kDa. Die Banden im niedrigeren Molekulargewichtsbereich (< 18 kDa) können nur noch schwach visualisiert werden. Zwischen 30 und 43 kDa sind zusätzliche Banden erkennbar. Ebenfalls sind zwischen 67 und 94 kDa noch zwei Banden zu sehen.

Die Proteinbanden bei den Maischeextrakten werden im Vergleich zum nativen Apfelextrakt nur schwach detektiert. In allen Extrakten mit Ausnahme der aus den Maischen 6 und 7 ist noch eine Bande bei 18 kDa erkennbar, die allerdings deutlich schwächer gefärbt ist als

beim nativen Apfelextrakt. In sämtlichen Maischeextrakten ist bei etwa 30 kDa eine sehr breite Bande zu erkennen, die im nativen Extrakt nicht so deutlich hervortritt.

Da die Extrakte aus sämtlichen untersuchten Maischen im Immunoblot ein mit dem nativen Apfelextrakt fast identisches Bandenmuster zeigen (nicht abgebildet), wird in weiteren Versuchen der Einfluß der Maischestandzeit auf das allergene Potential untersucht. Da dieses bei Äpfeln durch die Oxidation von Polyphenolen zu mit den Proteinen reagierenden Chino-
nen reduziert werden kann, wird in einem Parallelversuch der Einfluß der antioxidativ wirk-
samen Ascorbinsäure untersucht. Dazu werden zwei Maischen hergestellt, von denen einer
400 mg Ascorbinsäure/kg zugegeben wird. Die Maischen werden einer Gesamtstandzeit von
drei Stunden unterzogen. Es werden Proben nach 0 h, 1 h, 2 h und 3 h abgenommen und
Proteinextrakte hergestellt. Der Immunoblot in Abbildung 4.19 zeigt einen Vergleich der Ex-
trakte aller hergestellten Maischen mit und ohne Ascorbinsäurezusatz. Bei der Detektion
wurde ein Poolserum (vgl. 7.11) verwendet.

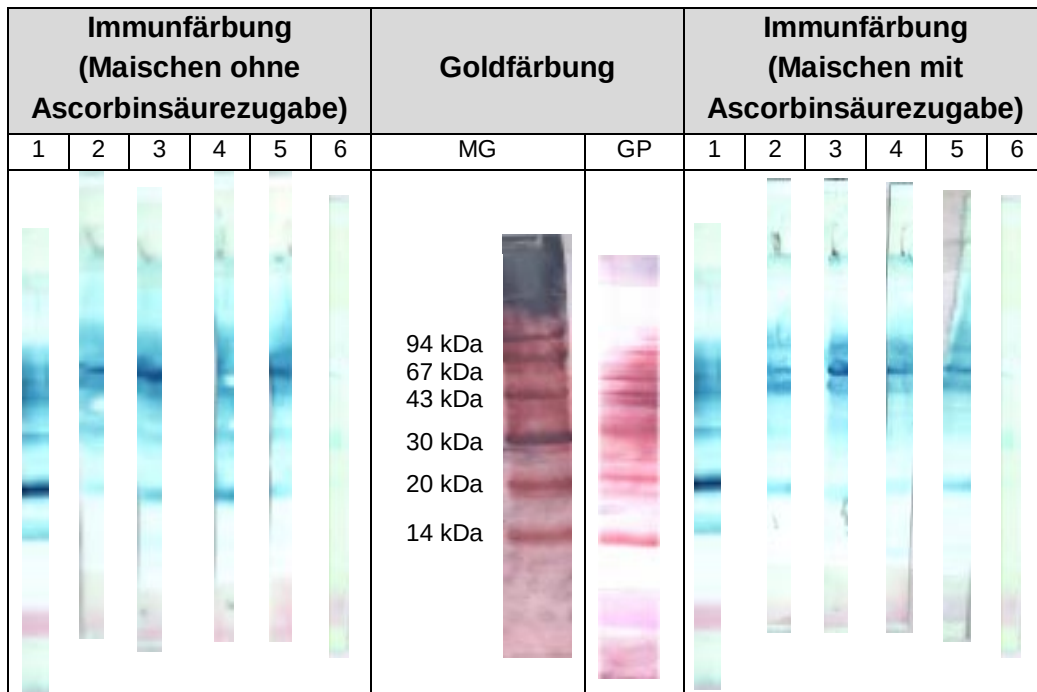


Abb. 4.19: Immunoblot von Maischen unterschiedlicher Standzeiten mit und ohne Ascorbinsäurezugabe

1: Apfel (nativ), 2: Standzeit 0 h, 3: Standzeit 1 h, 4: Standzeit 2 h, 5: Standzeit 3 h, 6: Kontrolle, MG: Molekulargewichtsmarker, GP: Gesamtproteinextrakt (Apfel, nativ)

Es ist deutlich zu erkennen, daß die nach verschiedenen Standzeiten aus den Apfelmaischen gewonnenen Proteinextrakte sich nur unwesentlich vom nativen Proteinextrakt unterscheiden. Lediglich das Allergen bei 14 kDa kann in allen Maischeextrakten nur noch sehr schwach nachgewiesen werden. Bei Zunahme der Maischestandzeit von 0 bis 3 Stunden sind keine weiteren Veränderungen im Allergenbandenmuster erkennbar. Auch ein Zusatz von Ascorbinsäure zur Apfelmaische (rechts dargestellt) führt im Immunoblot zu keiner erkennbaren Veränderung des allergenen Potentials.

Aus den Ergebnissen der EAST-Inhibition lassen sich differenziertere Aussagen bezüglich der Allergenität treffen. Während nach Ascorbinsäurezugabe das allergene Potential der Maischen bei Verlängerung der Standzeit konstant bleibt (Abbildung 4.21), zeigt sich bei den Maischen ohne Ascorbinsäurezusatz (Abbildung 4.20) eine Verringerung der allergenen Aktivität mit zunehmender Standzeit. Hier variieren die C_{50} -Werte zwischen 1,6 mg/L und 29 mg/L (vgl. Anhang 7.13).

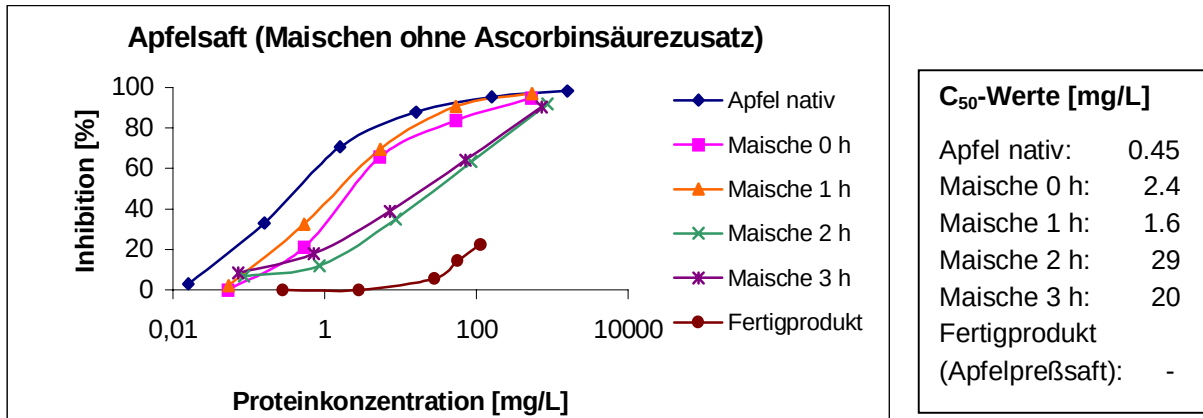


Abb. 4.20: EAST-Inhibitionsgraphen der Apfelmaischen ohne Ascorbinsäurezusatz

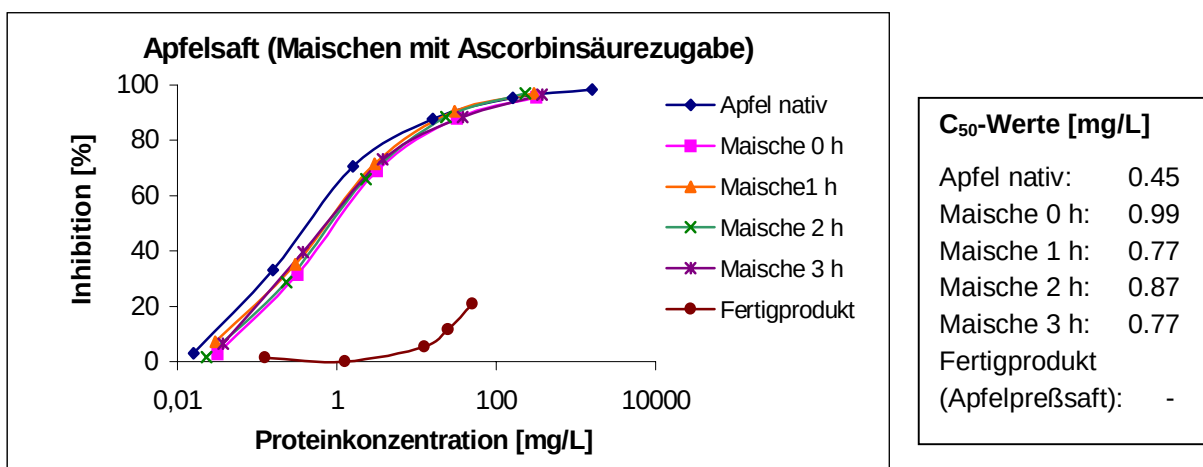


Abb. 4.21: EAST-Inhibitionsgraphen der Apfelmaischen mit Ascorbinsäurezusatz

Im Rahmen der Herstellung dieser Maischen mit unterschiedlichen Standzeiten wurde aus den Maischen nach dreistündiger Standzeit jeweils ein pasteurisierter Apfel-Preßsaft gewonnen. Die EAST-Inhibitionskurven dieser Fertigprodukte sind ebenfalls in den Abbildungen 4.20 und 4.21 dargestellt. Die Inhibitionskurven beider Säfte weichen sehr stark von den Inhibitionskurven der Maischen und besonders des nativen Apfelextraktes ab. Beide Säfte erreichen keine 50%ige Inhibition mehr. Die maximalen Inhibitionen sind mit ca. 20 % sehr gering, so daß man davon ausgehen kann, daß diese Säfte - unabhängig von einer möglichen Ascorbinsäurezugabe - kein allergenes Potential mehr besitzen.

4.2.2.2 Untersuchung der Trester

Der Trester ist der nach dem Pressen der Maische verbleibende Rückstand. Er besteht aus dem Kerngehäuse, der Schale und der Apfelfaser. Die mittels Silberfärbung detektierten Gesamtproteinmuster der Tresterextrakte sowie des nativen Apfelextraktes sind in Abbildung 4.22 dargestellt.

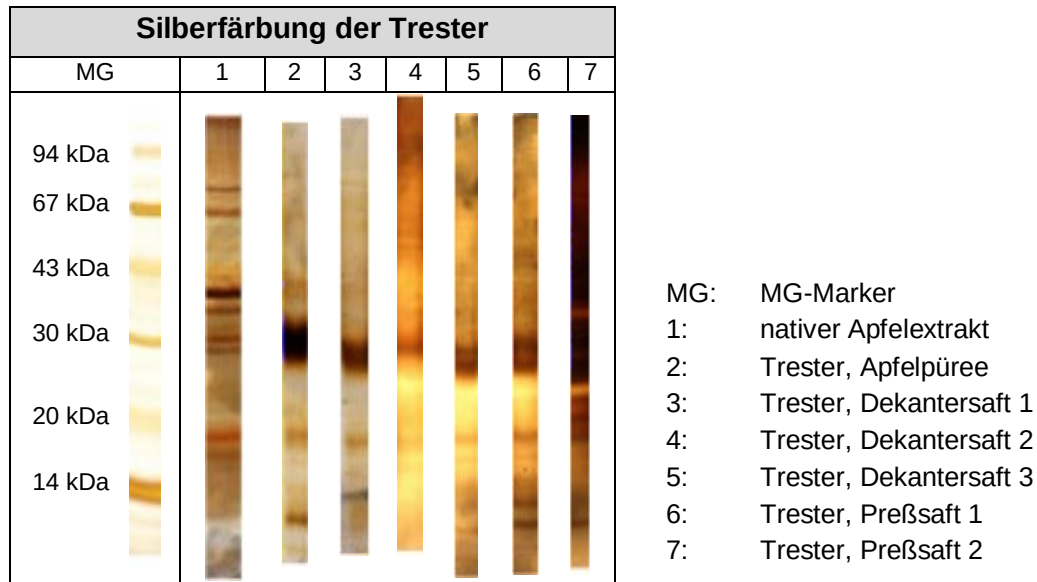


Abb. 4.22: Gesamtproteinmuster der Extrakte der Trester

In allen sieben Extrakten wird die 18 kDa Proteinbande detektiert, allerdings etwas schwächer als im nativen Apfelextrakt. Außerdem ist im Bereich von 30 kDa eine sehr breite Bande zu erkennen. Diese Bande ist auch im Gesamtproteinmuster der Apfelmischen zu sehen (vgl. Abb. 4.18). Die 43 kDa-Bande wird nur in den Extrakten 2 und 3 detektiert. Banden im höheren MG-Bereich werden bei keinem Extrakt eindeutig visualisiert.

Ein Immunoblot der aus den Trestern gewonnenen Proteinextrakte ist in Abbildung 4.23 dargestellt. Die immunologische Detektion erfolgt mit einem Poolserum (vgl. 7.11). Das im nativen Apfelextrakt sehr intensiv detektierte 18 kDa Hauptallergen wird in den Extrakten der Trester des Apfelpürees (2), des Dekantersaftes 3 (5) und des Preßsaftes 2 (7) nur noch sehr schwach und in den übrigen Extrakten gar nicht mehr detektiert. Minorallergene im oberen MG-Bereich sind in den untersuchten Extrakten sehr gut zu erkennen. Unspezifische Bindungen konnten mit einer Negativkontrolle ausgeschlossen werden.

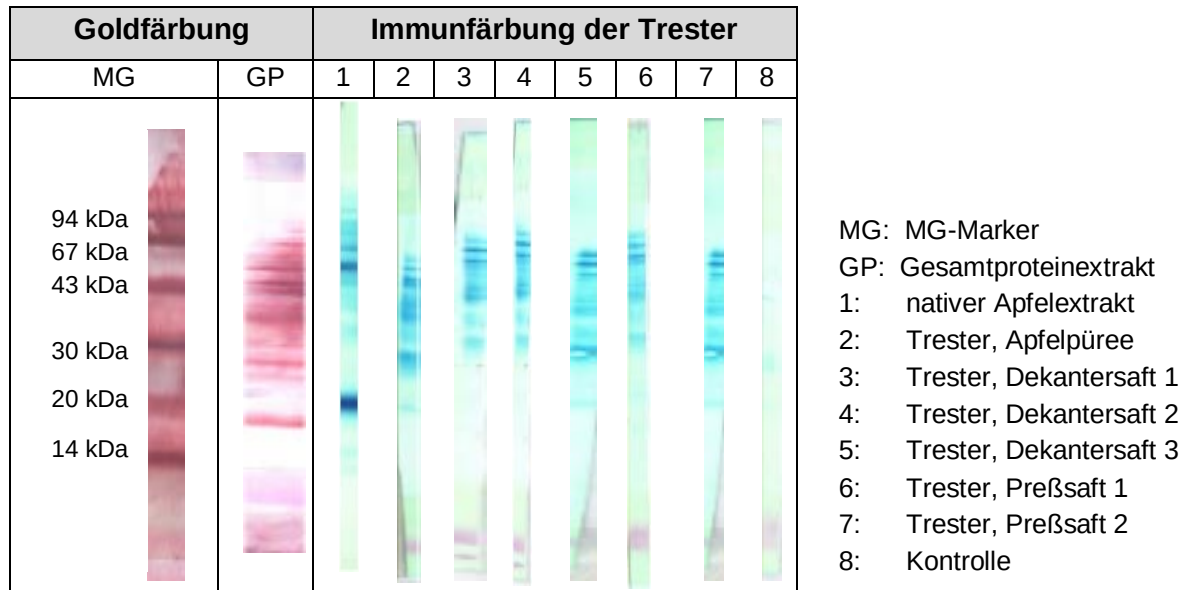


Abb. 4.23: Immunoblot der Extrakte der Trester

Zur relativen Quantifizierung des allergenen Potentials der Trester wurde eine EAST-Inhibition durchgeführt. Die verschiedenen Extrakte zeigen, wie aus Abbildung 4.24 hervorgeht, einen ähnlichen Kurvenverlauf. Eine Aussage über die Veränderung der Allergenität der Extrakte kann durch Vergleich der C_{50} -Werte getroffen werden. Diese schwanken bei den Tresterextrakten zwischen 5.2 mg/L (Preßsaft 2) und 48 mg/L (Preßsaft 1), während der C_{50} -Wert des nativen Apfelextraktes bei 1.7 mg/L liegt (vgl. Anhang 7.13). Die höheren C_{50} -Werte bestätigten auch das Ergebnis des Immunoblots (vgl. Abb. 4.23). Verglichen mit dem allergenen Potential der Maischen zeigt sich bei der EAST-Inhibition der Trester eine Abnahme der Allergenität. Darüber hinaus ist das allergene Potential der Trester geringer als das der Rohware.

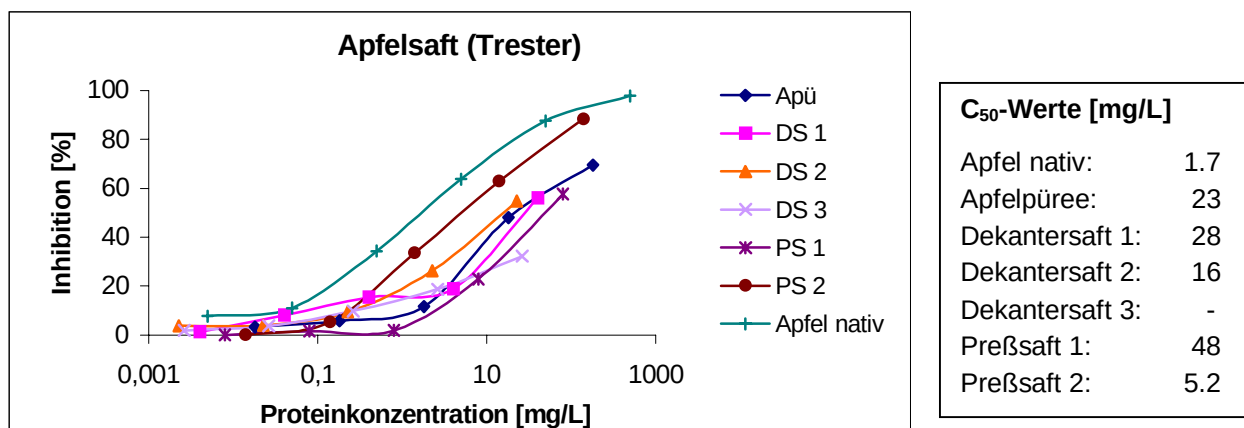


Abb. 4.24: EAST-Inhibitionsgraphen der Trester

4.2.2.3 Untersuchung der Rohprodukte

Abbildung 4.25 stellt eine Silberfärbung der aus den Rohsäften bzw. dem Feinmus gewonnenen und mittels SDS-PAGE getrennten Proteinextrakte dar. In den Rohprodukten werden nur noch vereinzelt Proteinbanden detektiert. Lediglich im oberen MG-Bereich sind in den Extrakten aus dem Apfelpüree (2) sowie den Dekantersäften 1 (3) und 2 (4) sehr schwach zwei Banden bei 43 kDa und ca. 67 kDa zu sehen. Wie auch in den zuvor untersuchten Zwischenstufen der Apfelsaftgewinnung, wird zusätzlich eine sehr breite Bande bei ca. 30 kDa visualisiert.

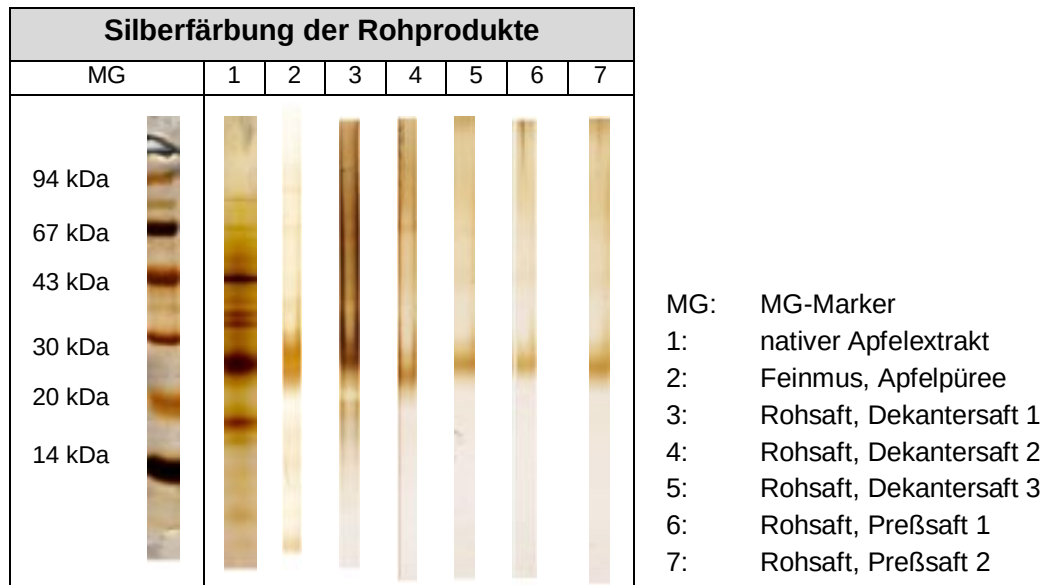


Abb. 4.25: Gesamtproteinmuster der Extrakte der Rohprodukte

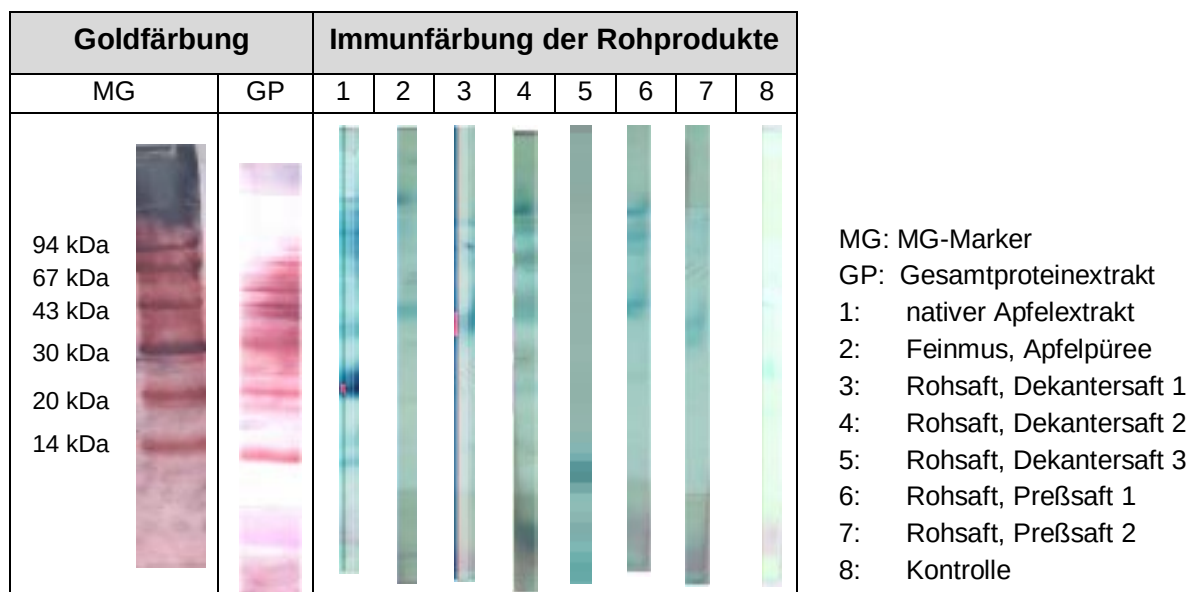


Abb. 4.26: Immunoblot der Extrakte der Rohprodukte

Um eine Aussage über das allergene Potential der Rohprodukte treffen zu können, wurden die Extrakte wiederum im Immunoblot unter Verwendung eines Poolserums (vgl. 7.11) untersucht. Abbildung 4.26 zeigt das Ergebnis dieses Immunoblots. Die 18 kDa-Allergenbande wird auf keinem der Blotstreifen detektiert. Nur im oberen MG-Bereich, zwischen 37 kDa und 67 kDa, sind sehr schwache Banden zu erkennen. Unspezifische Bindungen können mit einer Negativkontrolle ausgeschlossen werden.

Es besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen den aus den Rohsäften gewonnenen Proteinextrakten und denen aus Maischen und Trestern. Während bei den Maischen- und Trestereextrakten die Proteine direkt aus dem nach der Tieftemperaturextraktion gewonnenen Acetonpulvern extrahiert wurden, wurden die fluiden Produkte, wie Rohsäfte, aber auch die Endsäfte, zunächst gefriergetrocknet. Die Proteinextraktion erfolgt dann aus dem Lyophilisat. Demnach erfolgt bei den fluiden Produkten ein zusätzlicher Konzentrierungsschritt. Diese Konzentrierung ist notwendig, um Extrakte mit ähnlichen Proteingehalten wie bei den festen oder halbfesten Zwischenstufen zu erreichen.

Zur relativen Quantifizierung des allergenen Potentials der Rohprodukte wurde wiederum eine EAST-Inhibition durchgeführt. Dabei ergaben sich für die Rohprodukte C_{50} -Werte, die zwischen 7.9 mg/L beim Preßsaft 1 und 55 mg/L beim Dekanteraft 2 variieren. Diese liegen damit deutlich höher als bei den Maischeextrakten (C_{50} -Werte von 2.4 mg/L ohne Ascorbinsäurezugabe und 0.99 mg/L mit Ascorbinsäurezugabe bei 0 h Standzeit). Der Kurvenverlauf ist bei den hier untersuchten Proteinextrakten untereinander vergleichbar. Eine Ausnahme bildet der Extrakt des Preßsaftes 2, was sich im steileren Kurvenverlauf und im geringen C_{50} -Wert von 7.9 mg/L zeigt (vgl. Anhang 7.13). Es ist also von einer geringen Restallergenität der Rohprodukte auszugehen, welche sich wahrscheinlich auf die im Immunoblot noch nachweisbaren Minorallergene zurückführen läßt.

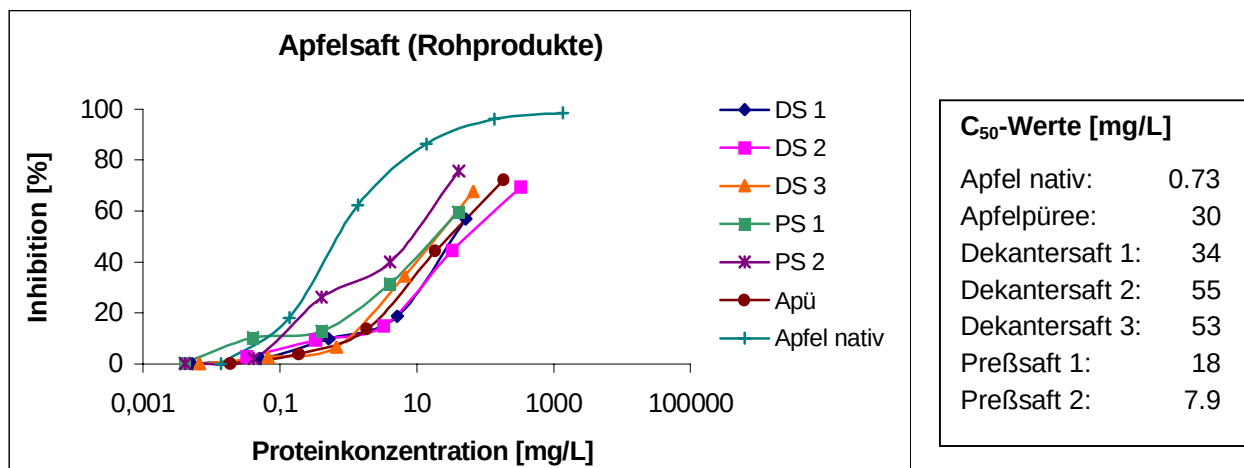


Abb. 4.27: EAST-Inhibitionsgraphen der Rohprodukte

4.2.2.4 Untersuchung der Endprodukte

Die Gewinnung, Trennung und Visualisierung der Proteinextrakte aus den Endprodukten erfolgt analog zu den Rohsäften. Wie aus der in Abbildung 4.28 dargestellten Silberfärbung deutlich wird, wird in allen Extrakten (2-7) lediglich eine breite Proteinbande bei 30 kDa detektiert. Diese ist in den Extrakten der Dekantersäfte 2 und 3 nur sehr schwach erkennbar.

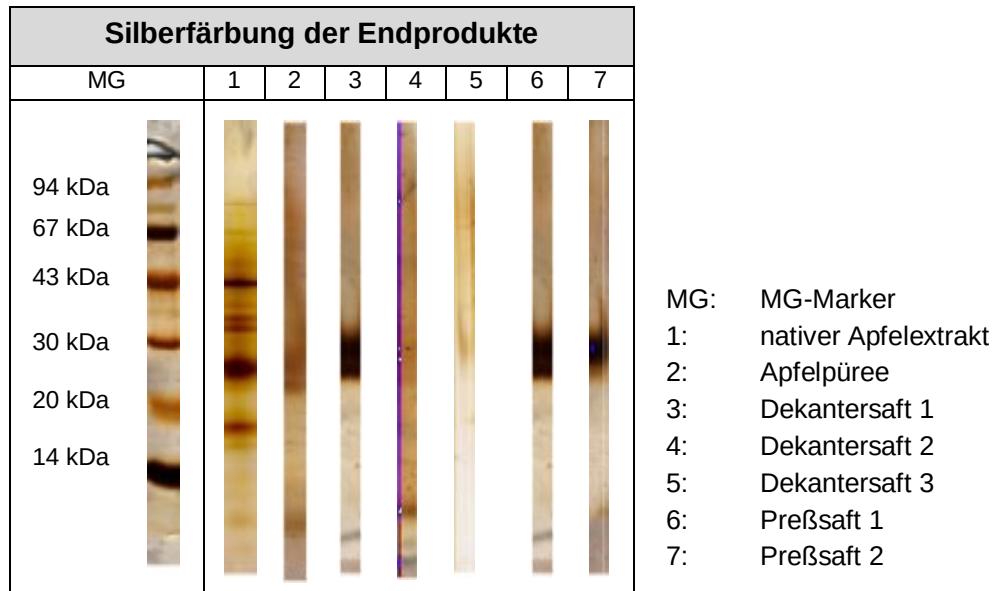


Abb. 4.28: Gesamtproteinmuster der Extrakte der Endprodukte

Die Proteinextrakte der Endprodukte wurden zum einen mit einem Poolserum (vgl. 7.11) und zum anderen mit Einzelseren von fünf verschiedenen Patienten (PK, TB, KK, UW und IK) inkubiert und anschließend immungefärbt. Mit keinem der Seren konnten im Immunoblot Banden nachgewiesen werden (Abbildung nicht dargestellt).

Um eine weitere Aussage über das allergene Potential der Extrakte treffen zu können, wurde eine Immunoblot-Inhibition durchgeführt. Die Proteinkonzentration des elektrophoretisch getrennten nativen Extraktes liegt bei 262 mg/L. Die Proteinkonzentrationen der Inhibitor-extrakte wurden zwischen 40 und 75 mg/L eingestellt und sind in der Legende der Abbildung 4.29 aufgeführt. Es wird außerdem eine homologe Immunoblot-Inhibition mit einem unterschiedlich konzentrierten nativen Apfelextrakt durchgeführt. Abbildung 4.29 zeigt die Immunoblot-Inhibition der in der UH hergestellten Apfelendprodukte.

Es läßt sich deutlich erkennen, daß die höchstkonzentrierte Inhibitorlösung des nativen Apfelextraktes (4) mit einem Proteingehalt von 248 mg/L, eine fast vollständige Inhibition der Allergenbanden des elektrophoretisch getrennten ebenfalls nativen Apfelextraktes erzielt. Es sind nur noch zwei Banden im Bereich von 43 kDa zu sehen, die 18 kDa-Bande wird dagegen kaum detektiert. Bei einer Proteinkonzentration des Inhibitors von 70 mg/L (5) sind diese Banden ebenfalls zu erkennen. Darüber hinaus wird hier die 18 kDa-Bande sehr schwach detektiert. Bei einer Apfelproteinkonzentration von 33 mg/L (6) als Inhibitor wird das 18 kDa Hauptallergen des Apfels deutlich detektiert. Allerdings ist die Intensität der Bande hierbei viel schwächer, als sie es beim nativen Apfelextrakt ohne Inhibitorlösung ist.

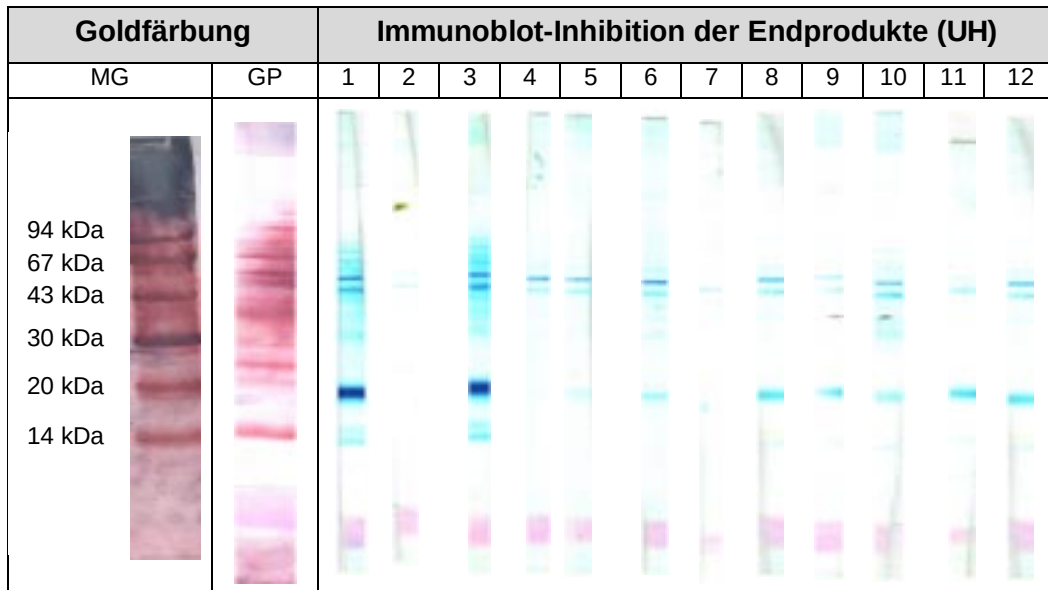


Abb. 4.29: Immunoblot-Inhibition der Endprodukte

MG: MG-Marker; GP: Gesamtproteinmuster des Apfels, 1: Apfel nativ (Ohne Inhibitor), 2: Kontrolle, 3: unspezifische Inhibition (Ovalbumin, 1000 mg/L), 4: Apfel 1 (248 mg/L), 5: Apfel 2 (70 mg/L), 6: Apfel 3 (33 mg/L), 7: Apfelpüree (61 mg/L), 8: Dekanteraft 1 (41 mg/L), 9: Dekanteraft 2 (76 mg/L), 10: Dekanteraft 3 (80 mg/L), 11: Preßsaft 1 (64 mg/L), 12: Preßsaft 2 (59 mg/L)

Es ist erkennbar, daß bei jedem der untersuchten Produkte noch sehr deutlich die 18 kDa-Bande visualisiert wird. Mit den Extrakten der Fertigprodukte 8-12 als Inhibitoren wird das Hauptallergen des Apfels mit einer deutlich stärkeren Intensität als bei der Inhibition mit den nativen Apfelextrakten 4-6 detektiert. Die Extrakte 8-12 zeigen also keine Inhibition. Eine Ausnahme bildet der Extrakt des Apfelpürees, welcher eine fast vollständige Inhibition des 18 kDa-Allergens bewirkt. Die unspezifische Inhibition mit Ovalbumin-Lösung (3) zeigt keine Änderung der Bandenintensität im Vergleich zum nativen Apfelextrakt ohne Inhibitorlösung (1). Bei der Negativkontrolle mit einem Kontrollserum (2) werden keine Banden detektiert.

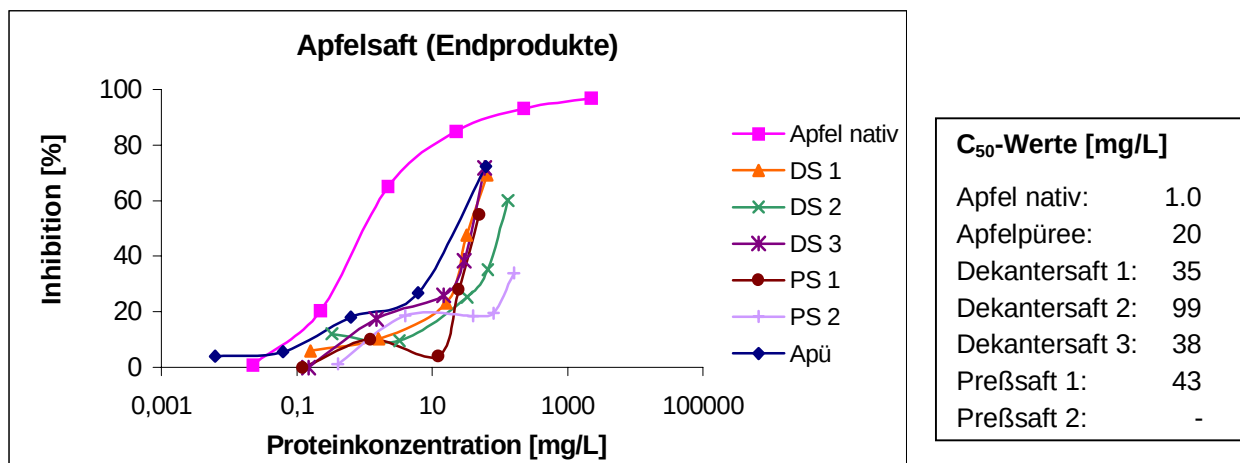


Abb. 4.30: EAST-Inhibitionsgraphen der Endprodukte

Die Ergebnisse einer zur relativen Quantifizierung des allergenen Potentials der Endprodukte durchgeführten EAST-Inhibition sind in Abbildung 4.30 dargestellt. Es zeigt sich eine Reduzierung des allergenen Potentials in den erhitzten Endprodukten. Während bei der Inhibition mit Preßsaft 2 keine 50 %ige Inhibition mehr erreicht wird, variieren die C_{50} -Werte der übrigen Endprodukte zwischen 20 mg/L beim Apfelpüree und 99 mg/L beim Dekantersaft 2 (vgl. Anhang 7.13).

4.2.3 Untersuchung des allergenen Potentials eines Warenkorbs

Im Rahmen einer Warenkorbuntersuchung wurde das allergene Potential ausgewählter Apfelprodukte aus dem Handel bestimmt. Die untersuchten Produkte sind in Kapitel 7.12 des Anhangs aufgeführt. Die Proteinextrakte werden wie unter 7.2 beschrieben hergestellt. Bei Produkten, die bereits einer Wärmebehandlung unterzogen wurden und ohnehin bei Raumtemperatur gelagert werden, wurde auf eine Tieftemperaturextraktion verzichtet. Diese Produkte wurden zunächst gefriergetrocknet, um direkt aus dem Lyophilisat mit PBS die Proteinextrakte zu gewinnen. Die Apfelchips und Apfelringe wurden zunächst eingefroren, zermört und danach mit PBS extrahiert. Abbildung 4.31 zeigt die unpezifische Silberfärbung der Proteinextrakte aller untersuchten Warenkorbprodukte.

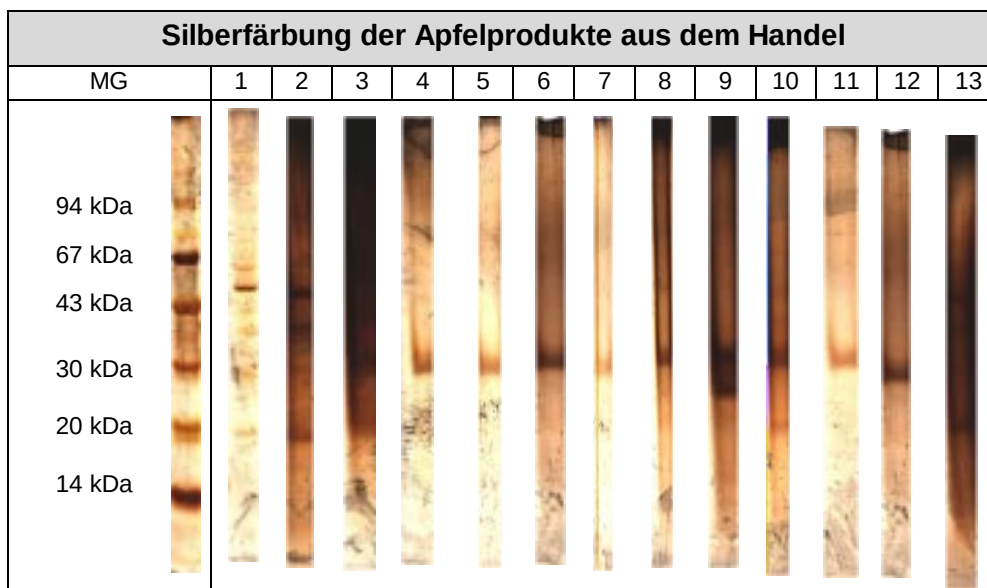


Abb. 4.31: Gesamtproteinmuster der Warenkorbprodukte

MG: MG-Marker, 1: nativer Apfelextrakt, 2: Apfelringe, 3: Apfel Chips, 4: Apfelkonfitüre, 5: Fruchtaufstrich, 6: Apfelessig, 7: Apfelsaft (klar), 8: Apfelsaft (naturtrüb), 9: Direktsaft, 10: Apfelkompott mit Stückchen, 11: Baby-Apfelsaft, 12: Apfelkompott (Baby-Apfel), 13: Apfelmus

Bei den Apfelringen (2), den Apfel Chips (3), dem Apfelkompott mit Stückchen (10) und dem Apfelmus (13) ist die 18 kDa-Bande sehr schwach zu erkennen. Bei den Apfelringen wird die 43 kDa-Bande ebenfalls schwach detektiert. Bei allen untersuchten Produkten ist eine breite nicht im Proteinmuster des nativen Apfelextraktes detektierte Bande im Bereich von 30 kDa erkennbar.

Um eine Aussage über die Allergenität der untersuchten Extrakte treffen zu können, wurde ein Immunoblot unter Verwendung eines Poolserums durchgeführt, welcher in Abbildung 4.32 dargestellt ist. Im Immunoblot ist das 18 kDa-Hauptallergen bei den Proteinextrakten der Apfelringe, des Apfelkompotts (Baby-Apfel), der Apfel Chips sowie beim Apfelkompott mit Stückchen und dem Apfelmus deutlich zu erkennen (2-6). Die Streifen 2 und 3 weisen zusätzlich bei 43 kDa eine schwach detektierte Bande auf. Die Proteinextrakte des Direktsaftes (9) und des naturtrüben Saftes (10) zeigen eine sehr schwach gefärbte Bande bei 18 kDa. Die weiteren untersuchten Produkte sowie die Negativkontrolle zeigen dagegen keine IgE-bindenden Proteine.

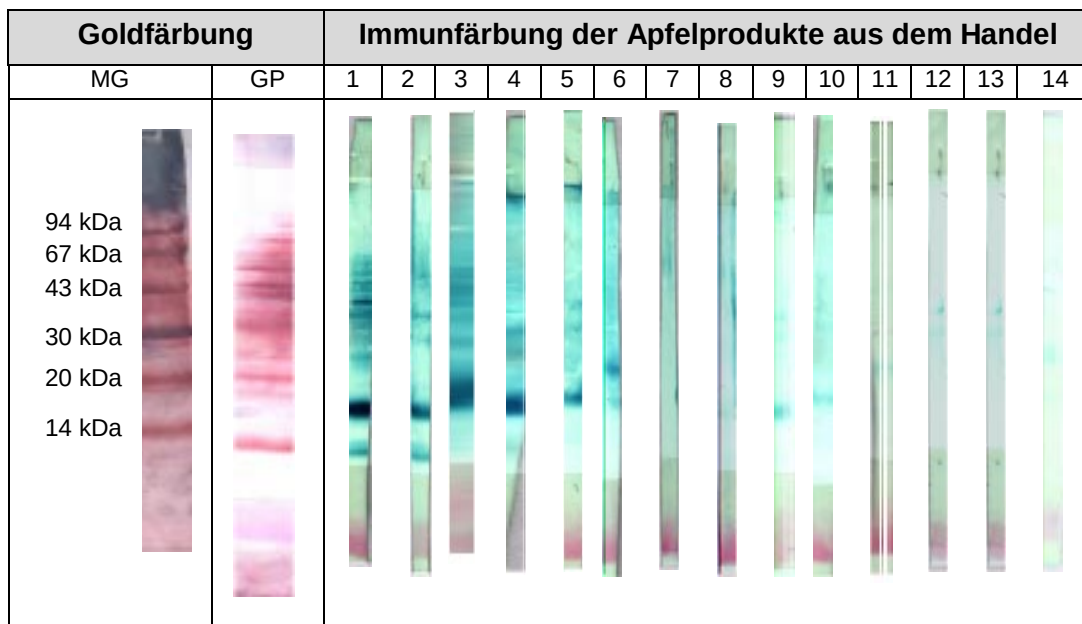


Abb. 4.32: Immunoblot der Warenkorbprodukte

MG: MG-Marker, GP: Gesamtproteinmuster des Apfels, 1: nativer Apfelextrakt, 2: Apfelringe, 3: Apfelkompott (Baby-Apfel), 4: Apfel-Chips, 5: Apfelkompott mit Stückchen, 6: Apfelmus, 7: Baby-Apfelsaft, 8: Apfelsaft (klar), 9: Direktsaft, 10: Apfelsaft (naturtrüb), 11: Apelessig, 12: Fruchtaufstrich, 13: Apfelkonfitüre, 14: Kontrolle

Um weitere Rückschlüsse auf eine eventuell noch vorhandene Restallergenität der Warenkorbprodukte ziehen zu können, wurde eine Immunoblot-Inhibition durchgeführt. Die in Abbildung 4.33 dargestellten Ergebnisse bestätigen die der Immunfärbung. So zeigt sich, daß die Extrakte der Apfelringe (7), des Apfelkompotts (Baby Apfel) (8) sowie der Apfel Chips (9) eine fast vollständige Inhibition der 18 kDa-Bande erreichen. Die Extrakte der Apfelkonfitüre (18), des Fruchtaufstriches (17), des Apelessigs (16), des klaren Apfelsaftes (15), des Baby-Apfelsaftes (12) sowie des naturtrüben Apfelsaftes (13) zeigen keine Schwächung der Bandenintensität. Dieses Ergebnis bestätigt auch das Fehlen IgE-bindender Proteine im Immunoblot bei diesen Produkten (vgl. Abb. 4.32). Die weiteren untersuchten Produkte zeigen eine geringe aber nicht vollständige Schwächung der 18 kDa-Bande. Die 43 kDa-Bande wird von keinem der untersuchten Extrakte inhibiert. Die Negativkontrolle zeigt keine allergenen Banden.

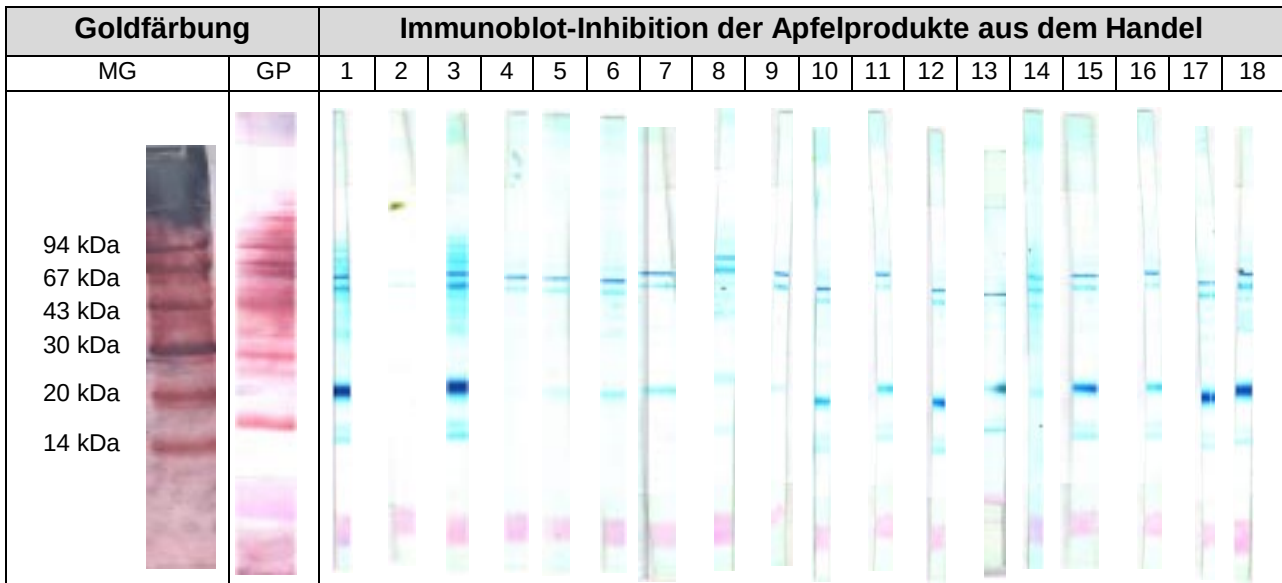


Abb. 4.33: Immunoblot-Inhibition der Warenkorbprodukte

MG: MG-Marker, GP: Gesamtproteinmuster des Apfels, 1: Apfel nativ (ohne Inhibitor), 2: Kontrolle, 3: unspezifische Inhibition (Ovalbumin, 1000 mg/L), 4: Apfel 1 (248 mg/L), 5: Apfel 2 (70 mg/L), 6: Apfel 3 (33 mg/L), 7: Apfelringe (66 mg/L), 8: Apfelkompott (Baby-Apfel) (66 mg/L), 9: Apfel-Chips (89 mg/L), 10: Apfelkompott mit Stückchen (60 mg/L), 11: Apfelmus (97 mg/L), 12: Baby-Apfelsaft (41 mg/L), 13: Apfelsaft (naturtrüb) (52 mg/L), 14: Direktsaft (76 mg/L), 15: Apfelsaft (klar) (15 mg/L), 16: Apfelessig (81 mg/L), 17: Fruchtaufstrich (23 mg/L), 18: Apfelkonfitüre (73 mg/L)

Auch bei den Warenkorbprodukten erfolgte eine relative Quantifizierung der Allergenität mit Hilfe der EAST-Inhibition. Für die graphische Darstellung wurden die Produkte in zwei Gruppen unterteilt. In Abbildung 4.34 sind die Produkte, bei denen aufgrund der bereits im Immunoblot und in der Immunoblot-Inhibition erzielten Ergebnisse mit einer Restallergenität zu rechnen ist, dargestellt. Produkte, bei denen kein allergenes Potential mehr zu erwarten ist, zeigt Abbildung 4.35.

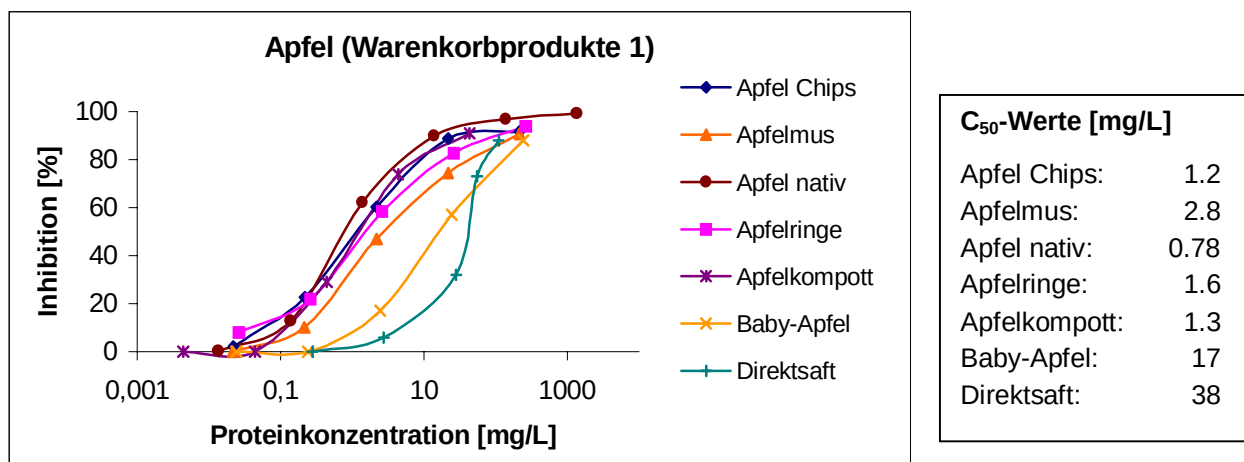


Abb. 4.34: EAST-Inhibitionsgraphen Warenkorbprodukte 1

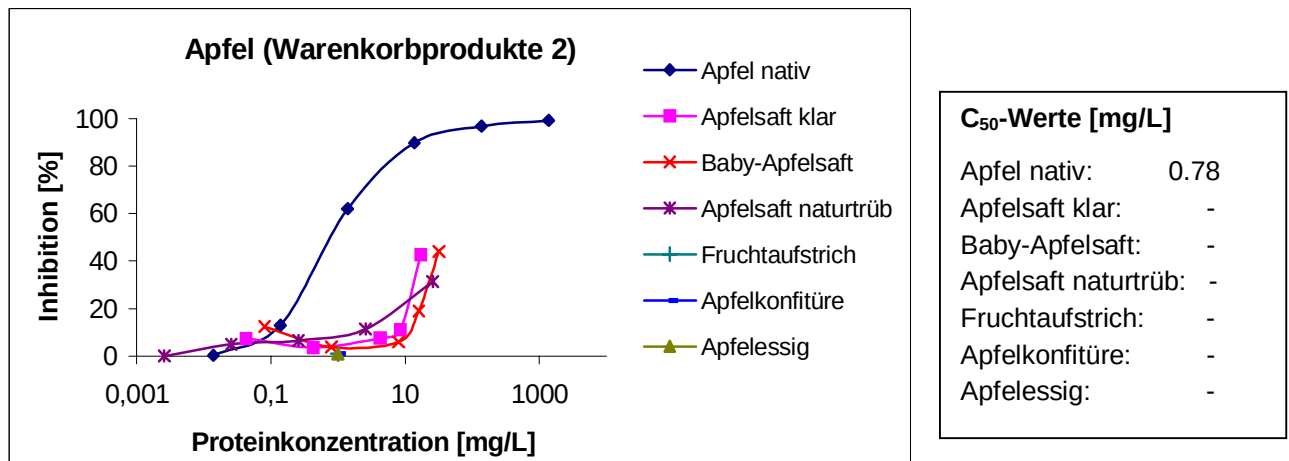


Abb. 4.35: EAST-Inhibitionsgraphen Warenkorbprodukte 2

Mit Hilfe der EAST-Inhibition werden die zuvor durch Immunoblot und Immunoblot-Inhibition erzielten Ergebnisse bestätigt. So kann man aus den C₅₀-Werten erkennen, daß die Apfelnringe (C₅₀ = 1.6 mg/L), das Apfelmus (C₅₀ = 2.8 mg/L), das Apfelkompott mit Stückchen (C₅₀ = 1.3 mg/L) und die Apfel Chips (1.2 mg/L) ein recht hohes allergenes Potential aufweisen (Abbildung 4.34). Die Inhibitionskurven dieser Produkte verlaufen nahezu deckungsgleich mit der Kurve der homologen Inhibition. Dagegen ergibt sich für den Proteinextrakt aus dem Apfelkompott (Baby-Apfel) eine Erhöhung des C₅₀-Wertes auf 17 mg/L. Als einziger Saft erzeugt der Direktsaft bei einer Proteinkonzentration von 38 mg/L noch eine 50%ige Inhibition der an die Celullosescheiben gekoppelten Apfelallergene. Mit den Extrakten aus den weiteren untersuchten Produkten wird keine 50 %ige Inhibition erreicht (Abbildung 4.35), was auf ein deutlich vermindertes allergenes Potential dieser Produkte hindeutet (vgl. Anhang 7.13).

4.3 Untersuchungen zur Karotte

4.3.1 Charakterisierung der Karottenallergene

Zur Charakterisierung der Karottenallergene wurden die Proteine der Karottensorte *Karotan* mittels SDS-PAGE getrennt, auf eine NC-Membran transferiert und anschließend immungefärbt. Zusätzlich wurden der MG-Marker und der Karottenextrakt unspezifisch mit kolloidaler Goldlösung gefärbt.

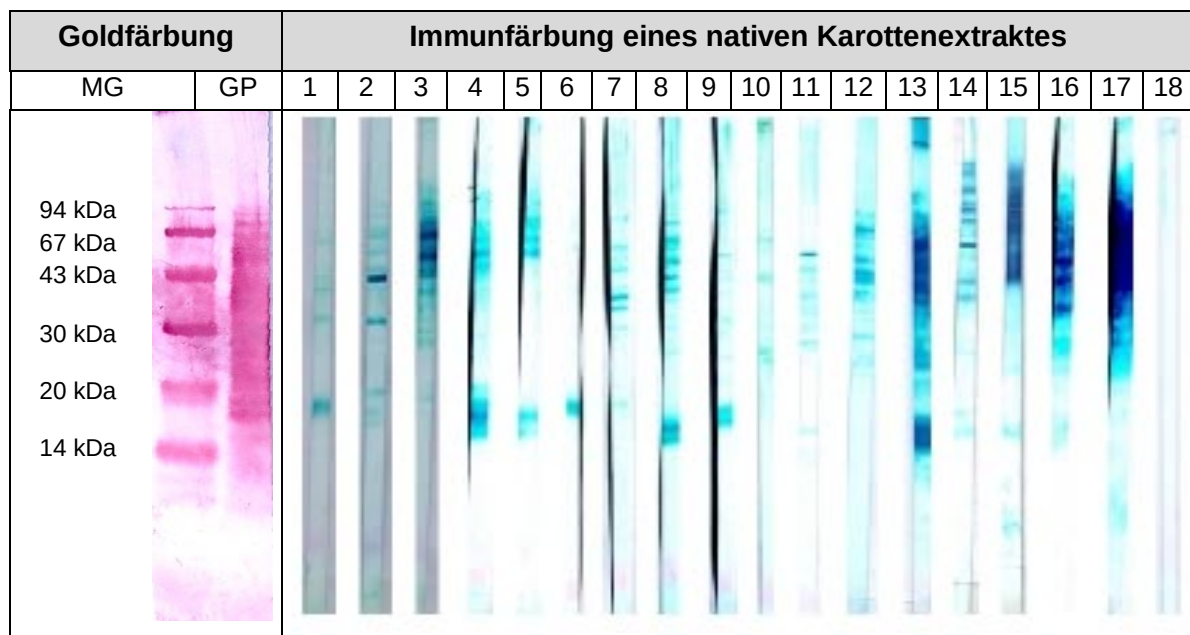


Abb. 4.36: Immunoblot eines Karottenextraktes der Sorte *Karotan*

MG: MG-Marker, GP: Gesamtproteinextrakt, 1: BD, 2: GB, 3: SK, 4: DS, 5: RD, 6: UK, 7: LB, 8: LS, 9: HS, 10: MF, 11: CG, 12: PK, 13: FR, 14: CF, 15: UWö, 16: SW, 17: KDH, 18: Kontrolle

Abbildung 4.36 zeigt den Immunoblot eines Karottenextraktes unter Verwendung von 17 Einzelseren gegen Karotten sensibilisierter Patienten. Mit Ausnahme der Seren 3, 7, 10, 11, 12 und 17 zeigen alle Seren eine positive Detektion des Hauptallergens Dau c 1 mit einem MG von 17 kDa. Des weiteren detektieren alle Seren ausgenommen des Serums von Patient 6 diverse, nicht genauer zuzuordnende Allergenbanden im MG-Bereich von 25 kDa bis etwa 100 kDa. Während die Seren 1, 9 und 10 die Allergene dieses MG-Bereichs nur sehr schwach visualisieren, zeigen besonders die Seren 13, 15, 16 und 17 eine sehr starke Immunfärbung dieser IgE-bindenden Proteine. Unspezifische Bindungen können ausgeschlossen werden, da in der mit dem Serum eines Nichtallergikers durchgeführten Kontrolle keine Allergenbanden detektiert werden.

4.3.2 Einfluß der Erhitzung auf die Allergenität der Karotte

Die Untersuchung des Einflusses der Erhitzung auf das allergene Potential der Karotten erfolgte exemplarisch anhand zweier unterschiedlicher Erhitzungsverfahren. Zum einen wurde eine Erhitzung von Karottenstücken im Kochwasser bei 100 °C durchgeführt und zum anderen eine Erhitzung im Autoklaven bei 121 °C und 1 bar Überdruck. Bei beiden Prozessen wurde die Erhitzungsdauer von 10 min bis 40 min variiert. Die Untersuchungen erfolgten mit der Karottensorte *Berlikumer*. Eine Auswahl von silbergefärbten Proteinextrakten der erhitzten Karotten zeigt Abbildung 4.37.

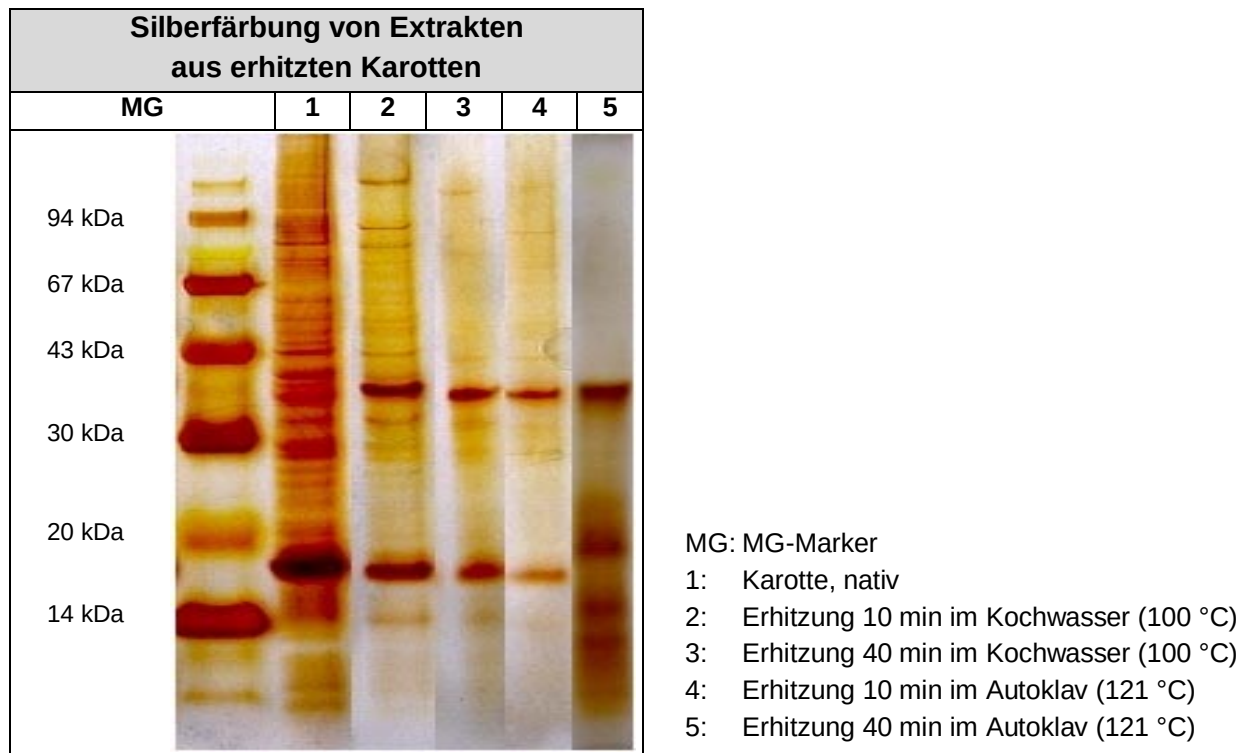


Abb. 4.37: Gesamtproteinmuster der Extrakte erhitzter Karotten

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Extrakte aus den erhitzten Karotten unterscheiden sich in ihren Bandenmustern deutlich vom nativen Proteinextrakt. Dieser zeigt zahlreiche Proteinbanden im MG-Bereich von < 14 kDa bis 90 kDa. Eine besonders intensive Bande ist im Bereich von etwa 18 kDa zu erkennen. Während die Intensität der meisten Proteinbanden mit zunehmender Dauer des Erhitzungsprozesses abnimmt, ist in der Silberfärbung der erhitzten Extrakte deutlich eine Proteinbande bei etwa 35 kDa zu erkennen, die im nativen Karottenextrakt wesentlich schwächer detektiert wird. Die Intensität dieser Bande nimmt auch bei zunehmender Erhitzungsdauer weder nach dem Kochen noch nach dem Autoklavieren ab. Der aus den 40 min autoklavierten Karotten erhaltene Proteinextrakt zeigt außerdem etwas diffuse Banden im MG-Bereich < 20 kDa.

Die Ergebnisse einer SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblot zeigt Abbildung 4.38. Die Blotstreifen werden mit einem Poolserum sowie dem Serum einer nichtsensibilisierten Person als Negativkontrolle inkubiert. Eine Charakterisierung der Allergenbanden hinsichtlich ihres MG erfolgt wiederum anhand eines MG-Markers.

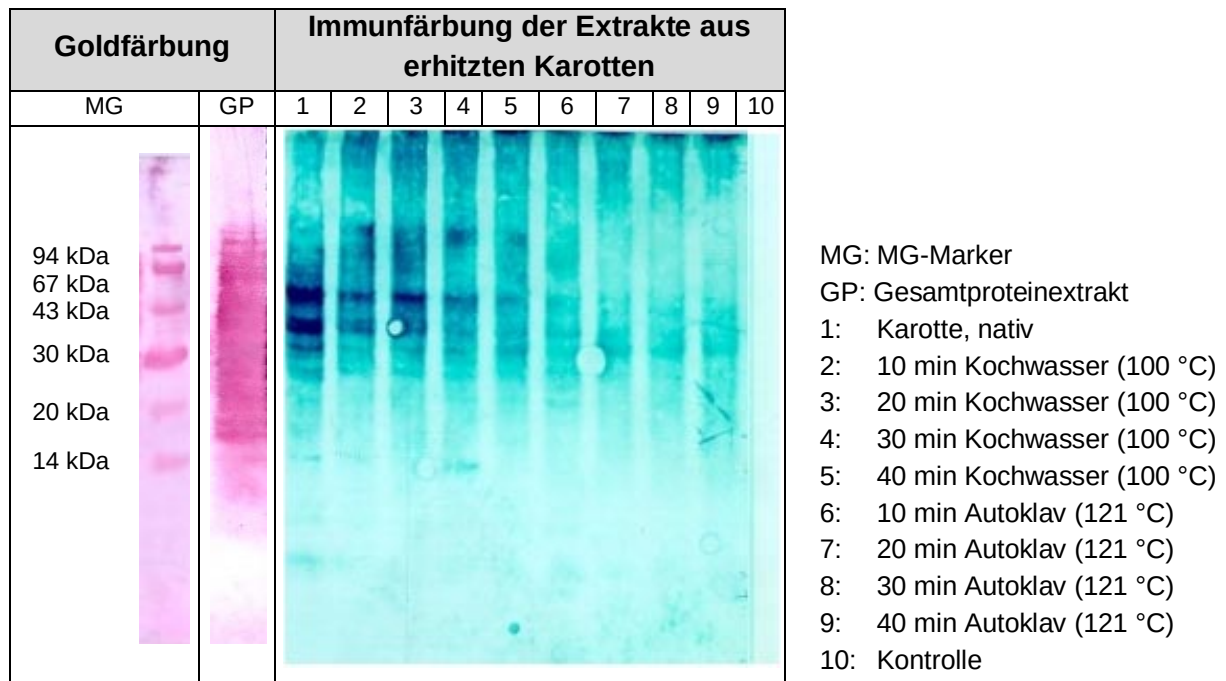


Abb. 4.40: Immunoblot der Extrakte unterschiedlich erhitzter Karotten

Es wird deutlich, daß die Extrakte der auf 100 °C im Kochwasser erhitzten Karotten ein dem nativen, nicht erhitzten Referenzmaterial ähnliches Allergenmuster zeigen. Eine Schwächung der Intensität der Allergenbanden ist erst in dem nach 40 min Kochdauer erhaltenen Extrakt zu beobachten. Die nach dem Autoklavieren der Karotten gewonnenen Proteinextrakte weisen im Immunoblot ebenfalls ein mit dem nativen Extrakt vergleichbares Bandenmuster auf. Die Intensität der Banden ist jedoch in allen 4 Extrakten deutlich schwächer, obwohl die Proteingehalte der Extrakte kaum variieren (vgl. Anhang 7.12.3). Dennoch ist auch nach dem Autoklavieren im Immunoblot ein allergenes Restpotential nachweisbar.

Abbildung 4.39 und 4.40 zeigen die Ergebnisse einer mit den erhitzten Karottenchargen durchgeführten EAST-Inhibition unter Verwendung eines aus 16 Patientenseren zusammengesetzten Poolserums (vgl. 7.11). An die Festphase sind wiederum die Proteine der Karottensorte *Berlikumer* gekoppelt. Aus Abbildung 4.39 wird deutlich, daß die Inhibitionsgraphen der unterschiedlich lange bei 100 °C im Kochwasser erhitzten Karotten einen nahezu identischen Verlauf aufweisen und sich auch vom Graphen des nativen, an die Festphase gekoppelten Extraktes (homologe Inhibition) kaum unterscheiden. Entsprechend variieren auch die C_{50} -Werte nur unwesentlich zwischen 12 mg/L bei den 20 min erhitzten Karotten und 34 mg/L bei der homologen Inhibition (vgl. Anhang 7.13). Offensichtlich hat eine Erhitzung der Karotten auf 100 °C unabhängig von einer Erhitzungsdauer bis zu 40 min keinen Einfluß auf das allergene Potential.

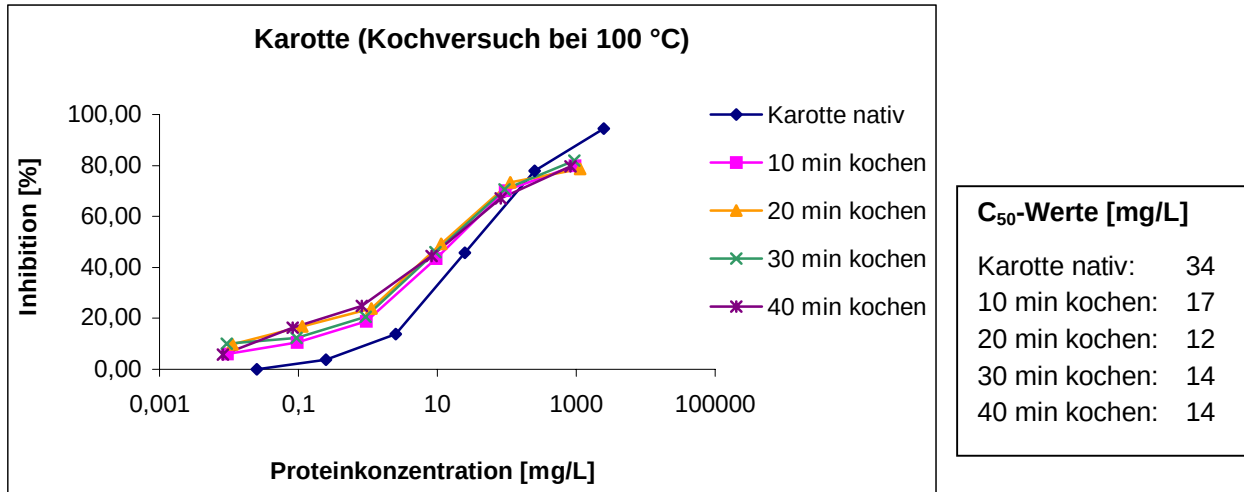


Abb. 4.39: EAST-Inhibitionsgraphen erhitzter Karotten (Kochen, 100 °C)

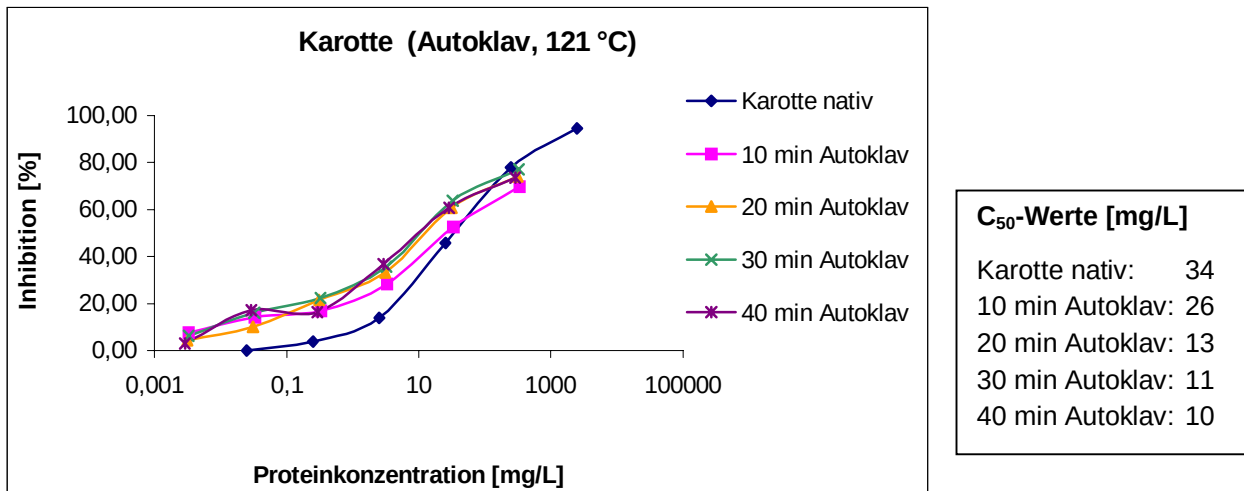


Abb. 4.40: EAST-Inhibitionsgraphen erhitzter Karotten (Autoklav, 121 °C)

Ein ähnliches Ergebnis zeigt die graphische Darstellung der Inhibitionsgraphen der bei 121 °C im Autoklaven behandelten Karotten (Abbildung 4.40). Auch hier unterscheiden sich die Kurvenverläufe für die Extrakte nach unterschiedlich langer Erhitzungsdauer nur unwesentlich voneinander und von der homologen Inhibition. Der C₅₀-Wert für die 40 min autoklavierten Karotten liegt mit 10 mg/L niedriger als in der homologen Inhibition (34 mg/L). Es zeigt sich also anhand der EAST-Inhibitionsversuche keine Abnahme des allergenen Potentials der untersuchten Karotten bei den angewandten Erhitzungsbedingungen (vgl. Anhang 7.13). Die mittels EAST-Inhibition erzielten Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen aus dem Immunoblot weitgehend überein.

4.3.3 Untersuchung des allergenen Potentials fluiden Karottenprodukte

Die Untersuchung des allergenen Potentials fluiden Karottenprodukte erfolgte anhand von fünf Karottensäften (A bis E), welche im Institut für Lebensmitteltechnologie der UH hergestellt wurden. Dabei wurden, analog den fluiden Apfelprodukten, von den Zwischen- und Endprodukten (vgl. 2.4.1) Proteinextrakte hergestellt, die auf ihr allergenes Potential untersucht wurden. Wiederum erfolgte neben der Visualisierung des Gesamtproteinmusters mittels Silberfärbung die Prüfung auf die Allergenität der Extrakte mittels Immunoblot und EAST-Inhibition unter Verwendung eines Poolserums.

4.3.3.1 Untersuchung der Karottensäfte A (ungesäuerter, tyndallisierter Saft) und B (ungesäuerter, sterilisierter Saft)

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Zwischenstufen zweier ungesäuerter Karottensäfte. Im Fall von Saft A wurde der gewonnene Rohsaft einer dreifachen Pasteurisation unterzogen, während bei Saft B eine Sterilisation des Rohproduktes erfolgte. Abbildung 4.41 zeigt die mittels Silberfärbung detektierten Gesamtproteinmuster der aus sämtlichen Zwischenstufen hergestellten Proteinextrakte sowie des nativen Karottenextraktes.

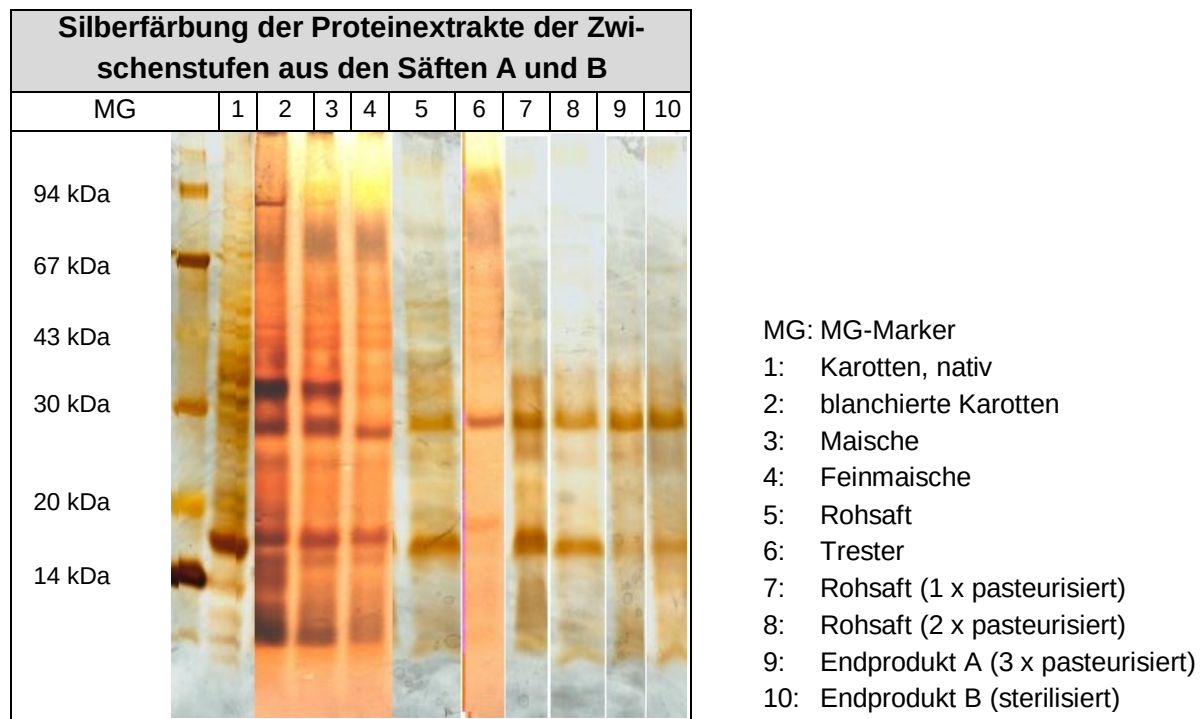


Abb. 4.41: Gesamtproteinmuster der Extrakte der Verarbeitungsstufen der Karottensäfte A und B

Die mittels SDS-PAGE getrennten Extrakte aus den Zwischenstufen und Endprodukten der Karottensäfte unterscheiden sich in ihren Bandenmustern vom nativen Proteinextrakt. Während die Intensität der meisten Proteinbanden mit zunehmendem Verarbeitungsgrad abnimmt, ist eine deutliche Zunahme der Intensität einer Proteinbande bei etwa 27 kDa zu er-

kennen, die im nativen Karottenextrakt wesentlich schwächer detektiert wird. Die Extrakte aus den blanchierten Karotten und der Maische zeigen zusätzlich eine Bande bei etwa 35 kDa, die im nativen Extrakt nicht detektiert wird. In den Extrakten aus den blanchierten Karotten, der Maische und der Feinmaische sind zusätzliche Proteinbanden im MG-Bereich von < 14 kDa erkennbar.

Abbildung 4.43 zeigt die Ergebnisse des Immunoblots, bei welchem die Blotstreifen mit einem Poolserum sowie dem Serum einer nichtsensibilisierten Person als Negativkontrolle inkubiert wurden. Eine Charakterisierung der Allergenbanden hinsichtlich ihres MG erfolgte wiederum anhand eines kolloidal goldgefärbten MG-Markers.

Es wird deutlich, daß die Extrakte der einzelnen Zwischenstufen bis zum Rohsaft ein dem nativen, nicht erhitzten Referenzmaterial nahezu identisches Allergenmuster zeigen. Lediglich eine Bande im unteren MG-Bereich, bei der es sich vermutlich um das Hauptallergen der Karotte Dau c 1 handelt, ist nach dem Blanchieren nur noch schwach und in den darauffolgenden Zwischenstufen nicht mehr detektierbar. Die mit dem Rohsaft durchgeführten Erhitzungsprozesse, wie dreifache Pasteurisation oder Sterilisation, führen lediglich zu einer gewissen Schwächung der Bandenintensitäten der übrigen Allergene, nicht jedoch zu einer Eliminierung des allergenen Potentials.

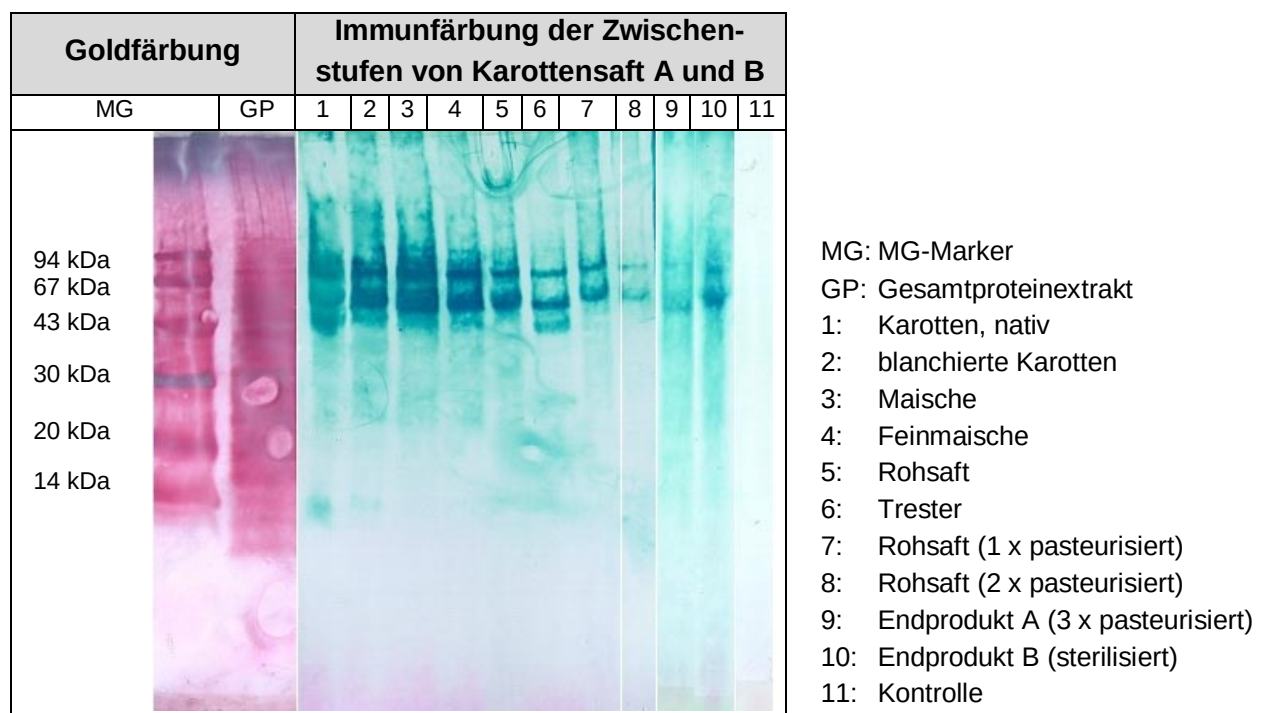


Abb. 4.43: Immunoblot der Extrakte der Verarbeitungsstufen der Karottensäfte A und B

Die Ergebnisse einer parallel zum Immunoblot durchgeführten EAST-Inhibition für die Zwischenstufen der Säfte A und B sind in Abbildung 4.42 dargestellt. Es wird ersichtlich, daß die allergene Potenz sich während der Herstellung der Säfte A und B kaum verändert. Die Kurvenverläufe für die unterschiedlichen Zwischenstufen und Endprodukte sind nahezu identisch und unterscheiden sich auch kaum vom Kurvenverlauf der homologen Inhibition. Die

C₅₀-Werte variieren lediglich zwischen 10 mg/L beim Endprodukt A und 48 mg/L beim einfach pasteurisierten Rohsaft (vgl. Anhang 7.13). Diese Schwankungen sind zu gering, um von einer definierten Veränderung des allergenen Potentials auszugehen. Diese Ergebnisse bestätigen die mittels Immunoblot erzielten Aussagen.

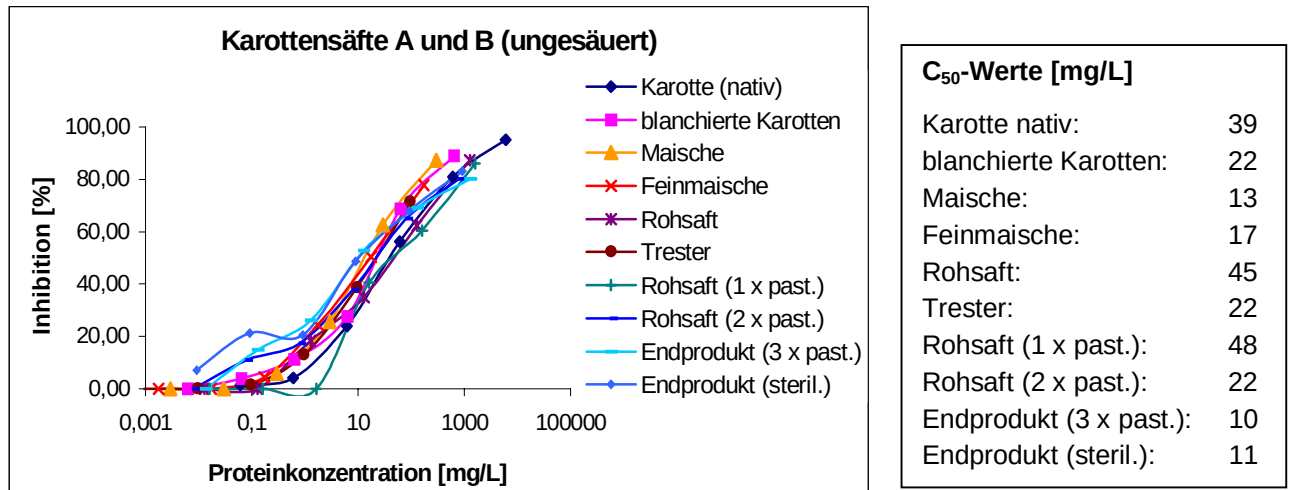


Abb. 4.42: EAST-Inhibitionsgraphen der Verarbeitungstufen der Karottensäfte A und B

4.3.3.2 Untersuchung der Zwischenstufen des Karottensaftes C (gesäuerter Saft aus geschälten Karotten)

Anhand von Karottensaft C wurde der mögliche Einfluß einer Schälung sowie einer Säuerung mit Citronensäure auf die Allergenität der Karotten untersucht. Das Endprodukt wurde in diesem Fall durch einfache Pasteurisation gewonnen.

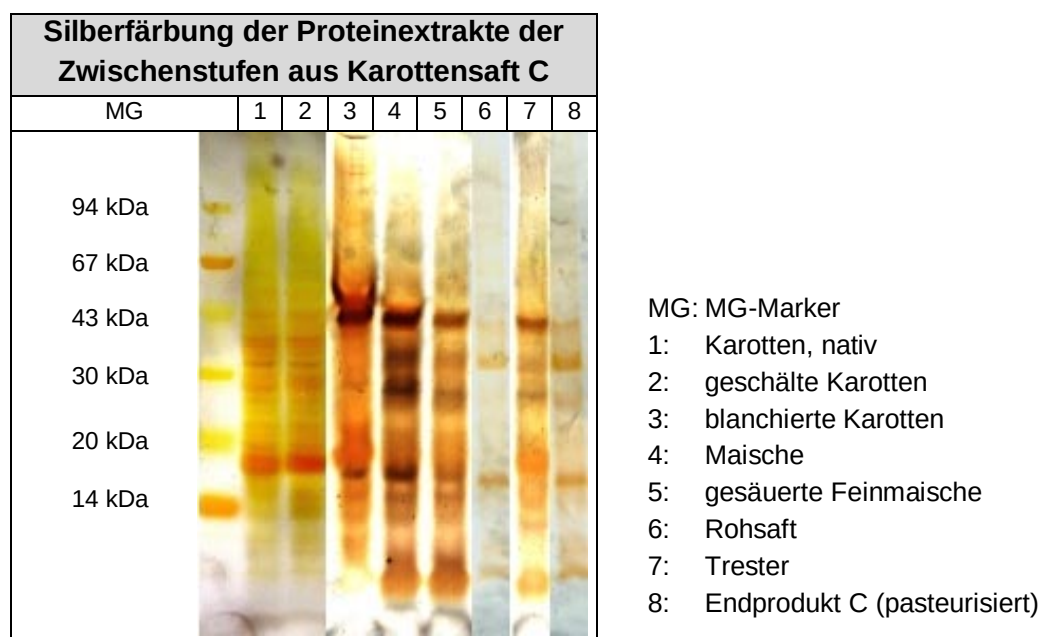


Abb. 4.44: Gesamtproteinmuster der Verarbeitungstufen aus Karottensaft C

Auch beim Karottensaft C werden in der Silberfärbung der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinextrakte aus den Zwischenstufen und Endprodukten Unterschiede deutlich. Während sich die Extrakte aus der nativen (1) und der geschälten Karotte (2) im Bandenmuster nicht unterscheiden, weichen die Bandenmuster der übrigen Extrakte erkennbar von dem des nativen Extraktes ab. Die Extrakte aus der Maische (4), der Feinmaische (5) und dem Trester (7) zeigen zusätzlich intensive Banden bei etwa 43 kDa, 35 kDa, 28 kDa sowie < 14 kDa. Im Rohsaft (6) und im Endprodukt (8) wird das gesamte Bandenmuster weniger intensiv detektiert als im nativen Extrakt.

Abbildung 4.46 zeigt die Ergebnisse eines Immunoblots, bei welchem die Blotstreifen mit einem Poolserum sowie dem Serum einer nichtsensibilisierten Person als Negativkontrolle inkubiert wurden. Eine Charakterisierung der Allergenbanden hinsichtlich ihres MG erfolgte wiederum anhand eines goldgefärbten MG-Markers. Die Extrakte der einzelnen Zwischenstufen zeigen ein dem nativen Karottenextrakt nahezu identisches Allergenbandenmuster. Lediglich ein Allergen mit einem MG von etwa 17 kDa verändert seine Intensität mit zunehmenden Verarbeitungsschritten. Während in den nativen und geschälten Karotten eine intensive Bande zu sehen ist, nimmt die Intensität in den Extrakten von Maische, Feinmaische und Trester stark ab. Im Rohsaft und im Endprodukt ist diese Bande nicht mehr nachweisbar. Insgesamt läßt sich sagen, daß weder eine Schälung noch eine Säuerung einen großen Einfluß auf das allergene Potential der Karotten hat. Die am Ende durchgeführte Pasteurisation des Rohsaftes führt, außer bei dem 17 kDa Allergen zu keiner im Immunoblot nachweisbaren Verringerung des allergenen Potentials der Karotten.

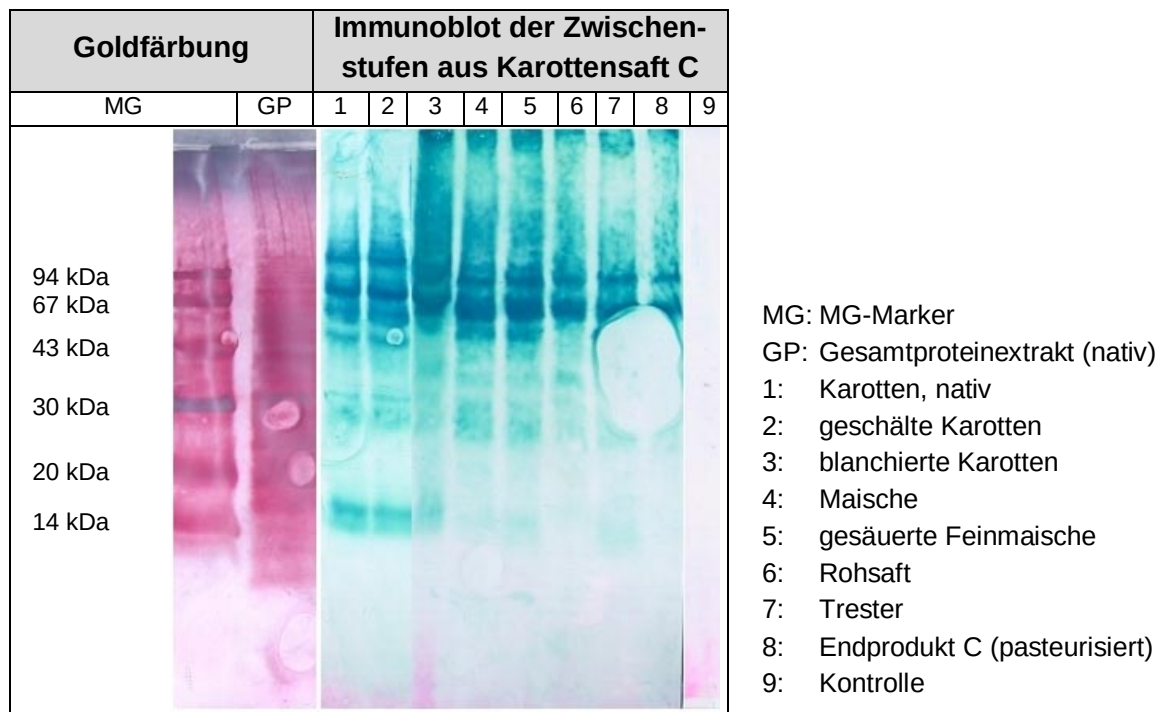


Abb. 4.46: Immunoblot der Verarbeitungsstufen aus Karottensaft C

Die Ergebnisse der parallel zum Immunoblot durchgeführten EAST-Inhibition sind in Abbildung 4.45 dargestellt. Auch hier wird deutlich, daß die allergene Potenz sich während der Herstellung von Saft C kaum verändert. Die Kurvenverläufe für die unterschiedlichen Zwischenstufen und Endprodukte sind wiederum nahezu identisch, so daß man anhand der EAST-Inhibition nicht auf einen Einfluß einer Schälung oder Säuerung auf das allergene Potential der Karotten schließen kann. Die C_{50} -Werte variieren auch in diesem Beispiel nur in geringen Schwankungsbreiten zwischen 2.0 mg/L bei der gesäuerten Feinmaische und 8.7 mg/L im Trester (vgl. Anhang 7.13). Die Ergebnisse der EAST-Inhibition decken sich mit denen aus dem Immunoblot.

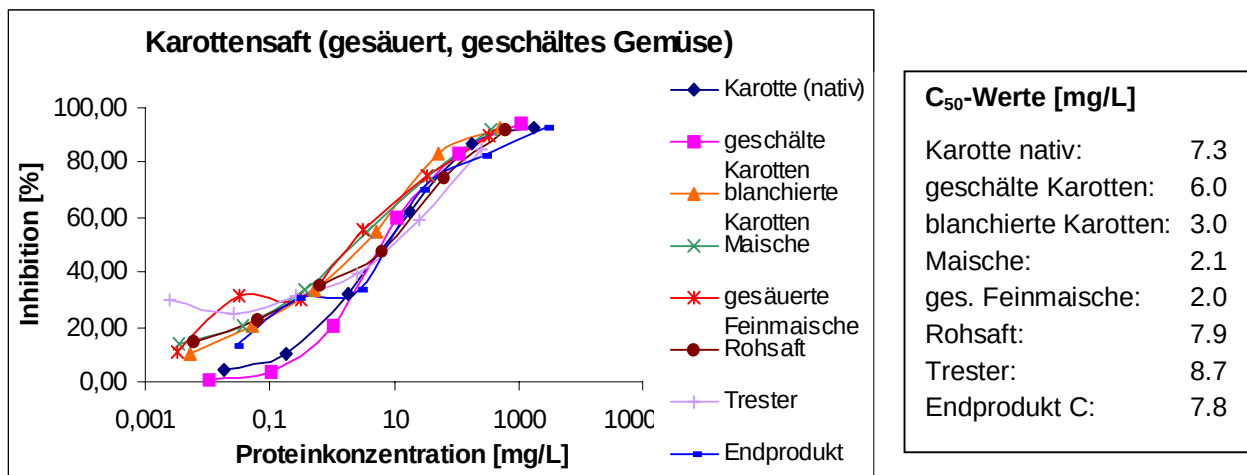


Abb. 4.45: EAST-Inhibitionsgraphen der Verarbeitungsstufen aus Karottensaft C

4.3.3.3 Untersuchung der Zwischenstufen von Karottensaft D (ungesäuertes, mit Pektinlyase enzymierter Saft)

Anhand von Karottensaft D erfolgte die Untersuchung eines möglichen Einflusses einer Enzymierung mit Pektinlyase auf das allergene Potential der Karotten. Das Endprodukt wurde in diesem Fall durch Sterilisation gewonnen. Abbildung 4.46 zeigt die mittels Silberfärbung detektierten Gesamtproteinmuster der aus den Zwischenstufen hergestellten Proteinextrakte sowie des nativen Karottenextraktes. Da die blanchierten Karotten und die Maische bereits bei den vorhergehenden Säften untersucht wurden, wurden diese Zwischenstufen bei Karottensaft D nicht mehr berücksichtigt.

Wie bei den bereits dokumentierten Karottensäften A-C werden auch in der Silberfärbung der Proteinextrakte aus den Zwischenstufen von Saft D Unterschiede zum nativen Karottenextrakt deutlich. Die Extrakte aus der Feinmaische, der enzymierten Feinmaische und dem Trester zeigen zusätzlich intensive Banden bei etwa 35 kDa, 28 kDa sowie < 14 kDa. Im Rohsaft und im Endprodukt wird das gesamte Bandenmuster, wie auch im Falle von Karottensaft C, weniger intensiv detektiert als im nativen Extrakt.

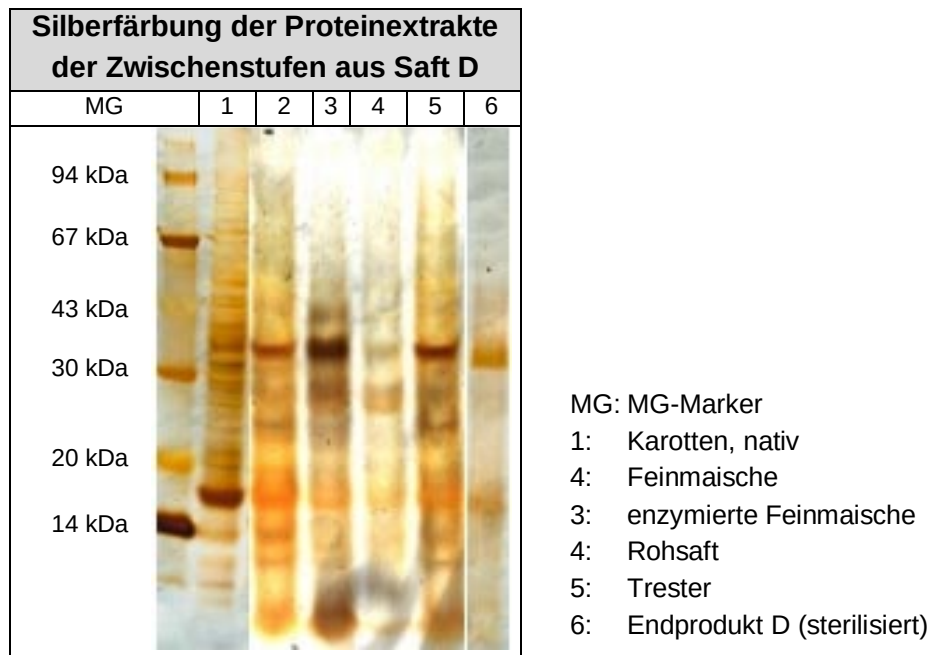


Abb. 4.47: Gesamtproteinmuster der Verarbeitungsstufen aus Karottensaft D

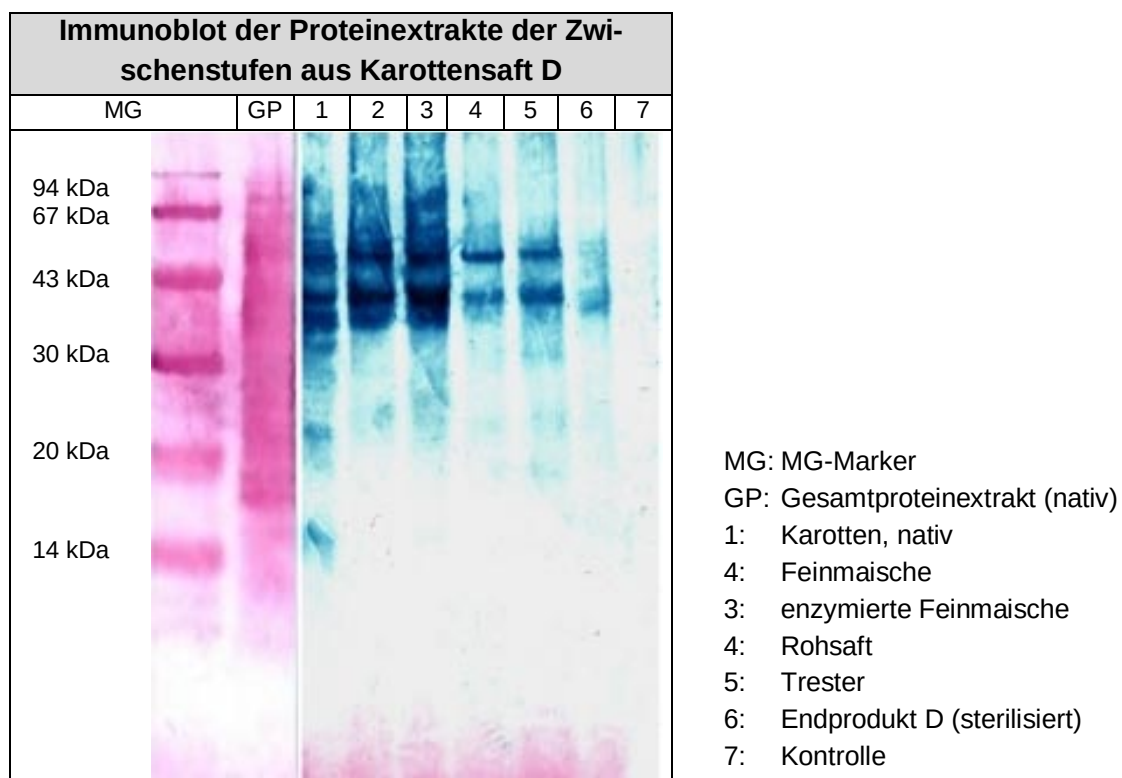


Abb. 4.49: Immunoblot der Verarbeitungsstufen aus Karottensaft D

Abbildung 4.49 zeigt die Ergebnisse eines nach dem bereits beschriebenen Prinzip durchgeführten Immunoblots. Auch hierbei zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den bereits beschriebenen Karottensäften. Die Extrakte der einzelnen Zwischenstufen sind dem nativen Karottenextrakt bezüglich ihres Allergenmusters ähnlich. Das Allergen mit einem MG von et-

wa 17 kDa ist nur noch im nativen Extrakt nachweisbar, nicht jedoch in den weiteren Zwischenstufen. Das Bandenmuster von Rohsaft, Trester und Endprodukt zeigt eine abnehmende Intensität, es kommt jedoch auch bei diesem Karottensaft nicht zu einer Eliminierung des allergenen Potentials.

Die Ergebnisse einer EAST-Inhibition für die Zwischenstufen von Karottensaft D sind in Abbildung 4.48 dargestellt. Es wird ersichtlich, daß sich die allergene Potenz auch bei Karottensaft D während der Herstellung kaum verändert. Die Kurvenverläufe für die unterschiedlichen Zwischenstufen und Endprodukte sind nahezu identisch und unterscheiden sich auch kaum vom Kurvenverlauf der homologen Inhibition. Die C_{50} -Werte variieren lediglich zwischen 5 mg/L bei der enzymierten Maische und 17 mg/L beim Trester. Die Ergebnisse bestätigen die mittels Immunoblot erzielten Aussagen.

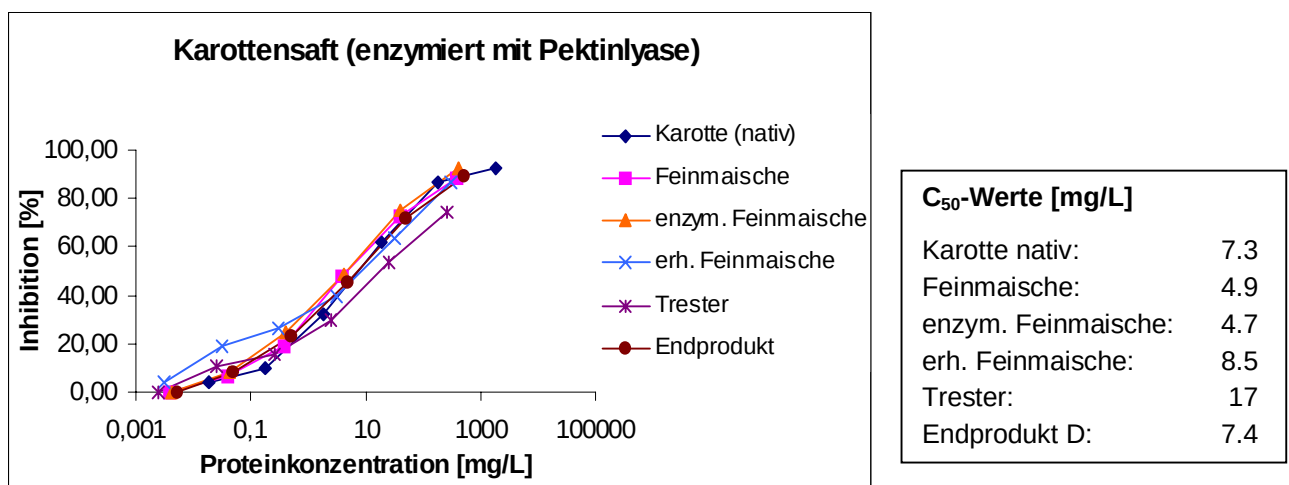


Abb. 4.48: EAST-Inhibitionsgraphen der Verarbeitungsstufen aus Karottensaft D

4.3.3.4 Untersuchung der Zwischenstufen von Karottensaft E (ungesäuerter, mit Pektatlyase enzymierter Saft)

Anhand von Karottensaft E erfolgte die Untersuchung eines möglichen Einflusses einer Enzymierung mit Pektatlyase auf das allergene Potential der Karotten. Das Endprodukt wurde auch bei diesem Karottensaft durch Sterilisation gewonnen. Abbildung 4.50 zeigt die mittels Silberfärbung detektierten Gesamtproteinmuster der aus den Zwischenstufen hergestellten Proteinextrakte sowie des nativen Karottenextraktes. Wie bereits bei den vorhergehenden Säften werden auch in der Silberfärbung der Proteinextrakte aus den Zwischenstufen von Saft E Unterschiede zum nativen Karottenextrakt deutlich. Die Extrakte aus Feinmaische, enzymierter Feinmaische und Trester zeigen zusätzlich intensive Banden bei etwa 35 kDa und 28 kDa. Im Rohsaft und im Endprodukt wird das gesamte Bandenmuster, wie auch bei Karottensaft C und D, weniger intensiv detektiert als im nativen Extrakt (vgl. 4.3.3.2 und 4.3.3.3).

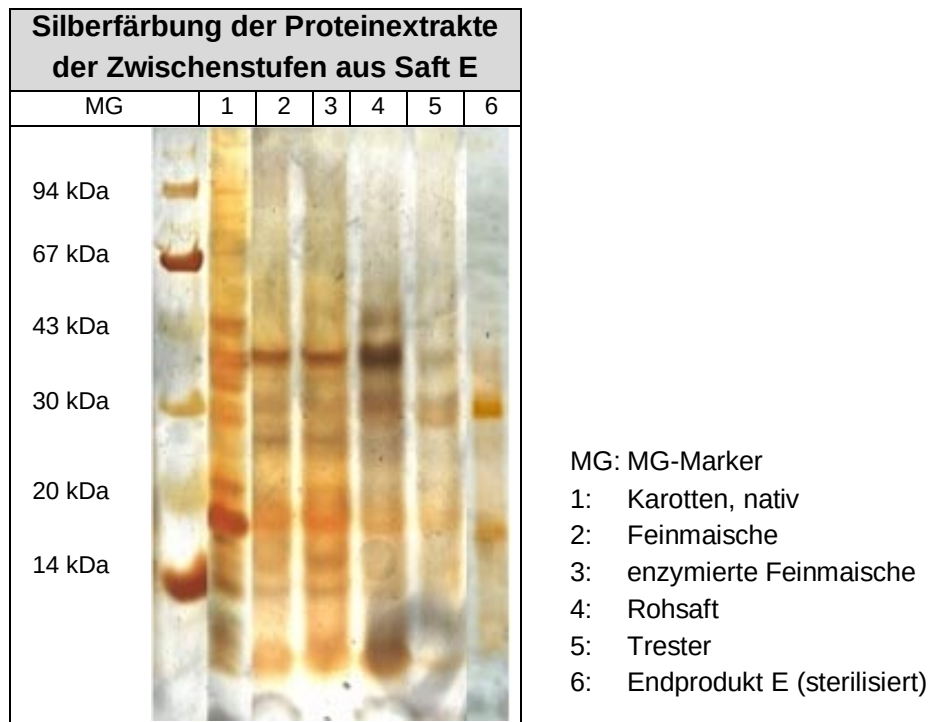


Abb. 4.50: Gesamtproteinmuster der Verarbeitungsstufen aus Karottensaft E

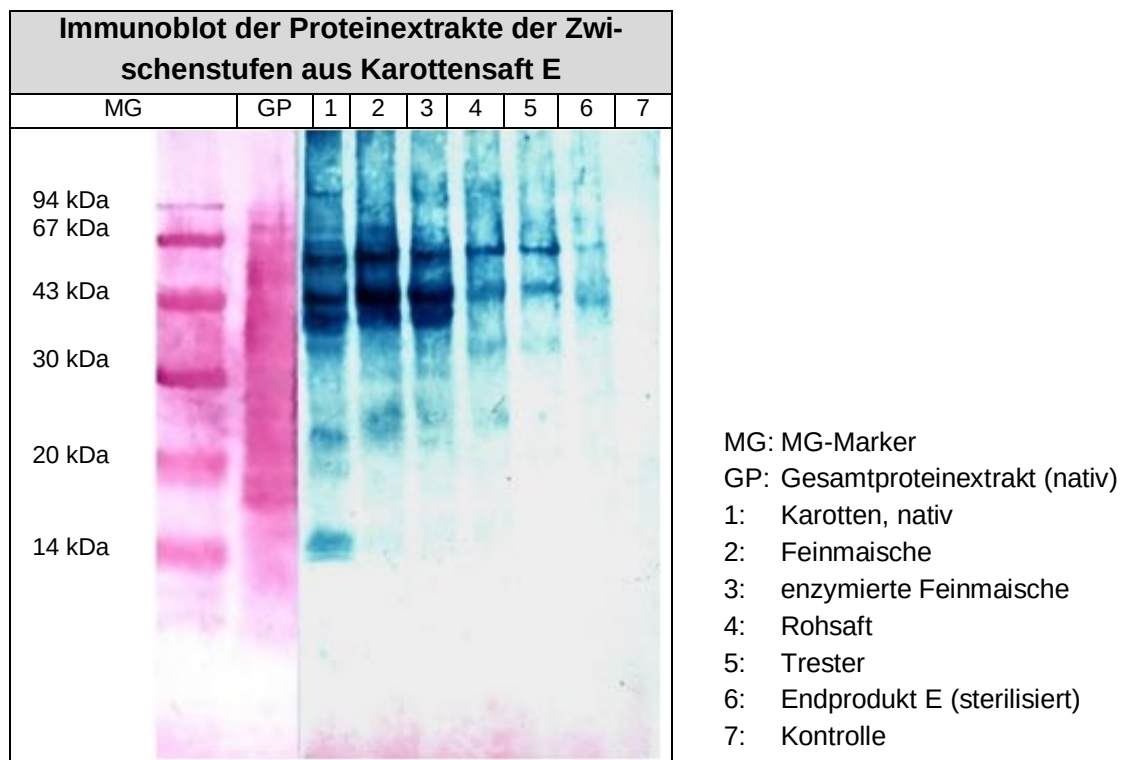


Abb. 4.52: Immunoblot der Verarbeitungsstufen aus Karottensaft E

Abbildung 4.52 zeigt die Ergebnisse eines Immunoblots, dessen Durchführung analog zu den bereits beschriebenen Karottensäften erfolgte. Auch bei Karottensaft E zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den bereits beschriebenen fluiden Produkten. Die Extrakte der einzel-

nen Zwischenstufen sind dem nativen Karottenextrakt bezüglich ihres Allergenmusters ähnlich. Ein IgE-bindendes Protein bei 14 kDa ist lediglich im nativen Extrakt nachweisbar, nicht jedoch in den weiteren Zwischenstufen. Obwohl die Intensität der Bandenmuster von Rohsaft, Trester und Endprodukt im Vergleich zum nativen Extrakt geschwächt ist, ist auch bei diesem Karottensaft keine Eliminierung des allergenen Potentials erkennbar.

Die Ergebnisse einer EAST-Inhibition für die Zwischenstufen von Karottensaft E sind in Abbildung 4.51 dargestellt. Auch in diesem Beispiel zeigt sich, daß sich das allergene Potential von Karottensaft E während der Herstellung kaum verändert. Die Kurvenverläufe für die unterschiedlichen Zwischenstufen und Endprodukte sind nahezu identisch und unterscheiden sich auch kaum vom Kurvenverlauf der mit dem nativen Extrakt der Karottensorte *Karotan* durchgeführten homologen Inhibition. Die C_{50} -Werte variieren lediglich zwischen 10 mg/L bei der enzymierten Maische und 22 mg/L beim nativen Extrakt (vgl. Anhang 7.13). Auch hierbei handelt es sich um nur geringe Schwankungen.

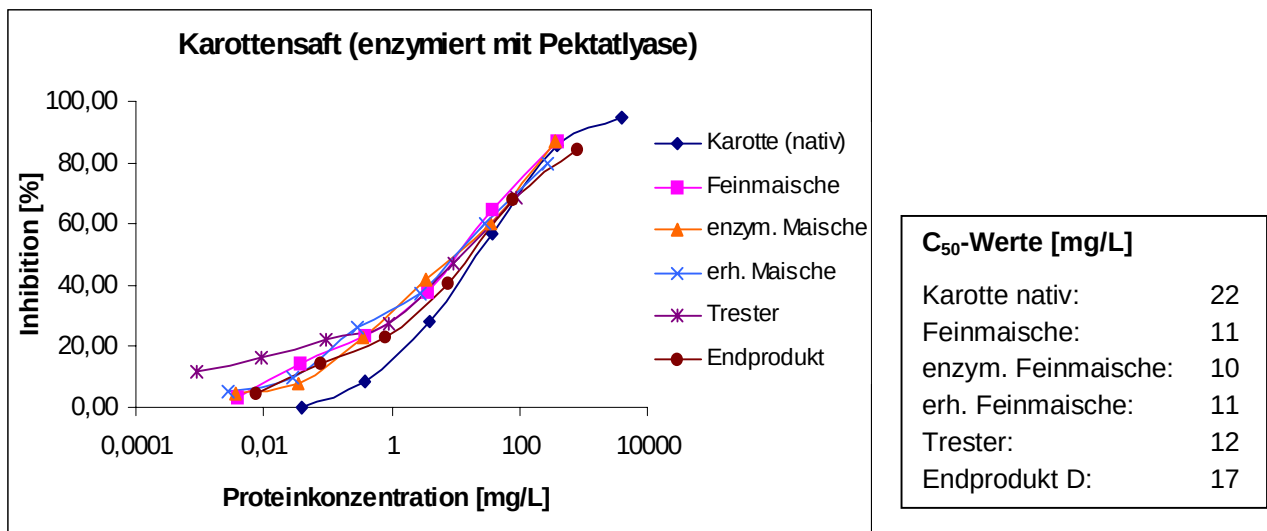


Abb. 4.51: EAST-Inhibitionsgraphen der Zwischenstufen aus Karottensaft E

4.3.4 Untersuchungen des allergenen Potentials eines Warenkorbs

Anhand einer Warenkorbuntersuchung wurde abschließend analog zu Haselnuß und Apfel das allergene Potential ausgewählter Karottenprodukte aus dem Handel bestimmt. Bei den untersuchten Produkten handelt es sich um Konserven, Salate, Trockenprodukte, Tiefkühlware, Babybreis sowie verschiedene Karottensäfte (vgl. Kapitel 7.12). Die Proteinextrakte wurden wie in Kapitel 7.2 beschrieben gewonnen.

Abbildung 4.53 zeigt die unpepezifische Silberfärbung der Proteinextrakte aller untersuchten Warenkorbprodukte. Während die Proteinbandenmuster der Tiefkühlprodukte (5 und 6) nahezu identisch mit dem des nativen Karottenextraktes sind, zeigen die übrigen Extrakte ein vom nativen Extrakt deutlich abweichendes Bild. Während das Bandenmuster von Konserve 1 (2) weitgehend mit dem des natives Extraktes (1) übereinstimmt und lediglich zusätzliche Proteine im MG-Bereich < 15 kDa detektiert werden, sind in Konserve 2 und 3 (3 und 4)

kaum noch Proteine im Bereich > 40 kDa erkennbar. Die Extrakte aus den Karottensalaten (7 und 8) zeigen ein ähnliches Bandenmuster, welches allerdings verglichen mit dem des nativen Extraktes deutlich schwächer ist. Die Extrakte aus den Trockenprodukten (9-11) zeigen eine intensiv detektierte Bande bei 35 kDa. In diesen Extrakten werden nur wenige weitere Proteine detektiert. Auch in den aus den Babybreis gewonnenen Extrakten (12-14) werden nur vereinzelt Proteinbanden bei 30 kDa, 35 kDa, 67 kDa und < 14 kDa detektiert. Auch die unspezifischen Proteinmuster der fünf Karottensäfte unterscheiden sich deutlich sowohl untereinander als auch von dem des nativen Extraktes. Während in Saft 1 (15) und Saft 5 (19) lediglich zwei Proteine bei 67 kDa und 35 kDa bzw. 67 kDa und 100 kDa detektiert werden, weisen die Säfte 2, 3 und 4 Bandenmuster mit diversen detektierten Proteinen auf. Dabei zeigt Saft 2 (16) Proteine im Bereich von 20-90 kDa, während die Säfte 3 und 4 (17 und 18) Banden im Bereich von < 14 -35 kDa aufweisen.

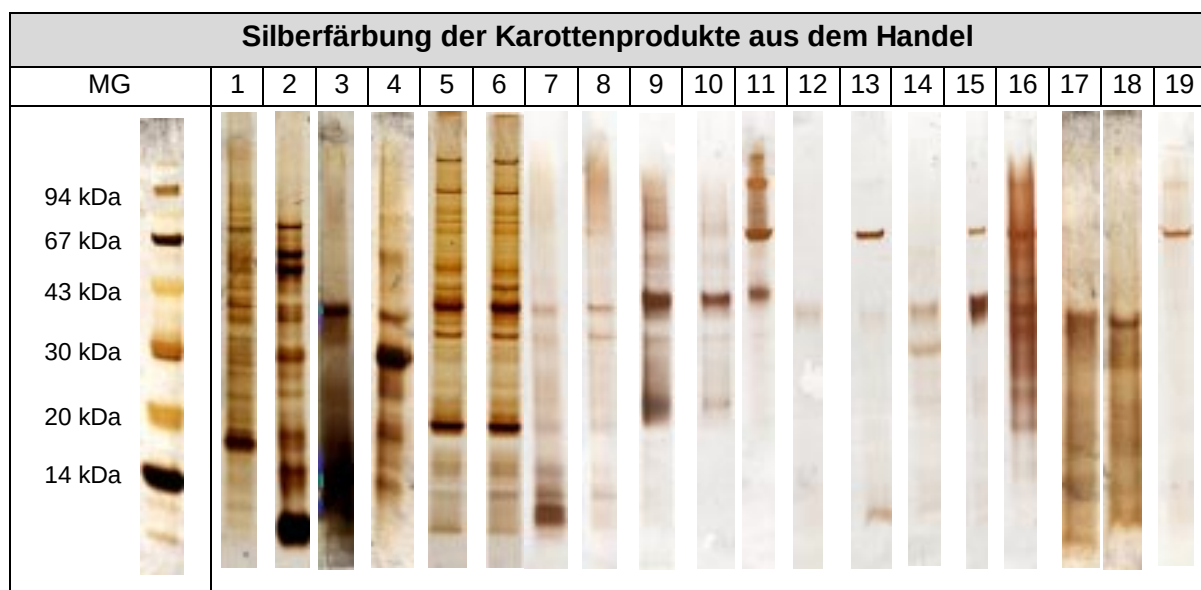


Abb. 4.53: Gesamtproteinmuster der Warenkorbprodukte

MG: MG-Marker, 1: nativer Karottenextrakt, 2: Konserve 1, 3: Konserve 2, 4: Konserve 3, 5: Tiefkühlware 1, 6: Tiefkühlware 2, 7: Karottensalat 1, 8: Karottensalat 2, 9: Trockenprodukt 1, 10: Trockenprodukt 2, 11: Trockenprodukt 3, 12: Babybrei 1, 13: Babybrei 2, 14: Babybrei 3, 15: Saft 1, 16: Saft 2, 17: Saft 3, 18: Saft 4, 19: Saft 5

Um eine Aussage über die Allergenität der untersuchten Extrakte treffen zu können, wurde ein Immunoblot unter Verwendung eines Poolserums durchgeführt, welcher in Abbildung 4.54 dargestellt ist. Auch hierbei zeigen sich Unterschiede in den Bandenmustern der untersuchten Extrakte. So weisen die Extrakte aus Konserve 1 (3) sowie aus den beiden Tiefkühlwaren (4 und 5) sehr ähnliche Allergenbandenmuster wie der native Extrakt auf. Während auch die Extrakte aus den Karottensalaten zumindest im höheren Molekulargewichtsbereich zwischen 35 kDa und 70 kDa Allergenbanden zeigen, ist in den übrigen Extrakten eine deutliche Reduzierung des allergenen Potentials erkennbar. In diesen Extrakten wird lediglich eine Bande im Bereich von 35 kDa detektiert. In den Extrakten aus Babybrei 2 (9) und Saft 2 (11) sind mittels Immunoblot keine Allergenbanden mehr nachweisbar.

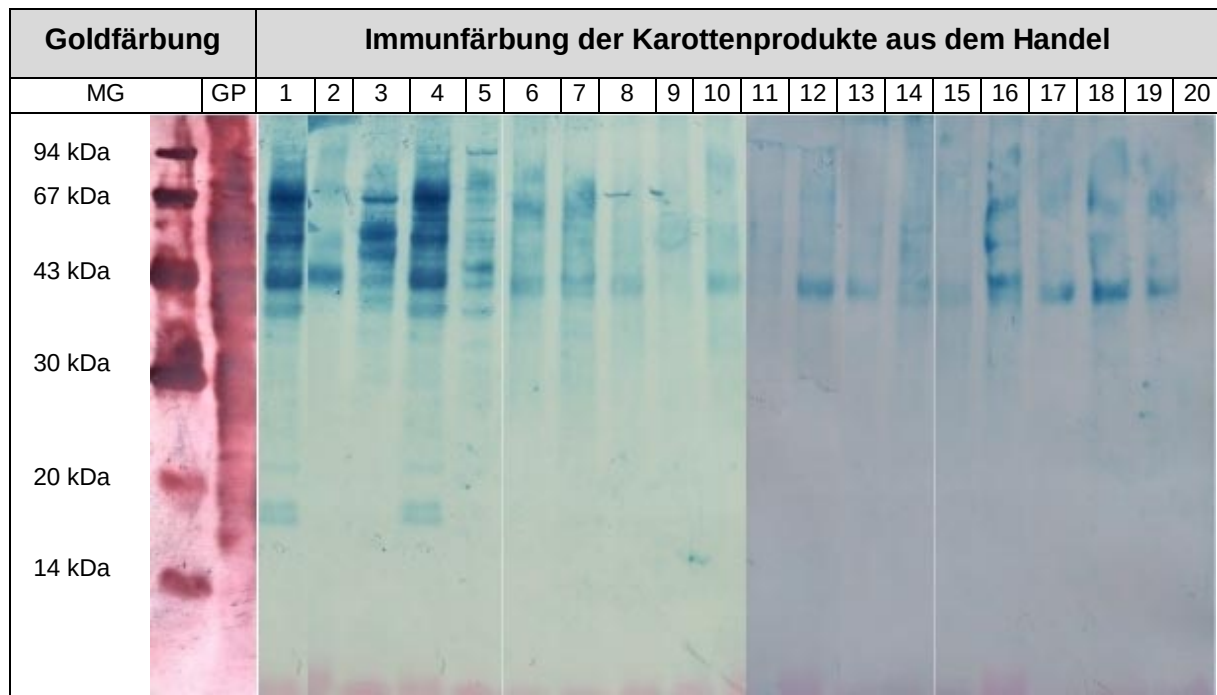


Abb. 4.54: Immunoblot der Warenkorbprodukte

MG: Molekulargewichtsmarker, GP: Gesamtproteinextrakt (nativ), 1: nativer Karottenextrakt, 2: Konserve 2, 3: Konserve 1, 4: Tiefkühlware 1, 5: Tiefkühlware 2, 6: Karottensalat 2, 7: Karottensalat 1, 8: Babybrei 1, 9: Babybrei 2, 10: Babybrei 3, 11: Saft 2, 12: Saft 1, 13: Saft 3, 14: Saft 5, 15: Saft 4, 16: Trockenprodukt 3, 17: Konserve 3, 18: Trockenprodukt 1, 19: Trockenprodukt 2, 20: Kontrolle

Auch bei den Warenkorbprodukten erfolgte eine relative Quantifizierung der Allergenität mit Hilfe der EAST-Inhibition. Für die graphische Darstellung wurden die Produkte in drei Gruppen unterteilt. Abbildung 4.55 zeigt die Inhibitionskurven der Extrakte aus den Konserven, der Tiefkühlware und den Trockenprodukten, Abbildung 4.56 die der Extrakte aus den Karottensalaten und Babybreis und Abbildung 4.57 die aus den Extrakten der Karottensäfte resultierenden Inhibitionskurven.

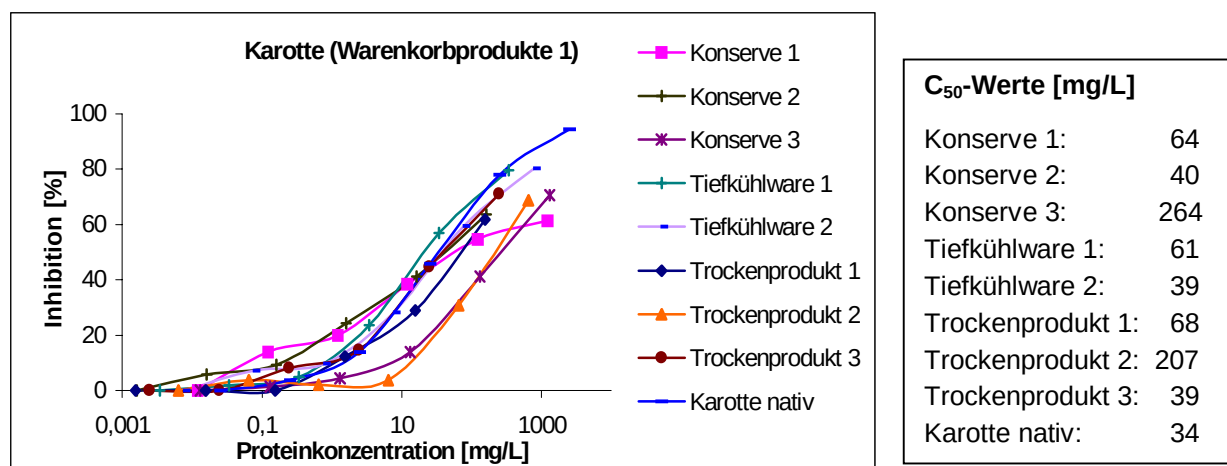


Abb. 4.55: EAST-Inhibitionsgraphen der Warenkorbprodukte 1

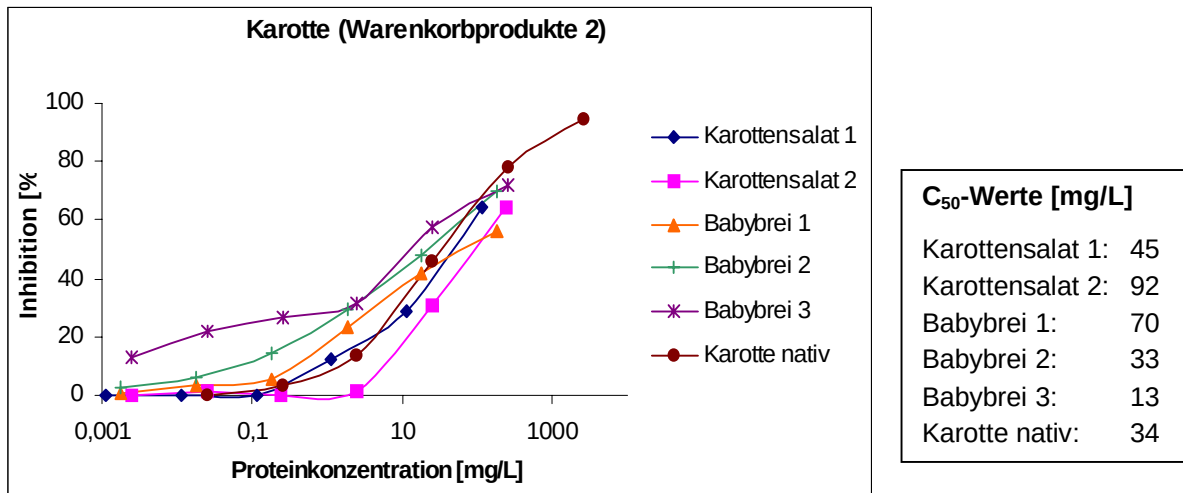


Abb. 4.56: EAST-Inhibitionsgraphen der Warenkorbprodukte 2

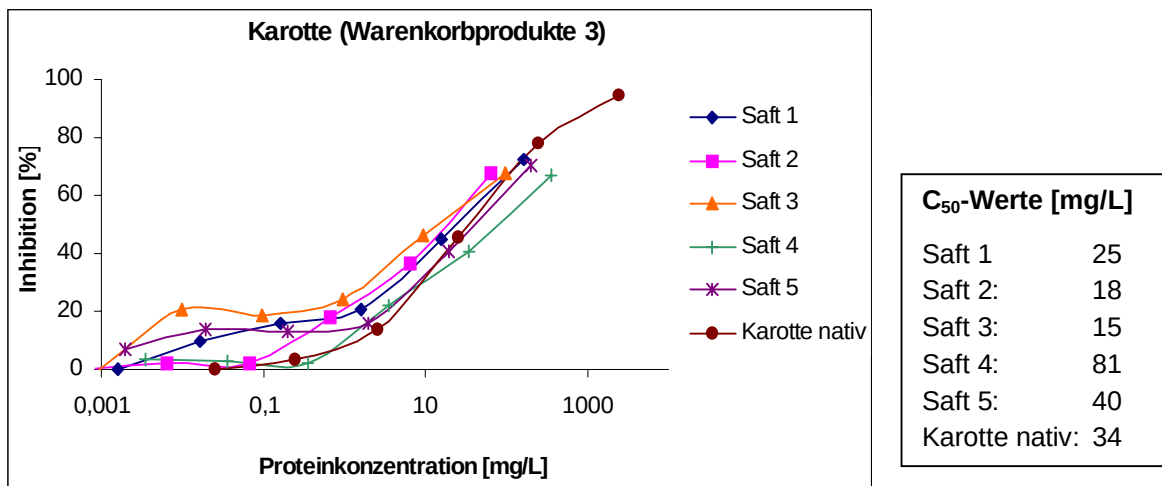


Abb. 4.57: EAST-Inhibitionsgraphen der Warenkorbprodukte 3

Sowohl an den Kurvenverläufen als auch an den anhand der Kurven berechneten C₅₀-Werte wird deutlich, daß sämtliche der im Rahmen des Warenkorbs untersuchten Karottenprodukte ein erhebliches allergenes Restpotential enthalten. Lediglich die Extrakte der Konserve 3 und des Trockenproduktes 2 deuten mit C₅₀-Werten von 264 mg/L bzw. 207 mg/L auf eine gewisse Schwächung des allergenen Potentials hin. Die Extrakte von Babybrei 2 (C₅₀-Wert: 33 mg/L) und Karottensaft 2 (C₅₀-Wert: 18 mg/L) zeigen, obwohl sie im Immunoblot negativ reagierten, in der EAST-Inhibition noch eine deutliche allergene Aktivität (vgl. Anhang 7.13).

5 DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand in der Untersuchung des Einflusses lebensmitteltechnologischer Verarbeitungsprozesse auf das allergene Potential der birkenpollenassoziierten Lebensmittel Haselnuß, Apfel und Karotte.

5.1 Haselnuß

Zunächst erfolgte eine Charakterisierung der Hauptallergene der Haselnuß mittels SDS-PAGE-Immunoblot unter Verwendung von insgesamt 14 Seren von auf Haselnuß sensibilisierten Patienten. Alle Patientenserum detektieren ein Allergen im Bereich von etwa 18 kDa, welches damit als Hauptallergen gewertet wird. Eine große Bedeutung kommt auch einem Protein mit einem MG von etwa 14 kDa zu. Zusätzlich ist eine Vielzahl von Minorallergenen im oberen MG-Bereich (30-67 kDa) sowie eine Bande < 14 kDa zu erkennen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Studien von HIRSCHWEHR ET AL. (1992) UND CABALLERO ET AL. (1997). HIRSCHWEHR ET AL. (1992) identifizierten ein Protein mit einem MG von 18 kDa als Hauptallergen der Haselnuß sowie Minorallergene mit MG von 14 kDa, 37 kDa, 40 kDa, 46 kDa und 69 kDa. CABALLERO ET AL. (1997) beschrieben zwei Hauptallergene mit MG von 17 kDa und 42 kDa sowie zwei weitere Allergene unterhalb von 16 kDa.

Am Beispiel der Haselnuß erfolgte des weiteren ein Vergleich des allergenen Potentials der unterschiedlichen Handelssorten *Barcelona*, *Levantiner*, *Neapler*, *Runde Römer* und *Con-torta*. Die Untersuchung einer Sortenabhängigkeit des allergenen Potentials wurde bereits von VIETHS ET AL. (1994A) am Beispiel des Apfels durchgeführt. In dieser Studie wurde eine starke Variation der Apfelallergie bei verschiedenen Sorten nachgewiesen, was auf unterschiedliche Konzentrationen des Hauptallergens in den verschiedenen Apfelsorten zurückzuführen war. Anhand der bei den Haselnußsorten erzielten Ergebnisse kann nicht auf eine Sortenabhängigkeit des allergenen Potentials geschlossen werden. Im Immunoblot weisen alle untersuchten Haselnußsorten ein identisches Allergenspektrum auf. Auch in der EAST-Inhibition ergibt sich für alle untersuchten Haselnüsse eine vergleichbar hohe allergene Aktivität. BARGMAN ET AL. (1992), die ähnliche Untersuchungen an drei rohen Mandelsorten durchführten, fanden dabei ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede bezüglich des Allergenspektrums im Immunoblot.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit lag in der Untersuchung verschiedener Erhitzungseinflüsse auf das allergene Potential der Haselnüsse. Bei einer Erhitzungstemperatur von 100 °C im Trockenschrank zeigt sich auch nach einer Einwirkdauer von 90 min keine Veränderung der Allergenität. Auch die bis zu 155 °C erhitzen Haselnüsse weisen keinen Unterschied zum nativen Haselnußextrakt auf. Erst Temperaturen von 170-185 °C führen zu einer Verringerung des allergenen Potentials. Diese Ergebnisse belegen, daß es sich bei den Haselnußallergenen um relativ hitzestabile Allergene handelt. Bei dem 18 kDa Hauptallergen der Haselnuß handelt es sich um ein mit dem Hauptallergen der Birkenpollen Bet v 1 kreuzreagierendes Allergen. Im Gegensatz zum Allergen der Haselnuß sind viele birkenpollenassoziierte Allergene von Gemüsen und Früchten hitzelabil. So zeigten z.B. JANKIEWICZ ET AL. (1997), daß das birkenpollenassoziierte Hauptallergen des Sellerie Api g 1 bereits bei Mikrowellenerhitzung (600 Watt, 3.5 min) sehr stark an Allergenität verliert. Auch beim 18 kDa

Hauptallergen des Apfels führt die thermische Beanspruchung zu einem nahezu vollständigen Verlust der IgE-Reaktivität (DREBORG & FOUCARD 1983, VIETHS ET AL. 1994A). Andererseits werden besonders bei Nüssen hitzestabile Allergene beschrieben. Solche weist beispielsweise die Mandel auf. BARGMAN ET AL. (1992) konnten zeigen, daß sich die IgE-Bindungsaktivität eines Mandelallergens mit dem MG-Gewicht 45-50 kDa durch Röstung der Mandeln nicht vermindern ließ. HEINER & NEUCERE (1975) konnten bei der botanisch zu den Leguminosen zählenden Erdnuß keinen Allergenitätsverlust durch Rösten bei 145 °C feststellen. Vielmehr zeigte sich sogar mittels RAST, daß sich die Allergenität der Erdnuß nach der Erhitzung für einen Teil ihrer Patienten erhöht hatte. Die Hitzestabilität der Erdnuß wird in einer Studie von BURKS ET AL. (1992) bestätigt.

Obwohl die Haselnußallergene ziemlich resistent gegen Hitzeeinwirkung zu sein scheinen, gibt es Unterschiede in der Stabilität verschiedener Allergene. Das birkenpollenassoziierte 18 kDa Hauptallergen sowie das ebenfalls birkenpollenassoziierte 14 kDa Allergen sind gegenüber Temperaturen oberhalb von 170 °C nicht stabil, während sich ein Protein mit einem MG < 14 kDa auch bei Temperaturen von 185 °C als hitzestabil zeigt. Auch SCHOCKER ET AL. (1999) berichten von hitzestabilen nicht-pollenassoziierten Haselnußallergenen mit MG von 9 kDa und 7 kDa, sowie weiteren Proteinen bei 50 kDa, 42 kDa und 38 kDa. Diese Allergene wiesen sie im Immunoblot unter Verwendung eines Serums einer Patientin mit schweren anaphylaktischen Reaktionen auf Haselnüsse nach.

Bei der industriellen Verarbeitung von Haselnüssen spielt die Rösttechnologie eine wesentliche Rolle. Die meisten der zu diversen Süßwaren verarbeiteten Haselnüsse werden zuvor einer Röstung unterzogen. PERREN (1996) entdeckte, daß die Rösttemperatur einen großen Einfluß auf die oxidative Stabilität der Haselnüsse hat. Zur Vermeidung einer Oxidation während des Röstvorgangs sollte demnach die Temperatur 145 °C nicht übersteigen. Eine solche Temperatur ist für eine Eliminierung des allergenen Potentials nach den vorliegenden Ergebnissen nicht ausreichend. Daher ist auch bei gerösteten Haselnüssen mit einem erheblichen allergenen Potential zu rechnen.

Der Einfluß der proteolytischen Verdauung auf das allergene Potential stellt bei der Untersuchung von Lebensmittelallergien einen wichtigen Aspekt dar, da er möglicherweise eine wesentliche Voraussetzung für eine Sensibilisierung über den Gastrointestinaltrakt sein könnte. Nach der Hypothese von ASTWOOD ET AL. (1996) müssen die Allergene die Pepsin-Verdauung des Magens überstehen, damit sie von der Darmschleimhaut absorbiert werden können. Erst dann kann eine Sensibilisierung des Patienten auf das Allergen stattfinden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wird mit der Haselnuß eine in vitro Verdauung mit den Enzymen Pepsin, Pankreatin, Protease, Elastase und Trypsin durchgeführt. Die Bedingungen sind an die von ASSELIN ET AL. (1989) durchgeführten Untersuchungen angelehnt. Nach einer 30 minütigen Behandlung mit Protease, Elastase und Trypsin können im Immunoblot keine Allergenbanden mehr detektiert werden, während die Ergebnisse der EAST-Inhibition ein allergenes Restpotential zeigen. Die höhere Empfindlichkeit der EAST-Inhibition gegenüber dem Immunoblot könnte mit dem Entstehen kleinerer Allergenfragmente (< 8 kDa) mit intaktem Epitop begründet werden, die unter den bestehenden elektrophoretischen Bedingungen (SDS-PAGE / Immunoblot) nicht mehr erfasst werden können. Auch beim Verdau mit Pepsin und Pankreatin nimmt das allergene Potential der Haselnuß mit zunehmender Behandlungsdauer ab. Nach einem 240 minütigen Pepsin-Verdau wird das allergene Potential stark reduziert, während beim Verdau mit Pankreatin bereits eine Einwirkzeit von 60 min für eine

starke Reduzierung der allergenen Aktivität der Haselnußproteine ausreichend ist. Obwohl die Stabilität der Haselnußallergene gegenüber einem Verdau mit Pepsin und Pankreatin höher ist als gegenüber einer Behandlung mit Protease, Elastase und Trypsin, kann man die Haselnußallergene zusammenfassend als instabil gegenüber dem enzymatischen Verdau bezeichnen. Die Unterschiede in der Stabilität der Haselnußallergene können auch durch unterschiedliche Enzymaktivitäten der verwendeten Verdauungsenzyme erklärbar sein. Nach einer kompletten Verdauung bestehend aus einer Behandlung mit Pepsin gefolgt von einer Pankreatinbehandlung, kann eine Eliminierung der IgE bindenden Aktivitäten erwartet werden. Dies wird durch eine Studie von VIETHS ET AL. (1999) bestätigt, in welcher Extrakte aus Erdnüssen und Haselnüssen nach einem zweistündigen gastrischen Verdau gefolgt von einem 45 minütigen Verdau unter duodenalen Bedingungen untersucht werden. Im Fall der Haselnuß wird sowohl beim gastrischen Verdau als auch beim kombinierten gastrisch-duodenalen Verdau die IgE-Bindungsaktivität in einem Poolserum bis auf $< 10\%$ reduziert. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen von BURKS ET AL. (1991), die eine signifikante Reduktion der IgE-Bindung von verdauten Sojaprodukten feststellen. Andererseits stehen sie im Gegensatz zu einer Untersuchung von DOMINGUEZ ET AL. (1990), die eine hohe Resistenz eines Senf-Allergens gegenüber einer Behandlung mit proteolytischen Enzymen zeigen. In einer weiteren Studie weisen ASTWOOD ET AL. (1996) die Stabilität von wichtigen Lebensmittelallergenen bei der Verdauung im simulierten Magensaft nach. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen aus diesen Studien ist zum einen mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten der verwendeten Enzyme und zum anderen mit dem unterschiedlichen Ausgangsmaterial zu erklären. Während die Untersuchungen von DOMINGUEZ ET AL. (1990) und von ASTWOOD ET AL. (1996) mit isolierten Allergenextrakten durchgeführt wurden, wurde in den Untersuchungen von BURKS ET AL. (1991) sowie in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit das gesamte Lebensmittel enzymatisch behandelt. Dabei wurden auch Matrixeinflüsse berücksichtigt, was eine wichtige Voraussetzung für die realistische Bestimmung der Allergenität von Lebensmittelproteinen darstellt.

Die Untersuchung eines Warenkorbs mit Haselnuß-Handelsprodukten zeigt sehr unterschiedliche Ergebnisse. Während die Proteinextrakte von nur wenigen Produkten, wie einem Müsli-Riegel, zwei Haselnuß-Schokoladen und zwei Nuß-Nougatschokoladen, im Immunoblot Allergenbanden zeigen, weisen fast alle untersuchten Extrakte ein allergenes Restpotential in der EAST-Inhibition auf. Auch in diesem Fall könnte eine mögliche Erklärung für die höhere Empfindlichkeit der EAST-Inhibition die Bildung von niedrigeremolekularen Peptiden während der Verarbeitung sein, die sich mit den durchgeführten elektrophoretischen Methoden nicht mehr nachweisen lassen. Ein weiterer Grund für starke Differenzen des allergenen Potentials in unterschiedlichen Produkten kann darin liegen, daß bei der Proteingehaltsbestimmung nach BRADFORD (1976) nur der Gesamtproteingehalt bestimmt werden kann. Neben den Haselnußproteinen werden entsprechend auch Proteine von anderen Inhaltsstoffen, wie beispielsweise Milchproteine mitquantifiziert. Da eine vollständige Isolierung des Haselnußanteils vor der Proteinextraktion nicht immer möglich ist, sind die Proteingehalte der Extrakte nicht immer direkt vergleichbar. Deutliche Unterschiede sind auch in der allergenen Potenz vergleichbarer Produkte erkennbar. So variieren die C_{50} -Werte der untersuchten Haselnußschokoladen sehr stark untereinander. Im Immunoblot ist nur bei zwei Schokoladen eine IgE-Bindungsaktivität nachweisbar. Auch bei den Nougat-Produkten zeigen lediglich die beiden untersuchten Nougatschokoladen im Immunoblot Allergenbanden.

Obwohl das allergene Potential einiger Haselnußprodukte im Vergleich zum nativen Extrakt reduziert wird, kann keine Eliminierung nachgewiesen werden. Die Produkte stellen nach wie vor eine potentielle Gefahr für Haselnuß-Allergiker dar, weil bei stark sensibilisierten Personen bereits äußerst geringe Konzentrationen zur Auslösung der Symptome ausreichend sind. Sogar anaphylaktische Reaktionen werden bei Haselnußallergikern beschrieben (SAMPSON ET AL. 1992). Die Ergebnisse zeigen außerdem, daß auch in Produkten mit einem geringeren Haselnußanteil noch ein allergenes Potential vorhanden sein kann. Demnach kommt den Allergenen der Haselnuß eine große Bedeutung als sogenannte "versteckte Allergene" zu. Als solche werden nicht erkennbare allergieauslösende Lebensmittel bzw. Lebensmittelbestandteile, die in anderen Lebensmitteln enthalten sind, bezeichnet (VIETHS ET AL. 1994B). Es ist somit davon auszugehen, daß Rückstände oder kleine, nicht zu deklarierende Zusätze zu gewöhnlich haselnußfreien Produkten für sensibilisierte Personen eine Gefahr darstellen.

Weitere Studien zum allergenen Potential von Haselnußprodukten beschränken sich lediglich auf die Untersuchung von Haselnußölen. So wiesen TEUBER ET AL. (1997) in einem Haselnußöl mittels Immunoblot eine IgE-Bindungsaktivität nach. Ferner liegen ähnliche Studien zur Untersuchung des allergenen Potentials von weiteren Nüssen vor. So zeigten NORDLEE ET AL. (1981) bei der Untersuchung von 19 verschiedenen Erdnußprodukten, daß sich die Allergenität dieser Produkte nicht wesentlich vom allergenen Potential nativer Erdnüsse unterscheidet. Da die Abnahme der Allergenität von Erdnußprodukten wesentlich geringer als die der Haselnußprodukte ist, kann davon ausgegangen werden, daß die Erdnußallergene stabiler als die Allergene der Haselnuß sind. BARGMAN ET AL. (1992) untersuchten beispielhaft die Allergenität von verarbeiteten Mandeln. Dabei konnten sie zeigen, daß das allergene Potential von Mandelbutter dem der nativen Mandel sehr ähnlich ist. Auch hier zeigt sich, daß eine technologische Verarbeitung zu keiner Allergenitätsabnahme führt.

5.2 Apfel

Für die Charakterisierung der Apfelallergene wurden 19 verschiedene Seren mit spezifischen IgE-Antikörpern gegen Apfelallergene verwendet. Im Immunoblot zeigt sich, daß 17 der 19 Seren eine Allergenbande bei 18 kDa detektieren. Ebenso werden mit diversen Seren Banden mit MG von ca. 37 kDa sowie 43 kDa nachgewiesen. Darüber hinaus werden im Apfel-extrakt allergene Banden im Bereich zwischen 30 und 67 kDa detektiert. Diese Ergebnisse werden in verschiedenen Studien bestätigt. EBNER ET AL. (1991) zeigten, daß ein Protein mit einem MG von 17-18 kDa eine wichtige Rolle bei der Allergie gegen Äpfel spielt. Bei Untersuchungen von VIETHS ET AL. (1994A) mit Äpfeln der Sorte *Golden Delicious* detektierten 7 von 8 Patientenseren ein Allergen mit einem MG von 18 kDa. Es handelt sich dabei um das Hauptallergen des Apfels Mal d 1. Die IgE-Affinität zu zwei Allergenen mit MG von ca. 37 und 43 kDa wurde bereits von RUDESCHKO ET AL. (1995) beschrieben. Darüber hinaus konnten VIETHS ET AL. (1993B) nachweisen, daß Apfelproteinextrakte der Sorte *Golden Delicious* einen hohen Anteil an Allergenen mit einem MG zwischen 40 und 50 kDa besitzen. Auch WADEE ET AL. (1990) konnten im Apfel mehrere allergene Banden zwischen 14 und 67 kDa nachweisen.

Die Untersuchung der Allergenität während der technologischen Verarbeitung von Äpfeln erfolgt anhand eines Apfelpürees und fünf naturtrüber Apfelsäfte, welche mittels verschiede-

ner Basistechnologien in der UH hergestellt werden. Die Gewinnung der Maische stellt bei der Herstellung von Apfelsaft den ersten Prozeßschritt dar. In den Maischeextrakten werden einige Proteinbanden mittels Silberfärbung weniger intensiv detektiert als im nativen Apfel-extrakt. Eine eindeutige Zuordnung der Proteinbanden ist nur bei 18 kDa und 43 kDa mög-lich. Der native Apfelextrakt weist bei 30 kDa eine schmale Proteinbande auf, welche im Ge-samtproteinmuster der Maischen viel breiter erscheint. Dieses kann auf die starke Konzen-trierung der Extrakte und damit einer erhöhten Zucker- und Salzkonzentration zurückzufüh-ren sein. Nach MARTÍNEZ ET AL. (1997) kann eine zu hohe Zuckerkonzentration der Extrakte zu negativen Folgen bei der elektrophoretischen Trennung der Proteine führen.

Im Immunoblot weisen die Extrakte aus den Apfelmaischen ein hohes allergenes Potential auf. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den Untersuchungen von AULEPP und VIETHS (1992), nach denen Äpfel bereits nach dem Reiben des rohen Fruchtfleisches, wenn dieses der Luft ausgesetzt ist, ihre allergene Potenz verlieren. Eine Erklärung ergibt sich aus dem Vorkommen sehr reaktiver Polyphenolverbindungen in Äpfeln. Diese werden nach dem Zer-kleinern der Äpfel durch enzymatische Katalyse zu Chinonen oxidiert, die wiederum mit den Apfelproteinen zu polymeren Strukturen kondensieren (ZIMMER ET AL. 1994), wodurch eine Reduzierung des allergenen Potentials möglich ist. Die Polyphenol-Protein-Komplexe sind zusammen mit Pektinstoffen für die Trübung der Säfte verantwortlich (STÄHLE-HAMATSCHEK und GIER SCHNER 1989). Aus diesem Grund wird in einer Musterproduktion der UH der Mai-sche unmittelbar nach Herstellung Ascorbinsäure zudosiert, welche durch Reduktion der unter Einwirkung von Polyphenoloxidasen oxidierten Polyphenole und vermutlich durch Komplexierung des Zentralatoms des Enzyms, eine Stabilisierung der Trubpartikel im Saft bewirkt (PECORONI ET AL. 1993). Die Oxidation pflanze-eigener Phenole und die anschlie-ßende Reaktion der Chinone mit den Apfelproteinen wird dadurch unterbunden. RUDESCHKO ET AL. (1995) nutzen bei ihren Untersuchungen zur Optimierung von Apfelallergenextrakten die antioxidative Wirkung der Ascorbinsäure. Der Vergleich verschiedener Extraktionsme-thoden untereinander zeigt, daß die Proteingehalte der mit Ascorbinsäurezusatz hergestell-ten Extrakte am höchsten sind. Neben dem Ascorbinsäurezusatz besteht eine weitere Erklä-rung für die hohe allergene Potenz der Maischen darin, daß die Musterproduktionen ohne zusätzliche Maischestandzeit durchgeführt werden. Dadurch werden die Oxidationsvorgänge so minimiert, daß die Polyphenol-Protein-Reaktionen auf das produktionstechnisch unver-meidbare Maß beschränkt werden können.

Aufgrund der noch nachweisbaren hohen Allergenität der Maischen wird der Einfluß einer Ascorbinsäurezugabe sowie der Maischestandzeit auf das allergene Potential gezielt unter-sucht. Dafür werden zwei Maischen mit und ohne Ascorbinsäurezusatz hergestellt und dar-aus nach verschiedenen Standzeiten (0 h, 1 h, 2 h und 3 h) immunologische Untersuchun-gen durchgeführt. Im Immunoblot ist keine Abnahme der allergenen Potenz nach längerer Standzeit der Maischen zu erkennen. Es werden nach jeder Standzeit noch deutlich allerge-ne Banden detektiert. Durch die EAST-Inhibition kann gezeigt werden, daß nach längerer Standzeit ohne Ascorbinsäurezusatz eine Verschiebung der C_{50} -Werte auf höhere Protein-konzentrationen stattfindet. Dagegen weisen die Inhibitionskurven der Extrakte aus den Mai-schen mit Ascorbinsäurezusatz einen nahezu identischen Verlauf auf. Daraus läßt sich schließen, daß eine Ascorbinsäurezugabe eine Allergenitätsabnahme bei steigender Mai-schestandzeit verhindert. Die Abnahme der Allergenität nach längerer Standzeit der Mai-schen ohne Ascorbinsäurezusatz ist auf einen höheren Oxidationsgrad zurückzuführen.

Der Trester ist der durch Pressen bzw. Zentrifugieren der Maische erhaltene Rückstand und besteht aus den Schalen, dem Kerngehäuse und den Apfelfasern. Man kann nach den Ergebnissen des Immunoblots der Extrakte aus den Trestern sowie den Ergebnissen aus der parallel durchgeführten EAST-Inhibition von einem geringeren, aber dennoch deutlich vorhandenen allergenen Potentials des Apfeltresters im Vergleich zur Maische ausgehen. Die Tatsache, daß der Trester noch allergen wirkt, wird in den Untersuchungen von FERNANDEZ-RIVAS ET AL. (1999) bestätigt. Sie können in ihren Untersuchungen sogar eine höhere allergene Potenz der Schalen gegenüber dem Fruchtfleisch feststellen. Denselben Befund machten ASERO ET AL. (1999) in ihren Untersuchungen. Sie vermuteten, daß eine Erschwerung der Extraktion von Mal d 1 durch das im Fruchtfleisch enthaltene Pektin, eine Erklärung hierfür sei. Darüber hinaus konnten LAHTI ET AL. (1980) eine hohe Allergenität der Apfelsamen, welche Bestandteil des Tresters sind, feststellen.

Im Immunoblot wird in keinem der Rohprodukte, die sich von den Endprodukten lediglich durch den fehlenden Erhitzungsschritt unterscheiden, die 18 kDa-Bande detektiert. Demgegenüber werden zwischen 37 und 67 kDa noch einige Banden sehr schwach visualisiert. Die Ergebnisse der EAST-Inhibition zeigen, daß alle Rohprodukte noch eine gewisse allergene Potenz besitzen. Jedoch sind die C_{50} -Werte deutlich höher als bei den Maischen, was auf eine Allergenitätsabnahme hindeutet. Diese Abnahme der allergenen Potenz kann auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden. Mit dem Trester, in welchem noch Allergenität nachgewiesen werden konnte, werden gleichzeitig Proteine abgetrennt, was eine Verminderung des allergenen Potentials der Rohprodukte zur Folge hat. Ferner werden durch den höheren Zellaufschlußgrad und die durch mehrere Prozeßstufen bedingten längeren Standzeiten der Zwischenstufen wiederum Polyphenol-Protein-Komplexe gebildet, wodurch ebenfalls eine Allergenitätsabnahme erfolgen kann (DREBORG 1988, VIETHS ET AL. 1992B). Bei den EAST-Inhibitionsversuchen erzielte das Feinmus die höchste maximale Inhibition. Die mittels EAST-Inhibition noch nachgewiesene Allergenität läßt sich vermutlich auf die im Immunoblot noch nachweisbaren Allergene im oberen MG-Bereich zurückführen.

Der Einfluß einer Pasteurisation auf das allergene Potential wird durch den Vergleich von Rohprodukten und Endprodukten gezeigt. Die Prozeßparameter ($T = 87^{\circ}\text{C}$, sofortige Rückkühlung) sind bei allen an der UH hergestellten Produkten gleich. Im Immunoblot der Extrakte aus den Endprodukten werden weder mit einem Poolserum noch unter Verwendung von Einzeleren Allergenbanden detektiert. Die Ergebnisse werden mittels Immunoblot-Inhibition abgesichert. Dabei zeigt sich, daß nur der Extrakt des Apü eine fast vollständige Inhibition des 18-kDa Allergens bewirkt. Die untersuchten Säfte vermögen die 18 kDa-Allergenbande kaum zu inhibieren. Dieses deutet auf eine höhere allergene Potenz des Apfelpürees gegenüber der der untersuchten Säfte hin. Auch bei der EAST-Inhibition zeigt das Apfelpüree mit 20 mg/L den geringsten C_{50} -Wert aller Endprodukte. Die vergleichsweise hohe allergene Potenz des Apfelpürees ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß bei der Püreeherstellung nicht der Trester abgetrennt wird, der eine vergleichsweise hohe allergene Potenz aufweist.

Auch verschiedene Apfelprodukte aus dem Handel werden bezüglich ihrer IgE-Bindungsaktivität untersucht. Dabei zeigt sich im Immunoblot, daß bei einigen Produkten noch mit einem allergenen Potential gerechnet werden kann. Die Extrakte der Apfelfringe, der Apfel

Chips, des „Baby-Apfel“ Apfelkompotts und des Apfelkompotts mit Stückchen zeigen eine deutliche Detektion der 18 kDa-Bande. Auch im Apfelmus ist diese Bande noch nachweisbar. Darüber hinaus ist das Hauptallergen des Apfels in den Extrakten des Direktsaftes und des naturtrüben Saftes sehr schwach detektiert worden. Die Immunoblot-Inhibition bestätigt diese Ergebnisse. Bei den EAST-Inhibitionsversuchen erzielten die Apfelringe die höchste Inhibition und zeigen, neben den Apfel Chips, den niedrigsten C_{50} -Wert. Das ist damit zu erklären, daß es sich hierbei um getrocknete Äpfel handelt, denen Schwefeldioxid als Antioxidationsmittel zugegeben wurde. Dadurch wird der native Zustand des Apfels nahezu beibehalten und die Bildung von Polyphenol-Protein-Komplexen unterbunden. Bei den Apfel Chips dagegen handelt es sich um fritierte Produkte, welche hohen Temperaturen unterworfen werden. Da bei der technischen Herstellung der Apfel Chips keine Zerkleinerung des Gewebes erfolgt, kann angenommen werden, daß die herrschenden Temperaturen bei der Produktion so kurz gehalten wurden, daß kein Verlust des allergenen Potentials erzielt wurde. Die Säfte des untersuchten Warenkorbs erzielten im Gegensatz zu den in der UH hergestellten Säften keine 50 %ige Inhibition der festphasengebundenen Allergene. Eine Erklärung hierfür ist beispielsweise die bereits beschriebene starke Sortenabhängigkeit des allergenen Potentials bei Äpfeln (VIETHS ET AL. 1994A). So wurden in der UH ausschließlich sortenreine Apfelsäfte aus *Golden Delicious* hergestellt, einer Varietät mit einem nachgewiesenen sehr hohen allergenen Potential. Üblicherweise werden in der Industrie jedoch Apfelsäfte aus Sorten mit einem geringeren allergenen Potential gewonnen. Außerdem kommen üblicherweise Säfte aus Konzentraten in den Handel, bei deren Herstellung zusätzliche Erhitzungsschritte erfolgen. Die Produkte Fruchtaufstrich und Apfelkonfitüre erzielten nur noch jeweils eine 15 %ige bzw. 7 %ige Inhibition der festphasengebundenen Apfelallergene. Diese geringen Werte können dadurch erklärt werden, daß diese Produkte Pektin enthalten, welches nach ASERO ET AL. (1999) die Extraktion von Mal d 1 erschwert.

Bezüglich der Hitzelabilität der Apfelallergene wurden bereits mehrere Untersuchungen durchgeführt. Allerdings wurden dabei die Äpfel längeren Erhitzungszeiten unterzogen. HSIEH ET AL. (1995) konnten in ihren Untersuchungen das Vorhandensein hitzelabiler Allergene in Äpfeln nachweisen. Sie erhitzten Äpfel der Sorte *Golden Delicious* 20 min auf 100 °C und stellten mittels Immunoblot fest, daß keine allergenen Banden mehr detektiert wurden. Jedoch konnten sie bei Apfelkonserven mittels immunologischer Untersuchungen eine Rest-allergenität nach Hitzebehandlung nachweisen. DREBORG und FOUCARD (1983) erhitzten Apfelscheiben für 30 min auf 175°C, wonach sie mittels Skin-Pricktest keine allergischen Reaktionen auf die Extrakte feststellen konnten.

Die Ergebnisse des Immunoblots und der EAST-Inhibition lassen auf ein noch bestehendes, jedoch geringes allergenes Potential der Endprodukte aus der UH und einiger der untersuchten Handelsprodukte schließen. In manchen Produkten aus dem Handel ist sogar noch eine deutliche allergene Aktivität zu erkennen. Es ist nicht auszuschließen, daß eine durch Hitzeeinwirkung verursachte Verminderung bzw. Eliminierung der allergenen Potenz von der Konsistenz des Untersuchungsgutes sowie von der Erhitzungsdauer abhängig ist.

5.3 Karotte

Die Charakterisierung der Karottenallergene erfolgte mit 17 unterschiedlichen Seren mit spezifischen IgE-Antikörpern gegen Karottenallergene. Im Immunoblot zeigt sich, daß 11 der 17 Seren eine Allergenbande bei etwa 17 kDa detektieren. Bei diesem Allergen handelt es sich um das Hauptallergen der Karotte Dau c 1, welches mit dem Hauptallergen der Birkenpollen Bet v 1 sowie dem Hauptallergen des Selleries Api g 1 assoziiert ist. Das Dau c 1 wurde bereits von HOFFMANN-SOMMERGRUBER ET AL. (1999) auf molekularer Ebene charakterisiert. Es besteht aus 154 Aminosäuren bei einem MG von 16049 Da. HOFFMANN-SOMMERGRUBER verifizierten außerdem mit Hilfe des gereinigten rekombinanten Dau c 1 die Existenz von gemeinsamen B-Zell-Epitopen bei Dau c 1, Bet v 1 und Api g 1.

Neben diesem Hauptallergen der Karotte werden mit den verwendeten Patientenseren diverse weitere, nicht genauer zuzuordnende Allergene im MG-Bereich von etwa 25 bis 100 kDa nachgewiesen. Diese Ergebnisse decken sich mit Studien verschiedener Autoren. So wiesen HELBLING ET AL. (1993) im Immunoblot eines Extraktes aus rohen Karotten mit dem Serum einer 48 jährigen Patientin insgesamt sieben Allergenbanden bei 17, 25, 32, 36, 41, 45 und 61 kDa nach. In einer weiteren Arbeit von HELBLING ET AL. (1994) ließen sich im Immunoblot mit Patientenseren von Karotten- und Salatallergikern insgesamt 14 verschiedene IgE-bindende Proteinbanden zwischen 13 und 98 kDa sowie > 113 kDa nachweisen. In einer spanischen Studie konnten GOMEZ ET AL. (1996) mit dem Serum einer 34 jährigen Patientin im Immunoblot von rohen Karotten lediglich eine einzelne Bande bei 18 kDa detektieren. Ebenso detektierten die vier von MONEO ET AL. (1999) eingesetzten Patientenseren lediglich ein einzelnes 18 kDa Allergen im nativen Karottenextrakt. QUIRCE ET AL. (1997) wiesen schließlich unter Verwendung von zwei Patientenseren im Immunoblot drei Allergenbanden bei 42, 31 und 23 kDa, sowie zwei weitere schwache Banden zwischen 87 und 66 kDa nach. Das Dau c 1 wurde von beiden Patientenseren nicht detektiert.

Bei der Betrachtung der zunächst mit den Karotten durchgeführten Erhitzungsversuche, wird deutlich, daß die Karottenallergene relativ stabil gegenüber thermischen Einflüssen sind. Dennoch lassen sich Unterschiede bei der unspezifischen Proteinfärbung des nativen und der erhitzten Extrakte erkennen. Im nativen Extrakt sind mittels Silberfärbung diverse Proteinbanden im Bereich von < 14 kDa bis 90 kDa zu erkennen. Besonders intensiv gefärbt ist dabei ein Protein bei 17 kDa, bei welchem es sich vermutlich um das Hauptallergen Dau c 1 handelt. HELBLING ET AL. (1993) wiesen mittels SDS-PAGE etwa 13 Proteine zwischen 17 und 61 kDa nach, von denen ebenfalls ein 17 kDa Protein besonders intensiv gefärbt ist. Die geringere Menge an detektierten Proteinen ist damit zu erklären, daß HELBLING ET AL. (1993) keine Silberfärbung sondern die weniger empfindliche Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung verwendeten.

In den erhitzten Karottenextrakten sind mittels unspezifischer Silberfärbung immer noch diverse Proteine zwischen 90 und 14 kDa nachweisbar, allerdings läßt die Intensität fast aller Banden nach, und einige Proteine werden nicht mehr detektiert. Ein Protein bei 35 kDa ist in den erhitzten Extrakten stärker gefärbt als im nativen Extrakt. Auch HELBLING ET AL. (1993) wiesen im Extrakt aus zehn Minuten bei 100 °C gekochten Karotten mittels Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung noch zehn Proteine nach, allerdings wurden sämtliche Proteine außer das 17 kDa Protein intensiver detektiert als im nativen Extrakt. Eine Erklärung für diese Diskrepanz liegt möglicherweise in den unterschiedlichen Färbemethoden.

Im Immunoblot zeigen die Extrakte aus den bei 100 °C im Wasser gekochten Karotten auch nach einer Erhitzungsdauer von 40 min noch ein erhebliches allergenes Potential. Es sind noch diverse Allergenbanden nachweisbar. Auch mittels EAST-Inhibition läßt sich keine Reduzierung des allergenen Potentials erkennen. Auch eine Behandlung der Karotten im Autoklaven führt zu keiner Verringerung der Allergenität in der EAST-Inhibition. Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu den wenigen bisher durchgeführten Untersuchungen des allergenen Potentials von erhitzten Karotten. So wiesen HELBLING ET AL. (1993) in 10 min gekochten Karotten mittels Immunoblot lediglich das 17 kDa Allergen nach, sechs weitere im nativen Extrakt detektierte Allergene konnten nach dem Erhitzen nicht mehr nachgewiesen werden. Auch in der RAST-Inhibition wird in der Studie von HELBLING ET AL. (1993) der native Karotenextrakt nur schwach durch den Extrakt aus den erhitzten Karotten inhibiert. Die maximale Inhibition beträgt dort 46 %. Auch GOMEZ ET AL. (1996) und QUIRCE ET AL. (1997) berichten von einer Eliminierung des allergenen Potentials von Karotten nach dem Kochen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, daß in den drei zitierten Studien lediglich jeweils das Serum eines einzelnen oder maximal zweier Individuen zur Bestimmung der allergenen Potenz herangezogen wird. Demgegenüber wird in dieser Arbeit ein aus 17 Patientenseren zusammengesetztes Poolserum verwendet. In diesem Poolserum sind auch Seren von stark sensibilisierten Patienten mit EAST-Klassen von 4 enthalten, die entsprechend eine große Menge an spezifischen IgE-Antikörpern aufweisen. Ein breites Patientenkollektiv wird auch in einer Arbeit von WÜTHRICH ET AL. (1990) verwendet. Bei 70 Patienten mit einer Sensibilisierung gegen Sellerie reduzierte sich die Anzahl positiver Pricktests gegen gekochte Karotten (30 min bei 100 °C) etwa um die Hälfte im Vergleich zur Häufigkeit bei rohen Karotten.

Auch bei der Untersuchung des allergenen Potentials unterschiedlicher Karottensäfte zeigt sich, daß in keinem der Säfte eine Eliminierung der Allergenität erreicht werden konnte. So hat beispielsweise der erste Schritt bei der Herstellung von Karottensäften, das 10 minütige Blanchieren bei 80 °C Wassertemperatur keinen Einfluß auf das allergene Potential. Dieses Ergebnis ist erwartungsgemäß, da die zuvor durchgeführten Erhitzungsversuche im 100 °C heißen Kochwasser auch keine Verringerung der Allergenität zur Folge haben. Aber auch weitere Verarbeitungsschritte, wie beispielsweise die Säuerung oder die Maischeenzymierung führen nicht zu einem Verlust des allergenen Potentials. Sogar in den sterilisierten Endprodukten ist noch eine deutliche allergene Aktivität nachweisbar. Hier unterscheiden sich allerdings wiederum die Ergebnisse des Immunoblots, in dem nach dem Sterilisieren nur noch vereinzelt Banden nachweisbar sind, von denen der EAST-Inhibition, in der die Kurvenverläufe der sterilisierten Säfte sich nur unwesentlich von denen der nativen Karotte unterscheiden. Die höhere Empfindlichkeit der EAST-Inhibition gegenüber dem Immunoblot könnte wiederum in der Entstehung kleinerer Allergenfragmente beim Erhitzungsvorgang begründet sein, die im Immunoblot nicht mehr erfaßt werden können. Die an den Karottensäften erlangten Ergebnisse decken sich mit Ergebnissen, von BRENNAN ET AL. (2000), die ähnliche Studien anhand von Pfirsichsäften und -nektaren durchführten. Diese Untersuchungen zeigen, daß das Hauptallergen des Pfirsichs Pru p 1 im Verlauf der Saftproduktion weder entfernt werden kann, noch kann seine allergene Aktivität reduziert werden. Nicht einmal eine Hitzebehandlung für 30 min bei 121 °C führt zu einer Verringerung des allergenen Potentials.

Bei der Betrachtung der Warenkorbprodukte zeigt sich ebenfalls eine hohe Stabilität der Karottenallergene gegenüber einer technologischen Verarbeitung. Sämtliche untersuchten Produkte zeigen zumindest in der EAST-Inhibition eine deutliche allergene Restaktivität. Allerdings variiert das allergene Potential der untersuchten Waren. So weisen beispielsweise die Extrakte aus den Tiefkühlprodukten praktisch keine Unterschiede zum nativen Extrakt auf. Das ist nicht verwunderlich, da die Tiefkühlung eine vergleichsweise schonende Behandlung ist, bei der keine Reduzierung des allergenen Potentials erfolgt. Diese Tatsache kann durch zur Zeit durchgeführte Studien am Beispiel von Litchis bestätigt werden. Auch die übrigen Produkte des Warenkorbs und darunter auch die verschiedenen kommerziell erhältlichen Karottensäfte zeigen zumindest in der EAST-Inhibition ein deutliches allergenes Restpotential, was in Analogie zu den in der UH hergestellten Säften steht.

5.4 Gesamtbetrachtung und Ausblick

Über die Stabilität von Lebensmittelallergenen während der technologischen Verarbeitung fehlen noch immer genauere Untersuchungen. Im allgemeinen werden die meisten Lebensmittel mit Ausnahme von Früchten und Gemüse in der Literatur als stabil gegenüber Verarbeitungsprozessen beschrieben (HEFLE 1996, LEHRER ET AL. 1996). Es sind bisher allerdings nur wenige Lebensmittelallergene detailliert auf ihre Stabilität hin betrachtet worden (VIETHS ET AL. 1997).

In dieser Arbeit wurden die pflanzlichen Lebensmittel Haselnuß, Apfel und Karotte untersucht. Trotz ihrer gemeinsamen Assoziation zu Birkenpollen, weisen die drei Lebensmittel deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Stabilität während der Verarbeitung auf. Während beim Apfel bereits Erhitzungsprozesse wie die Pasteurisation ausreichen, um das allergene Potential weitgehend zu eliminieren, erweisen sich Haselnüsse und Karotten als deutlich stabiler.

Bei der Haselnuß erreicht man nur durch starke thermische Einflüsse eine Reduzierung des allergenen Potentials, weshalb sie als verstecktes Allergen in diversen Süßwaren weiterhin eine Rolle spielen wird und für Allergiker eine Gefahr darstellt (VIETHS ET AL. 1994B). Im Fall der Haselnuß könnte zur weiteren Reduzierung des allergenen Potentials intensiveren Erhitzungsprozessen eine Bedeutung zukommen.

Auch die Karottenallergene zeigen eine bemerkenswerte Resistenz gegenüber technologischen Prozessen, weshalb auch verarbeitete Karottenprodukte für Allergiker ein Problem darstellen. Weitere Ansätze zur Verminderung der Allergenität von Karottensäften wären beispielsweise eine Erhöhung der Sterilisationstemperatur sowie eine Verlängerung der Erhitzungsdauer. Ebenso wäre eine Ultrafiltration der Säfte durch geeignete Membranen, wie sie von BRENNAN ET AL. (2000) exemplarisch an Pfirsichsäften durchgeführt worden ist, denkbar. Auch eine partielle Hydrolyse der Karottenproteine erscheint denkbar.

6 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Untersuchung verschiedener verarbeitungsbedingter Einflüsse auf die Allergenität der birkenpollenassoziierten Lebensmittel Haselnuß, Apfel und Karotte. Das allergene Potential der aus den nativen und verarbeiteten Früchten und Nüssen gewonnenen Proteinextrakte wurde mittels elektrophoretischer und immunologischer Verfahren untersucht.

Als Hauptallergene der Haselnuß wurden mit dem zur Verfügung stehenden Kollektiv an Patientenseren zwei Proteine mit MG von 14 kDa und 18 kDa, sowie diverse Minorallergene im oberen (30-67 kDa) sowie im unteren MG-Bereich (< 10 kDa) identifiziert. Die Untersuchung der Haselnußsorten *Barcelona*, *Levantiner*, *Neapler*, *Runde Römer* und *Contorta* zeigte ein vergleichbar hohes allergenes Potential aller Sorten. Es ergaben sich nur geringe Unterschiede hinsichtlich der im Immunoblot detektierten Allergene sowie des mittels EAST-Inhibition bestimmten allergenen Gesamtpotentials.

Die Haselnußallergene erwiesen sich in Erhitzungsversuchen stabil gegenüber Temperaturen bis 155 °C bei einer Erhitzungsdauer von 15 min. Ein Minorallergen mit einem MG von < 10 kDa wurde auch noch bei höheren Temperaturen detektiert. Bei der Erhitzung war für einen Allergenitätsverlust die maximal angewandte Temperatur von Bedeutung, die Erhitzungsdauer von bis zu 90 min hatte bei einer Temperatur von 100 °C keinen Einfluß auf das allergene Potential.

Betrachtet man die Stabilität der Haselnußallergene hinsichtlich einer enzymatischen Verdauung, so erwiesen sich die Allergene gegenüber der Spaltung durch Pepsin zunächst als relativ stabil. Nach einer 30minütigen Behandlung waren im Gesamtproteinmuster bereits deutliche Unterschiede zum unbehandelten Proteinextrakt zu erkennen. Die immunologischen Bestimmungen zeigten jedoch nur eine geringe Abnahme des allergenen Potentials. Nach einem 240 minütigen Pepsinverdau verringerte sich die Allergenität stark. Bei der in vitro simulierten Intestinalverdauung der Haselnuß mittels Pankreatin zeigte sich ein nahezu unverändertes allergenes Potential nach 30 min, bei einer 60minütigen Behandlung sank die Allergenität stark ab. Die Enzyme Trypsin, Elastase und Protease führten bereits nach einem Verdau von 30 min zu einer fast vollständigen Eliminierung des allergenen Potentials.

Von den untersuchten Haselnußprodukten aus dem Handel war lediglich bei dem Produkt Müsli-Riegel keine Reduzierung der allergenen Potenz verglichen mit der nativen Haselnuß feststellbar. In allen übrigen Produkten konnte zumindest ein unterschiedlich starkes allergenes Restpotential nachgewiesen werden, das vermutlich durch die unterschiedliche Verarbeitung seitens der Hersteller erklärbar ist.

Beim Apfel wurde das in der Literatur bereits ausführlich beschriebene Mal d 1 mit einem MG von 18 kDa als Hauptallergen bestätigt. Weitere Proteine mit MG von 37 kDa und 43 kDa haben ebenfalls eine Bedeutung als Allergene. Ferner wurden diverse Minorallergene im Bereich zwischen 30 kDa und 67 kDa identifiziert.

Zur Untersuchung einzelner Produktionsschritte der Apfelsaftherstellung wurden mittels verschiedener Basistechnologien zwei Preßsäfte, drei Dekantersäfte, ein Apfelpüree sowie verschiedene Apfelmaischen hergestellt. Nahezu alle untersuchten Zwischenstufen wiesen ein allergenes Restpotential auf. Die nach verschiedenen Standzeiten aus den Apfelmaischen

gewonnenen Proteinextrakte unterschieden sich im Immunoblot nur unwesentlich von dem aus der nativen Frucht gewonnenen Proteinextrakt. Bei Zunahme der Maischestandzeit von 0 bis 3 Stunden waren keine Veränderungen im Bandenmuster der Apfelallergene erkennbar. Auch ein Zusatz von Ascorbinsäure zur Apfelmaische führte im Immunoblot zu keiner erkennbaren Veränderung des allergenen Potentials. Die Ergebnisse der EAST-Inhibition zeigten nach Ascorbinsäurezugabe mit zunehmender Standzeit ein konstant hohes allergenes Potential der Maischen, ohne Ascorbinsäurezusatz ergab sich eine Verringerung der allergenen Aktivität mit zunehmender Standzeit. Das allergene Potential der aus den Maischen nach 3 Stunden Standzeit gewonnenen pasteurisierten Preßsäfte wurde auf ein Minimum reduziert.

In den Extrakten aus den nach dem Pressen bzw. Dekantern erhaltenen Rohsäften wurde das Hauptallergen Mal d 1 im Immunoblot nicht mehr nachgewiesen, in den Endprodukten konnten mittels Immunfärbung keine Banden mehr detektiert werden. Auch mittels EAST-Inhibition wurde in den Endprodukten lediglich eine geringe Restallergenität nachgewiesen. Entscheidend für die Eliminierung des allergenen Potentials der fluiden Apfelprodukte ist demnach der Pasteurisationsschritt.

Bei der Untersuchung eines Warenkorbes mit verschiedenen Handelsprodukten zeigte sich, daß einige der ausgewählten Produkte, wie Apfelmus, Apfelkompott, Apfelringe und Apfelpips, im Immunoblot und in der EAST-Inhibition ein deutliches allergenes Potential aufwiesen, während insbesondere in den flüssigen Produkten keine Allergenität mehr nachweisbar war.

Als Hauptallergen der Karotte konnte das Dau c 1 mit einem MG von 17 kDa betätigt werden. Zusätzlich wurden diverse Allergene im höheren MG-Bereich zwischen 25 und 90 kDa nachgewiesen.

Die Karottenallergene erwiesen sich in Erhitzungsversuchen bei Temperaturen von 100 °C auch nach 40 min als stabil. Auch die Erhitzung bei 121 °C und 1 bar Überdruck im Autoklaven führte zu keiner Eliminierung der allergenen Aktivität.

Analog zum Apfel wurden ebenfalls diverse Karottensäfte hergestellt, wobei als Basistechnologien unterschiedliche Erhitzungsverfahren, wie Blanchieren, Pasteurisation und Sterilisation dienten. Außerdem wurden Säuerung und Schälung sowie eine Maischebehandlung mit zwei unterschiedlichen Enzymen berücksichtigt. Bei der Untersuchung einzelner Produktionsschritte der Karottensafterstellung wiesen alle Zwischenstufen ein allergenes Restpotential auf. Auch mehrfache Pasteurisationen und Sterilisation führten zu keiner Eliminierung des allergenen Potentials. Die Säuerung mit Citronensäure und die Enzymierung mit den Enzymen Pektinlyase und Pektatlyase hatten keinen Einfluß auf die Allergenität der Karotte. Bei der Untersuchung eines Warenkorbes zeigte sich in allen Produkten ein deutliches allergenes Restpotential.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die drei untersuchten birkenpollenassoziierten Lebensmittel Haselnuß, Apfel und Karotte unterschiedlich stabil gegenüber verarbeitungsbedingten Einflüssen sind. Während beim Apfel bereits durch kurzzeitige Erhitzungsprozesse eine weitgehende Eliminierung des allergenen Potentials erreicht wird, weisen die Allergene der Haselnuß und der Karotte eine höhere Stabilität auf. Auch die einzelnen Allergene dieser Lebensmittel variieren untereinander bezüglich ihrer Stabilität.

The aim of the present study was the investigation of different processing-conditioned influences on the allergenicity of the birch pollen associated foodstuffs hazelnut, apple, and carrot. The allergenic potency of protein extracts obtained from native and processed fruits, vegetables, and nuts was determined by means of electrophoretic and immunological methods.

With the available collective of patients' sera two proteins with molecular weights of 14 kDa and 18 kDa were identified as major hazelnut allergens. In addition various minor allergens with molecular weights between 30 kDa, 67 kDa and < 14 kDa were detected. The investigation of the hazelnut varieties *Barcelona*, *Levantiner*, *Neapler*, *Runde Römer*, and *Contorta* revealed a comparably high allergenic potency. Only small differences resulted with regard to both the detection in the immunoblot and the total allergenic potential determined by EAST-inhibition.

The hazelnut allergens proved to be stable to a temperature of 155 °C with a heating time of 15 min. A minor allergen with a molecular weight of < 14 kDa was even detected at higher temperatures. The decisive factor for the decrease of the allergenicity after heating was the maximum applied temperature. A heating time up to 90 min at a temperature of 100 °C had no influence on the allergenic potential.

There were distinct differences of the total protein patterns of the hazelnut extract after 30 min peptic treatment compared with the native extract. However the immunological determinations revealed only a slight decrease of the allergenic potential. After 240 min peptic digestion the allergenicity was strongly decreased. The simulated intestinal digestion with pancreatin resulted in a nearly unchanged allergenic potential, after 60 min treatment the IgE-binding activity strongly decreased. The digestion of hazelnut proteins with the enzymes trypsin, elastase, and protease already resulted in an almost complete elimination of the allergenic potential after 30 min.

With regard to the examined hazelnut products from the trade only in the case of the muesli bar no reduction of the allergenic potential was recognized compared to the native hazelnut. In all remaining products at least a residual allergenic potential of varying degrees could be proven, which is probably explainable by different processing conditions.

In the apple extract Mal d 1 with a molecular weight of 18 kDa, which was already described in detail in the literature, was acknowledged as the major allergen. Further proteins with molecular weights of 37 kDa and 43 kDa were also of importance as allergens. Furthermore various minor allergens within the range between 30 kDa and 67 kDa were identified.

For the investigation of individual steps of apple juice production two pressed juices, three decanted juices, and one apple puree as well as apple mash were manufactured by means of different fundamental technologies. Almost all examined intermediate stages indicated a residual allergenic potential. The protein extracts obtained from the mash after different storage times differed only insignificantly from the extracts of the native fruit in the immunoblot. With increase of the storage time of the mash from 0 to 3 hours no modifications in the band patterns of the apple allergens were detectable. Not even an addition of ascorbic acid to the mash led to a recognizable modification of the allergenic potential in the immunoblot. The results of EAST inhibition showed a constantly high allergenic potential of the mash with increasing storage time after addition of ascorbic acid. Without the addition of ascorbic acid a decrease of the allergenic activity with increasing storage times could be shown. The allergenic potential of the pressed juices obtained from the musts after 3 hours storage time was

reduced to a minimum. Therefore pasteurisation is the decisive factor for the elimination of the allergenicity of the fluid apple products.

In the extracts from the raw juices received after pressing or decanting, the main allergen Mal d 1 was no longer proven by means of immunoblot. In the final products no allergen bands were detectable by immunostaining. Even by means of EAST inhibition only a residual allergenic activity could be shown in the final products.

The investigation of different commercial products revealed that some of the selected products, such as apple puree, apple compote, apple rings, and apple chips, showed a distinct allergenic potential in the immunoblot and in the EAST inhibition. In the liquid products no allergenic activity was detectable.

Dau c 1 with a molecular weight of 17 kDa could be proved as the main allergen of carrot. Additionally various allergens within the higher molecular weight area between 25 kDa and 90 kDa were identified.

In heating trials the carrot allergens showed a stability even after 40 min at temperatures of 100 °C. Not even a heating up to 121 °C and 1 bar excess pressure in autoclaves led to an elimination of the allergenic activity.

Similarly to the apple various carrot juices were manufactured using different fundamental heating procedures, such as blanching, pasteurisation, and sterilisation. Additionally acidification and peeling as well as mash treatment with two different enzymes were considered. During the investigation of individual steps of the carrot juice production all intermediate stages indicated a residual allergenic potential. Not even pasteurisation and sterilisation led to an elimination of the allergenic activity. Neither acidification with citric acid nor the treatment with the enzymes pectin lyase and pectate lyase had any influence on the allergenic potential of the carrot.

The investigation of commercially purchased carrot products revealed a residual IgE-binding activity in each product.

In summary it can be stated that the three examined birch pollen associated foodstuffs hazelnut, apple and carrot are differently stable with regard to process-conditioned influences. Whilst in the case of the apple an almost complete elimination of the allergenic potential is achieved already by short heating processes, the hazelnut and carrot allergens are more stable to heat. The individual allergens of these foodstuffs also vary among themselves concerning their stability.

7 ANHANG

7.1 Gewinnung der Patientenseren

- 10 mL Blut werden mit einer Monovette abgenommen
- nach 30 min Abkühlen wird bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert
- das überstehende Serum wird in Vials abgefüllt
- die Seren werden bei –80 °C gelagert

7.2 Proteinextraktion

7.2.1 Tieftemperaturextraktion

Die Tieftemperaturextraktion erfolgt modifiziert nach VIETHS ET AL. (1992A).

Lösungen

Aceton-Ether-Gemisch: Aceton + Diethylether (v:v = 1:1)
PBS: 1 Puffertablette in dest. Wasser lösen, ad 200 mL
(entspricht 0.01 mol/L K_2HPO_4 und 0.15 mol/L NaCl, pH = 7.4)

Gewinnung des Acetonpulvers

- 1000 mL Aceton in einem Stahlbecherglas bei –80 °C über Nacht vorkühlen
- 200 g des Untersuchungsguts einwiegen und langsam zu 400 mL gekühltem Aceton geben
- erneut bei -80 °C kühlen bis $T < -40$ °C
- Gemisch mit Ultraturrax im Stahlbecherglas homogenisieren
- Homogenat in 1000-mL-Glasflasche überführen, Stahlbecherglas und Turrax mit wenig gekühltem Aceton waschen und Waschlösung ebenfalls in Glasflasche geben
- Homogenat in Tiefkühltruhe über Nacht bei -20 °C äquilibrieren lassen
- Homogenat am folgenden Tag über großem Büchnertrichter absaugen
- 3 x mit je ca. 100 mL Aceton ($T = -20$ °C) und 3 x mit je ca. 100 mL Diethylether/Aceton (1:1, $T = -20$ °C) waschen
- Rückstand trockensaugen, Filtrat verwerfen
- Rückstand über Nacht lyophilisieren, wobei man das Acetonpulver erhält

Extraktion aus dem Acetonpulver

- ca. 1-2 g Acetonpulver werden je nach zu erwartender Proteinkonzentration mit 15-30 mL PBS (1 Tablette in 200 mL bidest. Wasser) versetzt
- mit 1 mol/L NaOH pH-Wert auf ca. 7 zurückbringen
- 1 Stunde unter Eiskühlung rühren lassen
- Homogenat bei 10000 U/min und 4 °C 60 min zentrifugieren
- Lösung filtrieren und portionieren (je 1 oder 2 mL in 4-mL-Vials)
- Vials über Nacht lyophilisieren und bei -20 °C lagern

Modifizierungen

Die oben beschriebene Tieftemperaturextraktion wird bei allen halbfesten und festen Zwischenstufen der Apfel- und Karottensaftproduktion durchgeführt. Außerdem werden alle halbfesten und festen Produkte der Warenkörbe von Apfel und Karotte auf diese Weise extrahiert. Ist der Proteingehalt der extrahierten Lösungen nicht ausreichend für die elektrophoretischen Untersuchungen, kann gegebenenfalls eine Konzentrierung erfolgen, indem das erhaltene Lyophilisat in einem geringeren Volumen Wasser aufgenommen wird als die Ausgangslösung.

Bei fluiden Apfel- und Karottenprodukten ist eine Gewinnung des Acetonpulvers nicht möglich. Daher erfolgt eine vereinfachte Proteinextraktion. Die fluiden Produkte werden zunächst lyophilisiert. Aus dem Lyophilisat erfolgt die Proteinextraktion analog der oben beschriebenen Extraktion aus dem Acetonpulver.

7.2.2 Extraktion der Haselnüsse und Haselnußprodukte

- 50 g Haselnußstücke werden eingewogen und in der Moulinette fein zerkleinert
- das Homogenat wird 3 mal mit jeweils 100 mL n-Hexan entfettet
- 0.2-2 g entfettetes Homogenat werden mit 10-30 mL PBS-Lösung versetzt
- mit 0.1 mol/L HCl wird gegebenenfalls pH auf 7 zurückgebracht
- 15 min im Ultraschallbad extrahieren
- Homogenat bei 10000 U/min und 4 °C 60 min zentrifugieren
- Lösung filtrieren und portionieren (je 1 oder 2 mL in 4-mL-Vials)
- Vials über Nacht lyophilisieren und bei -20 °C lagern

Modifizierungen

Haselnußprodukte, bei denen eine Isolierung der Nüsse nicht möglich ist, weil die Nüsse als homogenes Gemisch vorliegen, werden im Ganzen homogenisiert, entfettet und wie oben beschrieben mit PBS extrahiert.

7.2.3 Extraktion der enzymatisch behandelten Haselnüsse

- 10 g Haselnußkerne werden eingewogen und in der Moulinette fein zerkleinert
- Homogenat wird in einen 250 mL Iodzahlkolben überführt
- 50 mg des jeweiligen Enzyms sowie 50 mL PBS-Lösung hinzufügen
- pH-Wert (1.2 für Pepsin, 8.8 für Elastase, 7.5 für Trypsin, Pankreatin und Protease) mit 0.1 mol/L NaOH oder 0.1 mol/L HCl einstellen
- bei 37 °C rühren und nach 30, 60 und 240 min 10 mL Lösung abnehmen
- abgenommene Suspension 20 min bei 90 °C erhitzen
- nach dem Abkühlen 30 min bei 10000 U/min und 4 °C zentrifugieren
- Lösung abfiltrieren und in 4 mL Vials portionieren
- über Nacht lyophilisieren und bei -20 °C lagern

7.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach der Methode von BRADFORD (1976).

Lösungen

Lösung 1: 10 mL Ethanol (96 %) + 20 mL Phosphorsäure (85 %) +
35 mg Coomassie-Brilliant-Blau G-250

Lösung 2: 3 mL Lösung 1 + 3 mL Phosphorsäure (85 %) + 1.5 mL Ethanol (96 %)
ad 50 mL mit bidest. Wasser
bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß aufbewahren

Standardlösungen:	400 µg Rinderserumalbumin/mL	50 µg Rinderserumalbumin/mL
	300 µg Rinderserumalbumin/mL	20 µg Rinderserumalbumin/mL
	200 µg Rinderserumalbumin/mL	10 µg Rinderserumalbumin/mL
	100 µg Rinderserumalbumin/mL	

Durchführung

- 50 µL Standard- bzw. Probelösung in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte geben (für den Blindwert 50 µL bidest. Wasser)
- 200 µL Lösung 2 hinzugeben
- im Mikroplattenreader 10 s schütteln und anschließend bei 590 nm gegen Blindwert vermessen

Die Ergebnisse der Proteinbestimmung aller verwendeten Extrakte sind in Kapitel 7.12 aufgeführt.

7.4 Enzymallergosorbent-Test (EAST)

7.4.1 Herstellung der Allergenscheiben

Die Herstellung der Allergenscheiben erfolgt nach CESKA & LUNDKVIST (1972) mit einer Modifizierung nach MÖLLER ET AL. (1997).

Bromcyanaktivierung

- in einem Dreihalskolben, versehen mit 250-mL-Tropftrichter und Thermometer, 15 g Papierscheiben (ca. 5000 Stück) in 150 mL bidest. Wasser quellen lassen
- inzwischen 15.0 g Bromcyan in 450 mL bidest. Wasser unter Rühren lösen (Abzug, Schutzmaske)
- Bromcyanlösung zur Papierscheibensuspension hinzugeben
- durch Zutropfen von 1 mol/L NaOH pH-Wert auf 10-10.5 einstellen und solange einhalten, bis 75 mL verbraucht sind, wobei der pH-Wert 11.5 nicht übersteigen darf, ansonsten ist der Versuch zu wiederholen

- Lösung über einen Büchnertrichter absaugen
- Scheiben insgesamt 12 x mit je 0.005 mol/L NaHCO_3 -Lsg. (2.1 g NaHCO_3 ad 10 L dest. Wasser) waschen
- je 2 min stehen lassen, absaugen
- anschließend nacheinander 2 x mit je 375 mL folgender Lösungen waschen:
dest.Wasser; Aceton:Wasser (25:75, v:v); Aceton:Wasser (50:50, v:v); Aceton:Wasser (75:25, v:v); Aceton
- bromcyanaktivierte Scheiben im Exsikkator trocknen
- Scheiben bei -20 °C lagern

Lösungen zur Kopplung der Extrakte

Inkubationspuffer: 1) 15.6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 1000 mL dest. Wasser
 2) 8.4 g NaHCO_3 + 1000 mL dest. Wasser
 3) 190 mL 1) + 803 mL 2) mischen, pH messen, mit 4 mol/L HCl auf 7.4 einstellen
 4) in 800 mL Gemisch 3) 3 g Rinderserumalbumin, 37.22 g EDTA, 2 g NaN_3 und 2 mL Tween 20 lösen, mit 4 mol/L HCl auf pH 7.4 bringen

0.5 M NaHCO_3 : 21.0 g NaHCO_3 ad 500 mL dest. Wasser, pH auf 8.4 einstellen

0.1 M NaHCO_3 : 4.2 g NaHCO_3 ad 500 mL dest. Wasser, pH auf 9.5 einstellen

Ethanolaminpuffer: 5 mL Ethanolamin ad 500 mL dest. Wasser, mit 1 mol/L HCl auf pH 9.2 einstellen

0.1 M Natrium-acetatpuffer: 4.2 g Natriumacetat ad 500 mL dest. Wasser, mit 4 mol/L HCl auf pH 4.0 einstellen

Kopplung der Extrakte

- Extrakte in bidest. Wasser aufnehmen und so verdünnen, daß der Proteingehalt ca. 20 µg/mL beträgt
- 100 mL Extraktionslösung in 250-mL-Jodzahlkolben füllen
- ca. 300 bromcyanaktivierte Scheiben (ca. 0.6 g) dazugeben
- über Nacht bei 4 °C rühren (Magnetrührer)
- Überstand mit Pasteurpipette absaugen (Wasserstrahlpumpe)
- einmal mit 100 mL 0.5 M NaHCO_3 waschen, absaugen
- 100 mL Ethanolaminpuffer dazugeben
- 2 h bei Raumtemperatur auf dem Magnetrührer rühren
- absaugen und wie folgt waschen:
- 3 x mit 100 mL 0.1 M NaHCO_3 -Lsg
- 2 x mit 100 mL 0.1 M Natriumacetatlösung
- 2 x mit 100 mL 0.5 M NaHCO_3 -Lsg
- letzte Waschlösung gründlich absaugen

- mit 100 mL dest. Wasser spülen und in 250-mL-Rundkolben überführen, Wasser gründlich absaugen
- 2 h in der Tiefkühltruhe einfrieren
- Papierscheiben über Nacht lyophilisieren
- Scheiben bei -20 °C lagern

7.4.2 EAST-Bestimmung

Es wird für die EAST-Bestimmung ein Testkit der Firma Allergopharma (Reinbek, Deutschland) verwendet.

Lösungen

Waschlösung:	entsprechend dem Testkit (enthält Tween 20, PBS)
Konjugatlösung:	entsprechend dem Testkit (enthält anti-Human-IgE, konjugiert mit alkalischer Phosphatase)
Substratlösung:	entsprechend dem Testkit (enthält MgCl_2)
Färbetabletten:	entsprechend dem Testkit (enthalten p-Nitrophenylphosphat)
Stopplösung:	entsprechend dem Testkit (1 mol/L NaOH)
Standardallergenscheiben:	festphasengekoppelter Lieschgrasextrakt
Standardlösungen:	Kalibrierreihe mit vier Seren A = 0.35 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-KLASSE 1) B = 0.7 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-KLASSE 2) C = 3.5 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-KLASSE 3) D = 17.5 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-KLASSE 4)

Durchführung

- für die Bestimmung benötigte Cellulosescheiben in Inkubationspuffer (vgl. 7.4.1) tauchen und anschließend auf Filterpapier trocknen
- je eine Scheibe in eine Kavität einer Mikrotiterplatte legen
- je 50 µL Patientenserum bzw. Kontrollserum auf die Allergenscheiben und je 50 µL der Standardseren auf die Lieschgrasscheiben geben
- Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und 3 h bei Raumtemperatur oder 1 h bei 37 °C unter Lichtabschluß inkubieren
- je 250 µL Waschlösung zupipettieren, nach 10 min absaugen; Waschvorgang insgesamt 3 x durchführen
- je 50 µL Konjugatlösung in jede Kavität geben

- Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und über Nacht bei Raumtemperatur oder 3 h bei 37 °C unter Lichtabschluß inkubieren
- je 250 µL Waschlösung zupipettieren, nach 10 min absaugen; Waschvorgang insgesamt 3 x durchführen
- 200 µL Färbelösung (1 Tablette in 5 mL Substratlösungsmittel gelöst) in jede Kavität geben sowie zusätzlich als Blindwert zwei leere Kavitäten befüllen
- Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und 1 h im Trockenschrank bei 37 °C inkubieren
- je 100 µL Stopplösung (1 mol/L NaOH) zupipettieren, Platte schütteln (ELISA-Reader)
- aus jeder Kavität 250 µL in je eine Kavität einer weiteren Mikrotiterplatte füllen
- bei 405 nm photometrisch vermessen

Einteilung der EAST-Klassen

EAST-Klasse 0:	0-0.35	U/mL
EAST-Klasse 1:	0.35-0.70	U/mL
EAST-Klasse 2:	0.70-3.50	U/mL
EAST-Klasse 3:	3.50-17.50	U/mL
EAST-Klasse 4:	> 17.50	U/mL

Die Quantifizierung des Gehalts an spez. IgE in den Patientenseren erfolgt über eine lineare Regression anhand einer Kalibrierreihe.

7.5 EAST-Inhibition

Die EAST-Inhibition erfolgt modifiziert nach MÖLLER ET AL. (1997) unter Verwendung eines Testkits der Firma Allergopharma (Reinbek, Deutschland).

Lösungen

Waschlösung, Konjugatlösung, Substratlösung, Färbetabletten und Stopplösung entsprechend dem Testkit (vgl. 7.4)

Allergenverdünnungslösung: 1 g Rinderserumalbumin + 500 µL Tween 20, ad 100 mL mit PBS-Lösung

Ovalbumin-Lösung: 10 mg OA-Lösung ad 10 mL Allergenverdünnungslösung

Durchführung

- alle Messungen werden als Doppelbestimmungen durchgeführt
- in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte werden jeweils eine Allergenscheibe des zu untersuchenden Lebensmittels gegeben, zusätzlich werden folgende Lösungen einpipettiert:
- je 50 µL unterschiedliche konzentrierte Inhibitionslösung oder 50 µL Allergenverdünnungslösung (kein Inhibitor (B_0) oder 50 µL Ovalbumin-Lösung (unspezifische Inhibition) oder 100 µL Allergenverdünnungslösung (nichtspezifische Bindung (NSB))

- zusätzlich werden je 50 µL mit Allergenverdünnungslösung verdünntes Serum (Verdünnung: 1 + 2) in die Kavitäten gegeben (außer bei Überprüfung der NSB)
- Mikrotiterplatte im Plattenreader schütteln und mit Parafilm abdecken und 3 h bei 37 °C unter Lichtabschluß inkubieren
- nach dem Absaugen je 250 µL Waschlösung zupipettieren, nach 10 min erneut absaugen; Waschvorgang insgesamt 3 x durchführen
- je 50 µL mit Allergenverdünnungslösung verdünnte Konjugatlösung (Verdünnung: 1+1) in die Kavitäten geben
- Mikrotiterplatte im Plattenreader schütteln, mit Parafilm abdecken und über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß inkubieren
- nach dem Absaugen je 250 µL Waschlösung zupipettieren, nach 10 min erneut absaugen; Waschvorgang insgesamt 3 x durchführen
- 100 µL Färbelösung (1 Tablette in 5 mL Substratlösung) in jede Kavität geben
- 1 h im Trockenschrank bei 37 °C inkubieren
- je 200 µL Stopplösung (1 mol/L NaOH) zupipettieren
- nach dem Umpipettieren bei 405 nm photometrisch bestimmen

Auswertung

Die Berechnung der prozentualen Inhibition erfolgt mit folgender Gleichung:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{B_0 - B}{B_0 - \text{NSB}} \cdot 100$$

B: Meßwert der einzelnen Inhibitionsstufen

Bo: Meßwert ohne Inhibitorzusatz

NSB: nichtspezifische Bindung

7.6 SDS-PAGE (NuPAGE™)

Die NuPAGE™ erfolgt mit Fertiggelele und Fertiglösungen der Firma Novex (San Diego, CA, USA) entsprechend deren Vorschriften. Die Probenvorbereitung erfolgt nach VIETHS ET AL. (1992B)

Probenvorbereitung

- | | |
|------------------------|---|
| Probenpuffer (pH 6,8): | 3.03 g Tris
2.5 mL β-Mercaptoethanol
5.0 mL Glycerin
2.0 g SDS
0.01 g Bromphenolblau
150 µL Pyronin Y-Lösung (1 %ig in Wasser, v:v)
mit 40 mL bidest. Wasser versetzen
mit 4 mol/L HCl auf pH 6.8, ad 50 mL mit bidest. Wasser |
|------------------------|---|
- lyophilisierte Extrakte in bidest. Wasser rekonstituieren und in demselben Volumen Probenpuffer bzw. bei geringem Proteingehalt direkt im Probenpuffer aufnehmen
 - Proben 3 min bei 90 °C im Wasserbad reduzieren

Tab. 7.1: Zusammensetzung der Molekulargewichtsmarker

Marker 1		Marker 2	
Protein	Molekulargewicht	Protein	Molekulargewicht
Phosphorylase b	94 kDa	Myoglobin	16.9 kDa
BSA	67 kDa	Myoglobin I + II	14.4 kDa
Ovalbumin	43 kDa	Myoglobin I + III	10.7 kDa
Carboanhydrase	30 kDa	Myoglobin I	8.2 kDa
Trypsininhibitor	20.1 kDa	Myoglobin II	6.2 kDa
α -Lactalbumin	14.4 kDa	Myoglobin III	2.5 kDa

Die Proteingemische der Molekulargewichtsmarker werden in 1 mL Probenpuffer aufgenommen und reduziert.

Lösungen und Gelzusammensetzungen

1) Elektrodenpuffer 97.6 g 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
 (Bis-Tris gepufferte NuPAGE™): 60.6 g Tris Base
 10.0 g SDS
 3.0 g EDTA
 ad 500 mL mit bidest. Wasser
 Lösung vor Gebrauch 1:20 mit bidest. Wasser verdünnen

10 % Bis-Tris-Gel:
 (Fertiggel) 10 % Totalacrylamidkonzentration
 Gelmaße 8 cm x 8 cm x 1 mm

2) Elektrodenpuffer 89.5 g Tricin
 (Tricin gepufferte NuPAGE™): 60.5 g Tris Base
 10.0 g SDS
 ad 500 mL mit bidest. Wasser
 Lösung vor Gebrauch 1:10 mit bidest. Wasser verdünnen

16 % Tricin-Gel:
 (Fertiggel) 16 % Totalacrylamidkonzentration
 Gelmaße 8 cm x 8 cm x 1 mm

Durchführung

- Gelkassette der Verpackung entnehmen und Klebestreifen von der Unterseite entfernen
- vorsichtig den Kamm aus der Gelkassette herausziehen
- Gelkassette in der Elektrophorese Kammer (Xcell II Mini Cell) plazieren
- Elektrodenpuffer-Kammern mit Elektrodenpuffer füllen
- Mit einer HPLC-Spritze Proben in die Vertiefungen eintragen
- Elektrophoresekammer schließen und Spannung anlegen
- den Lauf beenden, wenn die Farbstoffe aus dem Probenpuffer an der Anode angelangt sind
- Gelkassette entnehmen, mit einem Novex-Spatel aufbrechen und vorsichtig das Gel herauslösen

Geräteeinstellungen:

- bei Verwendung eines Bis-Tris Gels wird eine konstante Spannung von 200 V für etwa 40 min angelegt
- bei Verwendung eines Tricin-Gels wird eine konstante Spannung von 125 V für etwa 90 min angelegt

7.7 Semidry-Blotting

Die Methode erfolgt nach KYHSE-ANDERSEN (1984).

Lösungen

Anodenpuffer I (pH 10.4):	18.15 g Tris + 0.05 g NaN_3 + 100 mL Ethanol
0.3 M Tris, 20 % Ethanol	ad 500 mL mit bidest. Wasser

Anodenpuffer II (pH 10.4):	1.52 g Tris + 0.05 g NaN_3 + 100 mL Ethanol
0.025 M Tris, 20 % Ethanol	ad 500 mL mit bidest. Wasser

Kathodenpuffer (pH 7.6):	2.6 g 6-Aminohexansäure + 0.05 g SDS
0.04 M 6-Aminohexansäure,	+ 0.05 g NaN_3 + 100 mL Ethanol
0.01 % SDS, 20 % Ethanol	ad 500 mL mit bidest. Wasser

Durchführung

- Graphitkathode mit bidest. Wasser anfeuchten
- 6 Lagen blaue Haushaltstücher mit Kathodenpuffer tränken, auf Kathode legen
- Gel aus Kassette entnehmen und auf blaue Haushaltstücher legen
- Blotmembran in Anodenpuffer II tränken, auf Gel legen
- Stellen, an denen kein Transfer erfolgt, mit Kunststoffstreifen belegen
- 2 Lagen rote Haushaltstücher in Anodenpuffer II tränken, auf Blotmembran legen
- 4 Lagen rote Haushaltstücher in Anodenpuffer I tränken und auf den Stapel legen
- mit der Rolle Luftblasen aus dem Stapel drücken und mit bidest. Wasser angefeuchtete Graphitanode auflegen

Geräteeinstellungen

Die Stromstärke beträgt 0.8 mA/mm^2 Gelfläche bei einer Blotdauer von 80 min für 1 mm dicke Gele.

7.8 Immunochemische Detektion

Die Detektion erfolgt nach VIETHS ET AL. (1992B).

Lösungen

PBS (pH 7.4): 0.01 M K_2HPO_4 , 0.15 M NaCl	1 PBS-Tablette ad 200 mL mit bidest. Wasser
Blockierlösung: 5 % Magermilchpulver, 0.1 % Tween 20, 0.01 M PBS	5 g Magermilchpulver + 100 μL Tween 20 ad 100 mL mit PBS
Inkubationspuffer: 0.1 % BSA, 0.05 % Tween 20 0.01 M PBS	100 mg BSA + 50 μL Tween 20 ad 100 mL mit PBS
Waschpuffer: 0.05 % Tween 20, 0.01 M PBS	50 μL Tween 20 ad 100 mL mit PBS
Patientenseren:	Serum 1:15 in Inkubationspuffer verdünnen
Anti-Human-IgE:	1:4000 in Inkubationspuffer verdünnen
Anti-Kaninchen-IgG (biotinyliert):	1:6000 in Inkubationspuffer verdünnen
Streptavidin HRP:	1:20000 in Inkubationspuffer verdünnen
Umpufferlösung (pH 6.0): 0.01 M Tris	121.2 mg Tris + 80 mL bidest. Wasser mit 4 mol/L HCl auf pH 6.0, ad 100 mL mit bidest. Wasser
Färbelösung 1 (frisch ansetzen):	24 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin + 80 mg Dioctylnatriumsulfosuccinat, ad 10 mL mit Ethanol (96 %)
Färbelösung 2 (pH 5.0): 0.15 M Citrat-Phosphat-Puffer	0.94 g Citronensäure + 1.82 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ad 100 mL mit bidest. Wasser

Durchführung

- NC-Membran in 0.5 cm breite Streifen schneiden und in Färbekammer einlegen
- unspezifische Färbung 2 x 15 min mit 1.5 mL Blockierlösung unterbinden
- über Nacht mit 1.5 mL verdünntem Patientenserum inkubieren
- 3 x 5 min mit 1.5 mL Waschpuffer waschen
- 1 h mit 1.5 mL anti-Human-IgE inkubieren
- 3 x 5 min mit 1.5 mL Waschpuffer waschen
- 1 h mit 1.5 mL anti-Kaninchen-IgG inkubieren
- 3 x 5 min mit 1.5 mL Waschpuffer waschen
- 20 min mit 1.5 mL Streptavidin-HRP inkubieren
- 3 x 5 min mit 1.5 mL Waschpuffer waschen
- 1 min mit 1.5 mL Umpufferlösung umpuffern
- 30 mL Färbelösung 2 mit 10 mL Färbelösung 1 mischen, mit 20 µL H₂O₂ versetzen und Blotstreifen mit je 1.5 mL des Gemischs bis zur ausreichenden Färbung behandeln
- mit Wasser spülen

Modifizierung

Beim Färben von kompletten nicht in Streifen geschnittenen NC-Membranen werden bei jedem Schritt jeweils 15 mL Lösung verwendet.

7.9 Immunoblot-Inhibition

Die Immunoblot-Inhibition erfolgt nach VIETHS ET AL. (1995).

- Immunoblot wie unter 7.7 und 7.8 beschrieben bis zur Blockierung der Blotstreifen durchführen
- anschließend 100 µL Poolserum mit 200 µL des entsprechenden Inhibitorextraktes vermischen und mit 1.2 mL Inkubationspuffer (vgl. 7.8) versetzen
- für unspezifische Inhibition 100 µL Poolserum mit 200 µL Ovalbumin-Lösung (1 mg/mL in Inkubationspuffer) vermischen und mit 1.2 mL Inkubationspuffer (vgl. 7.8) versetzen
- einen Streifen ohne Inhibitor mit 100 µL Poolserum sowie 1.4 mL Inkubationspuffer versetzen
- einen Streifen mit 100 µL Kontrollserum sowie sowie 1.4 mL Inkubationspuffer versetzen
- Lösungen 1 h bei RT vorinkubieren, dann auf die Blotstreifen geben
- die Inkubation erfolgt über Nacht mit anschließender Immunfärbung nach 7.8

7.10 Unspezifische Proteinfärbungen

7.10.1 Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgt nach HEUCKESHOVEN & DERNICK (1986).

Lösungen

Fixierlösung:	75 mL Ethanol + 10 mL Essigsäure ad 250 mL mit bidest. Wasser
Inkubationslösung:	75 mL Ethanol + 17.0 g Natriumacetat + 1.25 mL Glutardialdehyd (25 %) + 0.5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ad 250 mL mit bidest. Wasser (frisch ansetzen)
Versilberungslösung:	0.5 g AgNO_3 + 50 μL Formaldehyd (37 %) ad 250 mL mit bidest. Wasser (frisch ansetzen)
Entwicklerlösung (pH 11,8):	7.5 g Na_2CO_3 + 25 μL Formaldehyd (37 %) mit NaHCO_3 auf pH 11.8 ad 250 mL mit bidest. Wasser
Stopplösung:	4.65 g EDTA ad 250 mL mit bidest. Wasser
Präservierlösung:	25 g Glycerin (87 %) ad 250 mL mit bidest. Wasser

Durchführung

- Gel mit Fixierlösung versetzen, mind. 30 min inkubieren, anschließend abgießen
- Gel mit Inkubationslösung versetzen, mind. 30 min inkubieren, anschließend abgießen
- Gel 5 x 5 min mit bidest. Wasser waschen
- Gel mit Versilberungslösung versetzen, 20 min inkubieren, anschließend abgießen
- Gel 1 min mit bidest. Wasser waschen
- Gel 1 min mit Entwicklerlösung spülen
- Gel mit Entwicklungslösung versetzen bis Banden deutlich sichtbar sind, dann abgießen
- Gel mind. 10 min mit Stopplösung versetzen, anschließend abgießen
- Gel mind. 30 min mit Präservierungslösung versetzen, anschließend abgießen
- Dokumentation erfolgt durch Scannen mit gegebenenfalls sich anschließender Bildbearbeitung

7.10.2 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung

Die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung erfolgt modifiziert nach FLING UND GREGERSON (1986).

Lösungen

Fixier- und Färbelösung:	33 mL Ethanol + 10 mL Essigsäure
33 % Ethanol, 10 % Essigsäure	+ 0.1 g Coomassie R-250
0.1 % Coomassie R-250	ad 100 mL mit bidest. Wasser

Entfärbelösung:	18 mL Ethanol + 8 mL Essigsäure
18 % Ethanol, 8 % Essigsäure	ad 100 mL mit bidest. Wasser

Durchführung

- Gel in Kunststoff- oder Glaswanne mit Fixier- und Färbelösung versetzen
- Gel inkubieren bis es stark gefärbt ist
- Fixier- und Färbelösung abgießen
- Gel mit Entfärbelösung versetzen bis Proteine noch deutlich gefärbt sind und der Hintergrund entfärbt ist (ca. 3-5 h)
- die Zugabe von Papier beschleunigt die Entfärbung

7.10.3 Kolloidale Goldfärbung

Die kolloidale Goldfärbung auf NC-Membranen erfolgt nach DANSCHER & NOORGARD (1983).

Lösungen

Tween-Tris-Buffered-Saline	1.21 g Tris + 14.61 g NaCl + 1.5 mL Tween 20
(TTBS)-Lösung:	+ 400 mL bidest. Wasser
	mit 4 mol/LM HCl auf pH 7.5
	ad 500 mL mit bidest. Wasser

Colloidal Gold Total Protein Stain: Fertiglösung der Firma Biorad

Durchführung

- NC-Membran nach dem Semidry-Blot 3 x 20 min mit jeweils 30 mL TTBS-Lösung waschen
- 3 x 20 min mit jeweils 30 mL bidest. Wasser waschen
- mit ca. 30 mL Colloidal Gold Total Protein Stain färben bis Proteinbanden auftreten (ca. 30-60 min)

7.11 Charakterisierung der verwendeten Patientenseren

Tab. 7.2: Verwendete Patientenseren

Nr.	Patient, Alter, Geschlecht	Allergen	Klinische Symptome	EAST-Klasse Spez. IgE [U/mL]	Allergenbanden im Immunoblot [kDa]
1	JGM (KA, KA)	Haselnuß Apfel Karotte	KA KA KA	4 (> 17.5) NB NB	<10, 14, 18, 25-67 NB NB
2	TR (männlich, 35)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, AN, JM RH, AN, JM -	2 (1.39) 2 (2.15) 0 (< 0.35)	18 NB NB
3	TS (männlich, 28)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, JM - -	3 (14.01) 0 (< 0.35) 0 (< 0.35)	14, 18 NB NB
4	LS (männlich, 28)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, JM RH, JM RH, JM	3 (4.56) 3 (3.81) 2 (1.47)	<10, 14, 18 NB 17, 40-70
5	SKö (weiblich, 29)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, D, JM RH, JM, SL -	3 (5.72) 3 (6.44) 0 (< 0.35)	18 NB NB
6	AT (weiblich, KA)	Haselnuß Apfel Karotte	KA KA KA	4 (> 17.5) NB NB	<10, 18, 25-67 NB NB
7	MM (weiblich, 21)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, D, JM, AN, BS RH, D, JM -	3 (3.55) 3 (3.92) 0 (< 0.35)	14, 18 NB NB
8	PW (männlich, 52)	Haselnuß Apfel Karotte	KA KA KA	4 (> 17.5) NB NB	18 NB NB
9	IB (weiblich, 30)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, JM KA KA	3 (4.91) NB 3 (3.76)	18 NB NB
10	EO (männlich, 19)	Haselnuß Apfel Karotte	JM - -	3 (6.28) 0 (< 0.35) 0 (< 0.35)	<10, 14, 18 NB NB
11	HN (männlich, 26)	Haselnuß Apfel Karotte	JM - -	2 (0.88) 0 (< 0.35) 0 (< 0.35)	18 NB NB
12	IK (weiblich, 29)	Haselnuß Apfel Karotte	JM, AT JM, AT -	2 (1.98) 2 (1.51) 0 (< 0.35)	18 18, 30, 37, 43, 67 NB
13	SMo (männlich, 30)	Haselnuß Apfel Karotte	JM, AT - -	2 (0.76) 0 (< 0.35) 0 (< 0.35)	18 NB NB

Nr.	Patient, Alter, Geschlecht	Allergen	Klinische Symptome	EAST-Klasse Spez. IgE [U/mL]	Allergenbanden im Immunoblot [kDa]
14	BvW (weiblich, 41)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, JM RH, JM, AN -	2 (1.70) 2 (2.29) 0 (< 0.35)	18 18, 37, 43 NB
15	HRF (weiblich, 53)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, JM - -	3 (3.50) 0 (< 0.35) 0 (< 0.35)	18 NB NB
16	JA (weiblich, 27)	Haselnuß Apfel Karotte	JM, SL - -	3 (5.54) 0 (< 0.35) 0 (< 0.35)	14, 18 NB NB
17	UW (männlich, 27)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, JM, SL, AN RH, JM, SL, AN -	3 (4.24) 3 (4.92) 0 (< 0.35)	14, 18 18, 37, 43 NB
18	BS 127 (KA, KA)	Haselnuß Apfel Karotte	KA KA KA	3 (6.04) NB NB	14, 18, 30 NB NB
19	AS (männlich, 32)	Haselnuß Apfel Karotte	KA KA KA	4 (> 17.5) NB NB	<10, 14, 18, 25-67 NB NB
20	St 12 (männlich, KA)	Haselnuß Apfel Karotte	KA KA KA	4 (> 17.5) NB NB	14, 18 NB NB
21	TB (weiblich, 31)	Haselnuß Apfel Karotte	- D, RH -	0 (< 0.35) 2 (2.55) 0 (< 0.35)	NB 18, 37, 43, 67 NB
22	UH (weiblich, 52)	Haselnuß Apfel Karotte	- SL, AN, RH, D SL, AN, RH, D	0 (< 0.35) 4 (> 17.5) 3 (11.76)	NB 18, 67 17
23	PK (männlich, 34)	Haselnuß Apfel Karotte	- RH, D, JM RH, D, JM	0 (< 0.35) 3 (8.65) 2 (1.87)	NB 18 30-60
24	UK (weiblich, 45)	Haselnuß Apfel Karotte	- RH, AT, D, JM RH, AT, D, JM	0 (< 0.35) 2 (1.24) 2 (1.32)	NB 18, 37, 43 17
25	RD (männlich, 35)	Haselnuß Apfel Karotte	- D, JM D, JM	0 (< 0.35) 4 (> 17.5) 2 (1.27)	NB 14, 37, 67 17, 50-60
26	UWo (weiblich, 55)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, AT RH, AT RH, AT	NB 3 (7.64) 3 (7.87)	NB 14, 18, 25-94 17, 40-90
27	SK (weiblich, 50)	Haselnuß Apfel Karotte	- RH, D, AT, JM, AN RH, D, AT, JM, AN	NB 4 (>17.5) 3 (14.16)	NB 18, 25-67 40-70

Nr.	Patient, Alter, Geschlecht	Allergen	Klinische Symptome	EAST-Klasse Spez. IgE [U/mL]	Allergenbanden im Immunoblot [kDa]
28	HS (weiblich, 56)	Haselnuß Apfel Karotte	- JM JM	0 (< 0.35) 4 (> 17.5) 3 (7.39)	NB 18, 30, 37, 43, 67 17
29	MFr (weiblich, 30)	Haselnuß Apfel Karotte	- RH, AT, JM, SL -	0 (< 0.35) 2 (1.02) 0 (< 0.35)	NB 30, 37, 43 NB
30	MF (männlich, 24)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, JM RH, JM RH, JM, BS	3 (8.03) 3 (4.61) 2 (0.71)	NB NB 25, 40
31	SM (weiblich, 30)	Haselnuß Apfel Karotte	- RH, JM -	0 (< 0.35) 2 (1.15) 0 (< 0.35)	MB 18, 37, 43 NB
32	TV (männlich, 23)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, AT, JM, BS RH, AT, JM -	2 (1.22) 3 (4.93) 0 (< 0.35)	18 18, 37, 43, 67 NB
33	SW (männlich, 35)	Haselnuß Apfel Karotte	D, AN, JM, SL D, AN, JM, SL D, AN, JM, SL	NB 3 (8.93) 3 (12.37)	NB 14, 18, 30, 37, 43 17, 40-70
34	IS (weiblich, 61)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, AT, JM, D RH, JM -	NB 2 (2.35) 0 (< 0.35)	NB 18, 30, 37, 43 NB
35	CF (weiblich, 40)	Haselnuß Apfel Karotte	- AT, RH AT, D	0 (< 0.35) 4 (> 17.5) 2 (2.25)	NB 18, 37, 43, 67 17, 40-90
36	DS (weiblich, 35)	Haselnuß Apfel Karotte	AT, D, JM AT, D, JM AT, D, JM	NB 4 (> 17.5) 3 (9.27)	NB 14, 18, 30, 43 17, 50-70
37	CG (weiblich, 29)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, D - RH, D	NB 0 (< 0.35) 2 (1.21)	NB NB 17, 30-50
38	KDH (männlich, 46)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, D, JM RH, D, JM RH, D, JM	3 (14.37) 4 (> 17.5) 4 (> 17.5)	<10, 18, 25-67 NB 30-90
39	FR (männlich, 47)	Haselnuß Apfel Karotte	RH, D, JM, SL RH, D, JM, SL RH, D, JM, SL	4 (> 17.5) 4 (> 17.5) 4 (> 17.5)	NB NB 17, 25, 30-70
40	KK (weiblich, 46)	Haselnuß Apfel Karotte	- RH, AN, JM -	0 (< 0.35) 3 (13.09) 0 (< 0.35)	NB 18, 30, 37, 43 NB
41	LB (männlich, 62)	Haselnuß Apfel Karotte	- RH, AT AN, D RH, AT AN, D	NB 2 (1.92) 2 (1.77)	NB NB 30-50

Nr.	Patient, Alter, Geschlecht	Allergen	Klinische Symptome	EAST-Klasse Spez. IgE [U/mL]	Allergenbanden im Immunoblot [kDa]
42	GB (männlich,)	Haselnuß Apfel Karotte	NB NB AT, D, JM	NB NB 3 (3.55)	NB NB 17, 30, 40
43	BD (männlich,)	Haselnuß Apfel Karotte	NB NB RH, AT AN, D	NB NB 3 (8.62)	NB NB 17, 30, 40

Erläuterungen zu Tabelle 7.2:

KA: keine Angaben, NB: nicht bestimmt, SL: Schwellung der Lippen, AT: Augentränen, JM: Jucken im Mund, D: Dermatitis, RH: Rhinitis, AN: Atemnot, BS: Bauchschmerzen

Tab. 7.3: Zusammensetzung der Poolseren

Poolserum Haselnuß	JA, IB, SK, TR, LS, HN, IK, SMo, TS, BwW, HRF, UW, BS127
Poolserum Apfel	TB, UH, PK, UK, IK, RD, UWo, UW, SK, HS, MFr, KK, SM, BwW, TV, SW, IS, CF, DS
Poolserum Karotte	SW, UWo, LB, RD, CF, CG, KDH, SK, FR, LS, DS, HS, PK, UK, UH, MF

7.12 Untersuchungsmaterial

7.12.1 Haselnuß

Die angegebenen Proteingehalte beziehen sich auf die zur SDS-PAGE eingesetzten Protein-extrakte. Sämtliche Haselnußprodukte wurden aus einem Supermarkt bezogen.

Tab. 7.4: Verwendete Haselnußsorten

Haselnuß-Sorte	Bezugsquelle	Proteingehalt des Extraktes [mg/L]
<i>Barcelona</i> (mit Schale)	Kossar-Markt, Hamburg	2200
<i>Contorta</i> (mit Schale)	Privater Gartenanbau	2130
<i>Levantiner</i> (ohne Schale)	Firma M. Buenger, Oststeinbek	2600
<i>Neapler</i> (ohne Schale)	Firma M. Buenger, Oststeinbek	2100
<i>Runde Römer</i> (ohne Schale)	Firma M. Buenger, Oststeinbek	2050

Tab. 7.5: Verarbeitungsbedingungen, Haselnuß

Verarbeitungsmethode	Verarbeitungsbedingungen	Proteingehalt des Extraktes [mg/L]
Erhitzung im Trockenschrank	100 °C, 15 min	2578
	100 °C, 30 min	2342
	100 °C, 60 min	2185
	100 °C, 90 min	2490
	155 °C, 15 min	3941
	170 °C, 15 min	3791
	185 °C, 15 min	4304
Trypsin-Verdau	30 min, pH 7.5	2013
Protease-Verdau	30 min, pH 7.5	2245
Elastase-Verdau	30 min, pH 8.8	2203
Pankreatin-Verdau	30 min, pH 7.5	1964
	60 min, pH 7.5	2673
Pepsin-Verdau	60 min, pH 1.2	1635
	240 min, pH 1.2	993

Tab. 7.6: Enzympräparate

Enzympräparat	Enzymaktivität	Proteingehalt des Extraktes [mg/L]
Trypsin (EC 3.4.21.4)	10000 U/mg	1003
Protease K (EC 3.4.21.14)	13.4 U/mg	1015
Elastase (EC 3.4.21.36)	3750 U/mL (~50 mg/mL)	1203
Pankreatin	mind. USP grade	859
Pepsin (EC 3.4.23.1)	1 mAnson-E/mg	937

Tab. 7.7 Haselnußprodukte aus dem Handel

Produkt	Zutatenliste	Extrahier- te Kom- ponente	Protein- gehalt des Extraktes [mg/L]
Vollmilchschokolade mit ganzen Haselnüs- sen (Schokolade 1)	Zucker, Haselnüsse, Milchpulver, Kakaobutter, Kakaomasse, Süß- molkenpulver, Milchzucker, Lecithin, Vanillin	Nüsse	2063
Vollmilchschokolade mit ganzen Haselnüs- sen (Schokolade 2)	Zucker, Haselnüsse, Kakaobutter, Magermilchpulver, Kakaomasse, Butterreinfett, Süßmolkenpulver, Soja-Lecithin, Vanillin, Kakao: mind. 30 %	Nüsse	2864
Nußschokolade (Schokolade 3)	keine Angaben vorhanden	Nüsse	2784
Nußschokolade (Schokolade 4)	Zucker, Haselnüsse, Milchpulver, Kakaobutter, Kakaomasse, Sahne- pulver, Lecithin, Vanillin, Kakao: mind. 30 %	Nüsse	2406
Nußschokolade (Schokolade 5)	Keine Angabe vorhanden	Nüsse	2805
Vollmilchschokolade (Kontrolle)	Zucker, Kakaobutter, Sahnepulver, Kakaomasse, Milchpulver, Süßmol- kenpulver, Butterfett, Lecithin, Va- nillin, Kakao: mind. 30 %	gesamtes Produkt	2573
Nuß-Nougat (Nougat 1)	Zucker, Haselnüsse, Kakaomasse, Kakaobutter, Magermilchpulver, E 442, E 476	gesamtes Produkt	2527
Nuß-Nougat, dunkel (Nougat 2)	Zucker, Haselnußkerne, Kakao- masse, Kakaobutter, Lecithin, Aro- ma	gesamtes Produkt	2131
Frühstückscreme 1 (Nougat 3)	Zucker, pflanzliche Öle, z.T. gehär- tet, Weizen-Vollkorn-Crisp, fettar- mes Kakaopulver, Süßmolkenpul- ver, Magermilchpulver, Haselnüsse, Lecithin, Vanillin	gesamtes Produkt	2652

Produkt	Zutatenliste	Extrahier- te Kom- ponente	Protein- gehalt des Extraktes [mg/L]
Frühstückscreme 2 (Nougat 4)	Zucker, pflanzliches Öl, Haselnüsse, fettarmer Kakao, 7,5 % Magermilchpulver, Lecithin, Vanillin	gesamtes Produkt	2844
Nougatschokolade 1 (Nougat 5)	Zucker, Haselnußmasse, Kakao- butter, Kakaomasse, Sahnepulver, Magermilchpulver, Süßmolkepulver, Milchzucker, Lecithin, Vanillin	Nougat- füllung	2341
Nougatschokolade 2 (Nougat 6)	Zucker, Haselnüsse, Kakaobutter, Magermilchpulver, Butterreinfett, Haselnuß-Krokant, Süßmolkenpul- ver, Soja-Lecithin, Vanillin	Nougat- füllung	2669
Haselnuß-Krokant (Krokant 1)	Zucker, Haselnüsse, Invertzuckersirup	gesamtes Produkt	2457
Haselnuß-Krokant (Krokant 2)	Zucker, Haselnüsse, Invertzuckersirup	gesamtes Produkt	2476
Müsli-Riegel	Maltosesirup, geröstete Getreide- flocken (Hafer- und Weizenflocken), Extrudat (Mais, Weizen, Reis), Ha- selnüsse, Cornflakes, pflanzliches Öl, geröstete Kokosflocken, gerö- stete Mandeln, geröstete Sesam- samen, Stabilisator Glycerin, Salz, Monoglycerid, Aroma	Nüsse	2684
Haselnuß-Kuchen	Zucker, Vollei, gehärtetes pflanzli- ches Fett, Glukosesirup, Haselnüs- se, Weingeist, Milchzucker, Natri- umhydrogencarbonat, Natrium- diphosphat, Salz, Aroma, Maisstär- ke, E471, Lecithin, fettarmes Ka- kaopulver, gehärtetes pflanzliches Öl, Magermilchpulver	gesamtes Produkt	771

Produkt	Zutatenliste	Extrahier- te Kom- ponente	Protein- gehalt des Extraktes [mg/L]
Haselnuß-Tafel	Zucker, pflanzliche Fette, z.T. gehärtet, Haselnüsse, Waffel, eiweißangereichertes Molkenpulver, fettarmer Kakao, natürliches Aroma, Lecithin, Vanillin	gesamtes Produkt	2624
Haselnuß-Mürbegebäck	Weizenmehl, Zucker, pflanzliche Fette, z.T. gehärtet, Haselnüsse (10 %), Eier, Molkenpulver, Salz, Natriumhydrogencarbonat, Kaliumtartrat, Zitronenschale, Lecithin, Aroma	gesamtes Produkt	1928
Florentiner Nußgebäck	Haselnüsse (37 %), Vollmilchschokolade (Kakao mind. 31 %), Zucker, Butterreinfett (6 %), Glukosesirup, Weizenmehl, Sahne, Honig, Magermilchpulver, Aroma, Gewürze, Zitronensaftkonzentrat	Nüsse	3092

7.12.2 Apfel

Soweit nicht anders erwähnt, werden Äpfel der Sorte *Golden Delicious* aus dem Versuchsanbau der Universität Hohenheim verwendet. Die Apfelprodukte des Warenkorbs wurden aus einem Supermarkt bezogen. Die angegebenen Proteingehalte beziehen sich auf die zur SDS-PAGE eingesetzten Extrakte.

Tab. 7.8: Fluide Apfelprodukte und deren Zwischenstufen (UH)

Produkt	Zwischenstufe	Technologische Herstellung	Protein- gehalt des Extrak- tes [mg/L]
Apfelpüree	Maische	Äpfel waschen, verlesen, in Rätzmühle vermahlen; Zugabe von 400 mg Ascorbinsäure/kg Äpfel	71
	grobes Püree	pressen der Maische durch Passiermaschine (Lochdurchmesser 2.9 mm)	51
	Trester	Rückstand nach dem Pressen der Maische	25
	Feinmus	passieren des groben Pürees durch Kolloidmühle (0.05 mm Durchmesser)	48
	Endprodukt	Erhitzung des Feinmuses auf 87 °C im Röhrenerhitzer; Heißabfüllung in Gläser; Rückkühlung	46
Dekanter- saft 1	Maische	siehe Apfelpüree	64
	Rohsaft	dekantern der Maische	83
	Trester	Rückstand nach dem Dekantern der Maische	26
	Endprodukt	Erhitzung des Rohsaftes auf 87 °C im Plattenwärmetauscher, Heißabfüllung in Gläser; Rückkühlung	31
Dekanter- saft 2	Maische	siehe Apfelpüree	119
	Feinstmaische	passieren der Maische durch Kolloidmühle (0.05 mm Durchmesser)	156
	Rohsaft	Dekantern der Feinstmaische	89
	Trester	Rückstand nach dem Dekantern der Feinstmaische	33
	Endprodukt	siehe Dekantersaft 1	35

Produkt	Zwischenstufe	Technologische Herstellung	Protein- gehalt des Ex- traktes [mg/L]
Dekanter- saft 3	Maische	siehe Apfelpüree	43
	Feinmaische	passieren der Maische durch Kolloidmühle (0.2 mm Durchmesser)	213
	Rohsaft	dekantern der Feinmaische	27
	Trester	Rückstand nach dem Dekantern der Feinmaische	27
	Endprodukt	siehe Dekantersaft 1	60
Preßsaft 1	Maische	siehe Apfelpüree	86
	Rohsaft	pressen der Maische in Packpresse (feinmaschiges Preßtuch < 1 mm)	97
	Trester	Rückstand nach dem Pressen der Feinmaische	28
	Endprodukt	siehe Dekantersaft 1	30
Preßsaft 2	Maische	siehe Apfelpüree	145
	Rohsaft	pressen der Maische in Packpresse (grobmaschi- ges Preßtuch = 2 mm)	46
	Trester	Rückstand nach dem Pressen der Feinmaische	25
	Endprodukt	siehe Dekantersaft 1	34
Maische mit Ascor- binsäure- zusatz	Standzeit 0 h	siehe Apfelpüree	531
	Standzeit 1 h		535
	Standzeit 2 h		856
	Standzeit 3 h		718
Preßsaft 3	Endprodukt	hergestellt aus Maische nach 3 h Standzeit (siehe Preßsaft 1)	113
Maische ohne Ascorbin- säurezu- satz	Standzeit 0 h	siehe Apfelpüree	313
	Standzeit 1 h		300
	Standzeit 2 h		231
	Standzeit 3 h		375

Produkt	Zwischenstufe	Technologische Herstellung	Protein- gehalt des Ex- traktes [mg/L]
Preßsaft 4	Endprodukt	hergestellt aus Maische nach 3 h Standzeit (siehe Preßsaft 1)	50
Apfel, nativ			262

Tab. 7.9: Apfelprodukte aus dem Handel

Produkt	Zutatenliste	Extrahierte Komponente	Proteingehalt des Extraktes [mg/L]
Apfelkompott mit Stückchen	Äpfel, Citronensäure, Cyclamat, Sac- charin, Ascorbinsäure	gesamtes Produkt	44
Apfelkonfitüre	Äpfel, Zucker, Glukosesirup, Pektin, Citronensäure, Zimt	gesamtes Produkt	93
Baby-Apfelsaft	Apfelsaft, Vitamin C	gesamtes Produkt	46
Apfelkompott (Baby- Apfel)	Äpfel, Apfelsaft, Vitamin C	gesamtes Produkt	245
Apfelessig	5 % Säure, biologisch gewonnen	gesamtes Produkt	196
Fruchtaufstrich	Apfelsaft (55 %), Zucker, Glukosesi- rup, Pektin, Citronensäure	gesamtes Produkt	40
Apfelmus	Äpfel, Zucker, Ascorbinsäure, Äpfel- säure	gesamtes Produkt	218
Apfelsaft (naturtrüb)	Apfelsaft aus Apfelsaftkonzentrat	gesamtes Produkt	49
Apfelsaft (klar)	Apfelsaft, Vitamin C	gesamtes Produkt	14
Apfelringe	Äpfel, Schwefeldioxid	gesamtes Produkt	263
Apfelchips	Äpfel, pflanzliches Öl, Glukosesirup, Aroma	gesamtes Produkt	219
Direktsaft (natürtrüb)	Apfelsaft, Vitamin C	gesamtes Produkt	85

7.12.3 Karotte

Zur Herstellung der fluiden Karottenprodukte werden Karotten der Sorte *Karotan* aus dem Versuchsanbau der Universität Hohenheim verwendet. Die Erhitzungsversuche wurden mit den vom Wochenmarkt bezogenen Karotten der Sorte *Berlikumer* durchgeführt. Die Karottenprodukte wurden aus einem Supermarkt bezogen. Die angegebenen Proteingehalte beziehen sich auf die zur SDS-PAGE eingesetzten Extrakte.

Tab. 7.10: Verwendete Karottensorten

Karottensorte	Bezugsquelle	Proteingehalt des Extraktes [mg/L]
Karotan	Universität Hohenheim, Versuchsanbau	495
Berlikumer	Wochenmarkt	406

Tab. 7.11: Verarbeitungsbedingungen, Karotte

Verarbeitungsmethode	Verarbeitungsbedingungen	Proteingehalt des Extraktes [mg/L]
Erhitzung im Autoklaven (121 °C, 1 bar Überdruck)	10 min	129
	20 min	166
	30 min	193
	40 min	334
Erhitzung im Kochwasser (100 °C)	10 min	311
	20 min	350
	30 min	327
	40 min	330

Tab. 7.12: Fluide Karottenprodukte und deren Zwischenstufen (UH)

Produkt	Zwischenstufe	Technologische Herstellung	Proteingehalt des Extraktes [mg/L]
Ungesäuerter Saft (tyndallisiert und sterilisiert) Saft A/B	blanchierte Karotten	Karotten waschen, verlesen, im Dampfkessel 10 min bei 80 °C Wassertemperatur behandeln (Kerntemperatur 60-61 °C)	81
	Maische	in Rätzmühle vermahlen, Zugabe von 650 mg Ascorbinsäure/kg Karotten	41
	Feinmaische	Pressen der Maische durch Kolloidmühle (0.5 mm Durchmesser)	26
	Rohsaft	Dekantern der Feinmaische	
	Trester	Rückstand nach dem Dekantern	38
	Rohsaft (1 x pasteurisiert)	Erhitzung des Rohsaftes im Plattenpasteur (30 s bei 93 °C), Heißabfüllung in verschließbaren Kessel, Rückkühlung	24
	Rohsaft (2 x pasteurisiert)	weitere Erhitzung im Plattenpasteur (30 s bei 93 °C), Heißabfüllung in verschließbaren Kessel, Rückkühlung	31
	Endprodukt A (3 x pasteurisiert)	weitere Erhitzung im Plattenpasteur (30 s bei 93 °C), Heißabfüllung in Gläser, Rückkühlung	19
	Endprodukt B (sterilisiert)	Sterilisation des Rohsaftes im Autoklaven F = 5), Kaltabfüllung in Gläser	22
Gesäuerter Saft aus geschälten Karotten (pasteurisiert) Saft C	geschälte Karotten	Schälen der Karotten mit dem Messer	560
	blanchierte Karotten	siehe ungesäuerter Saft	128
	Maische	siehe ungesäuerter Saft	45
	gesäuerte Feinmaische	Zusatz von 3 g Citronensäure und 650 mg Ascorbinsäure/kg Maische, Passieren der Maische durch Kolloidmühle (0.5 mm Spaltbreite)	36
	Rohsaft	siehe ungesäuerter Saft	21
	Trester	siehe ungesäuerter Saft	24
	Endprodukt C	siehe ungesäuerter, pasteurisierter Saft	17

Produkt	Zwischenstufe	Technologische Herstellung	Proteingehalt des Extraktes [mg/L]
Ungesäuerter Saft (enzymiert mit Pektinlyase, sterilisiert) Saft D	Feinmaische	siehe ungesäuerter Saft	65
	enzymierte Feinmaische	Zugabe von 40 mg Pektinlyase/kg Feinmaische, Enzymierung im Rührkessel 1 h bei 45 °C	98
	erhitzte Maische	Erhitzung im Röhrenerhitzer, Produkttemperatur 87 °C	39
	Trester	siehe ungesäuerter Saft	24
	Endprodukt D	siehe ungesäuerter, sterilisierter Saft	23
Ungesäuerter Saft (enzymiert mit Pektatlyase, sterilisiert) Saft E	Feinmaische	siehe ungesäuerter Saft	81
	enzymierte Feinmaische	Zugabe von 60 mg Pektatlyase/kg Feinmaische, Enzymierung im Rührkessel 1h bei 45 °C	73
	erhitzte Maische	Erhitzung im Röhrenerhitzer, Produkttemperatur 87 °C	37
	Trester	siehe ungesäuerter Saft	29
	Endprodukt E	siehe ungesäuerter, sterilisierter Saft	33

Tab. 7.13 Karottenprodukte aus dem Handel

Produkt	Zutatenliste	Extrahierte Komponente	Proteingehalt des Extraktes [mg/L]
Junge Erbsen fein mit jungen Möhrchen (Konserve 1)	Erbsen, Möhren, Wasser, Zucker, Speisesalz	Karotten	309
Möhrchen, extra fein (Konserve 2)	Möhrchen, Wasser, Salz	Karotten	303
Möhrencremesuppe (Konserve 3)	Wasser, Möhren, Sahne, Blumenkohl, Zwiebeln, Sellerie, pflanzliches Öl, Stärke, Guarkernmehl	Karotten	78
Öko Erbsen und Karotten (Tiefkühlware 1)	Junge Markerbsen, Karotten in Scheiben	Karotten	480

Produkt	Zutatenliste	Extrahier- te Kom- ponente	Proteingehalt des Extrak- tes [mg/L]
Kaisergemüse (Tiefkühlware 2)	Blumenkohl, Brokkoli, Möhren- scheiben	Karotten	618
Karottensalat 1	Karotten, Wasser, Branntweines- sig, Zucker, Speisesalz, Citronen- säure, Ascorbinsäure	Karotten	54
Karottensalat 2	Karotten, Branntweinessig, Zuk- ker, Iodsalz	Karotten	132
Gemüse-Nudel-Suppe (Trockenprodukt 1)	Nudeln, Karotten, Zwiebeln, grüne Bohnen, Lauch, Sellerie, Erbsen	Karotten- stücke	32
China-Pfanne (Trockenprodukt 2)	Stärke, Sojasauce, Sellerie, Ka- rotten, Paprika, Weißkohl, Pflanz- liches Öl, Jodsalz, Mononatrium- glutamat, Dinatriuminosinat, Mu- err-Pilze, Maltodextrin, modifizierte Stärke, Aroma, Bambussprossen, Lauch, Hefeextrakt, Würzmittel, Zucker, Gewürze, Curry	Karotten- stücke	30
Vege Snack (Trockenprodukt 3)	Keine Angaben	Karotten	438
Früh-Karotten (Babybrei 1)	Karotten aus biologischem Anbau, Wasser	gesamtes Produkt	180
Karotten (Babybrei 2)	Karotten, Wasser, pflanzliches Öl	gesamtes Produkt	264
Karotten (Babybrei 3)	Karotten, Wasser, pflanzliches Öl	gesamtes Produkt	252
Karottensaft, Bioanbau (Karottensaft 1)	Karottensaft, Vitamin C	gesamtes Produkt	162
Karotten in Früchte-Saft (Karottensaft 2)	Apfelsaft, Karotten, Ananassaft, Vitamin C	gesamtes Produkt	66
Milder Karotten-Trunk (Karottensaft 3)	Karottensaft, Wasser, Zucker, Vitamin C	gesamtes Produkt	96
Möhrensaft, mit Zitro- nensaft (Karottensaft 4)	Möhrensaft, Zitronensaft	gesamtes Produkt	192
Apfelessig Karotten- Trunk (Karottensaft 5)	Apfelsaft, Wasser, Karottensaft, Apfelessig, Blütenhonig, Jodsalz, Pektin, Vitamin C, E und A	gesamtes Produkt	198

7.13 Ergebnisse der EAST-Inhibitionen

Tab. 7.14: Meßwerte der EAST-Inhibitionen bei der Haselnuß

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B ₀ [Skt.]	Ext. B _U [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Barcelona (homolog)	1878	0.289	1.124	1.157	0.121	83.3	26
	187.8	0.401				72.1	
	18.78	0.659				46.4	
	1.878	1.051				7.3	
	0.1878	1.095				2.9	
	0.01878	1.144				0	
Contorta	2789	0.219	1.124	1.157	0.121	90.2	14
	278.9	0.252				86.9	
	27.89	0.463				65.9	
	2.789	0.978				14.6	
	0.2789	0.974				15.0	
	0.02789	1.084				4.0	
Levantiner	1685	0.383	1.124	1.157	0.121	77.2	45
	168.5	0.414				75.3	
	16.85	0.982				31.3	
	1.685	1.021				10.3	
	0.1685	0.995				12.9	
	0.01685	1.132				0	
Neapler	1115	0.377	1.124	1.157	0.121	74.5	51
	111.5	0.464				65.8	
	11.15	0.928				19.5	
	1.115	1.048				7.6	
	0.1115	1.043				8.1	
	0.01115	1.153				0	
Runde Römer	1568	0.345	1.124	1.157	0.121	77.7	92
	156.8	0.527				59.5	
	15.68	0.937				18.6	
	1.568	1.076				4.8	
	0.1568	1.008				11.6	
	0.01568	1.106				1.8	
Erhitzung im Trockenschrank, 15 min bei 100 °C	6145	0.07	1.179	1.121	0.074	100	18
	614.5	0.142				93.8	
	61.45	0.308				78.8	
	6.145	0.904				24.9	
	0.6145	1.065				10.3	
Erhitzung im Trockenschrank, 30 min bei 100 °C	6032	0.074	1.179	1.121	0.074	100	18
	603.2	0.121				95.7	
	60.32	0.323				77.5	
	6.032	0.907				24.6	
	0.6032	1.117				5.6	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B ₀ [Skt.]	Ext. B _U [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Erhitzung im Trockenschrank, 60 min bei 100 °C	7023	0.076	1.179	1.121	0.074	99.8	22
	702.3	0.143				93.8	
	70.23	0.310				78.6	
	7.023	0.942				21.4	
	0.7023	1.108				6.4	
Erhitzung im Trockenschrank, 90 min bei 100 °C	5846	0.081	1.179	1.121	0.074	99.4	21
	584.6	0.135				94.5	
	58.46	0.344				75.6	
	5.846	0.988				17.3	
	0.5846	1.124				5.0	
Erhitzung im Trockenschrank, 15 min bei 155 °C	6067	0.072	1.098	1.033	0.059	98.8	27
	606.7	0.157				90.6	
	60.67	0.377				69.4	
	6.067	0.940				15.3	
	0.6067	1.069				2.9	
Erhitzung im Trockenschrank, 15 min bei 170 °C	5538	0.108	1.098	1.033	0.059	95.3	175
	553.8	0.286				78.2	
	55.38	0.872				21.8	
	5.538	1.059				3.8	
	0.5538	1.079				1.9	
Erhitzung im Trockenschrank, 15 min bei 185 °C	3473	0.509	1.098	1.033	0.059	56.7	2381
	347.3	0.936				15.7	
	34.73	1.064				3.4	
	3.473	1.082				1.6	
	0.3473	1.044				5.3	
Haselnuß (Barcelona, homolog)	1119	0.097	1.197	1.138	0.16	100	35
	111.9	0.282				88.2	
	11.19	1.06				13.2	
	1.119	1.143				5.2	
	0.1119	1.163				3.5	
Haselnuß mit Trypsin, 37 °C, pH 7.5, 30 min	1645	0.798	0.996	1.080	0.027	20.4	--
	164.5	0.897				10.2	
	16.45	0.969				2.8	
	1,645	0.984				1.2	
	0.1645	1.194				0	
Haselnuß mit Protease, 37 °C, pH 7.5, 30 min	3850	0.928	1.197	1.138	0.160	25.9	--
	385.0	0.947				24.1	
	38.50	1.200				0	
	3.850	1.121				7.3	
	0.3850	1.193				0.3	
Haselnuß mit Elastase, 37 °C, pH 8.8, 30 min	3246	0.905	1.197	1.138	0.160	28.1	--
	324.6	1.002				18.8	
	32.46	1.134				6.1	
	3.246	1.131				6.3	
	0.3246	1.177				1.9	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B ₀ [Skt.]	Ext. B _U [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Haselnuß mit Pankreatin, 37 °C, pH 7.5, 30 min	3082	0.189	0.996	1.080	0.027	83.3	143
	308.2	0.261				75.5	
	30.82	1.095				0	
	3.082	1.059				0	
	0.3082	1.044				0	
Haselnuß mit Pankreatin, 37 °C, pH 7.5, 60 min	2759	0.693	0.996	1.080	0.027	31.3	--
	275.9	0.867				13.3	
	27.59	1.029				0	
	2.759	1.068				0	
	0.2759	1.056				0	
Haselnuß mit Pepsin, 37 °C, pH 1.2, 60 min	1915	0.559	1.575	1.427	0.027	65.6	128
	191.5	0.677				58.0	
	19.15	1.395				11.6	
	1.915	1.400				11.3	
	0.1915	1.454				7.8	
Haselnuß mit Pepsin, 37 °C, pH 1.2, 240 min	1854	1.047	1.575	1.427	0.027	34.1	--
	185.4	1.543				2.1	
	18.54	1.392				11.8	
	1.854	1.411				10.6	
	0.1854	1.553				1.4	
Haselnuß (Barcelona, homolog)	1244	0.282	1.124	1.157	0.121	84.7	26
	124.4	0.4				72.2	
	12.44	0.715				40.8	
	1.244	1.065				5.9	
	0.1244	1.053				7.1	
	0.01244	1.082				4.2	
Schokolade 1 (Nüsse)	3581	0.334	1.186	1.143	0.243	90.4	441
	358.1	0.752				46.0	
	35.81	1.011				18.6	
	3.581	0.995				20.3	
	0.3581	1.126				6.4	
Schokolade 2 (Nüsse)	1442	0.403	1.186	1.143	0.243	83.0	366
	144.2	0.925				27.6	
	14.42	1.045				14.9	
	1.442	1.073				12.0	
	0.1442	1.108				8.3	
Schokolade 3 (Nüsse)	3612	0.569	1.186	1.143	0.243	65.4	1586
	361.2	0.76				22.3	
	36.12	1.096				9.5	
	3.612	1.091				10.1	
	0.3612	1.139				5.0	
Schokolade 4 (Nüsse)	3104	0.305	0.758	0.817	0.131	72.2	1529
	310.4	0.933				0	
	31.04	0.811				0	
	3.104	0.862				0	
	0.3104	0.776				0	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B ₀ [Skt.]	Ext. B _U [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Schokolade 5 (Nüsse)	3090	0.440	1.186	1.143	0.243	79.1	950
	309.0	0.976				22.3	
	30.90	1.062				13.2	
	3.090	1.086				10.6	
	0.3090	1.148				4.0	
Kontrolle (ges. Produkt)	2375	0.700	0.758	0.817	0.131	9.2	--
	237.5	0.758				0	
	23.75	0.809				0	
	2.375	0.839				0	
	0.2375	0.826				0	
Nougat 1 (ges. Produkt)	2782	0.576	0.846	0.746	0.151	38.9	--
	278.2	0.582				38.0	
	27.82	0.663				26.3	
	2.782	0.842				0	
	0.2782	0.848				0	
Nougat 2 (ges. Produkt)	2003	0.587	0.846	0.746	0.151	37.4	--
	200.3	0.646				28.8	
	20.03	0.782				11.8	
	2.003	0.764				9.2	
	0.2003	0.861				0	
Nougat 3 (ges. Produkt)	2965	0.718	0.928	0.842	0.203	29.0	--
	296.5	0.826				14.1	
	29.65	0.935				0	
	2.965	1.007				0	
	0.2965	0.991				0	
Nougat 4 (ges. Produkt)	3060	0.581	0.794	0.740	0.160	33.6	--
	306.	0.617				27.9	
	30.6	0.780				2.2	
	3.06	0.796				0	
	0.306	0.802				0	
Nougat 5 (Nougatfüllung)	3120	0.282	0.928	0.842	0.203	89.1	790
	312.0	0.757				23.6	
	31.20	0.931				0	
	3.120	0.871				7.8	
	0.3120	0.930				0	
Nougat 6 (Nougatfüllung)	3781	0.122	0.928	0.842	0.203	100	852
	378.1	0.747				25.0	
	37.81	0.993				0	
	3.781	0.893				4.9	
	0.3781	0.990				0	
Krokant 1 (ges. Produkt)	2968	0.398	0.794	0.740	0.160	62.5	1374
	296.8	0.634				25.2	
	29.68	0.738				8.8	
	2.968	0.798				0	
	0.2968	0.810				0	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B _o [Skt.]	Ext. B _u [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Krokant 2 (ges. Produkt)	3147	0.449	0.794	0.740	0.160	54.4	1992
	314.7	0.590				32.2	
	31.47	0.735				9.4	
	3.147	0.829				0	
	0.147	0.776				2.8	
Müsli-Riegel (Nüsse)	3090	0.328	1.186	1.143	0.243	91.0	63
	309	0.378				85.7	
	30.9	0.862				33.8	
	3.09	1.149				0	
	0.309	1.207				0	
Haselnuß-Kuchen (ges. Produkt)	943	0.598	1.056	0.951	0.064	46.2	--
	94.3	0.85				20.8	
	9.43	0.944				11.3	
	0.943	0.947				11.0	
	0.0943	1.014				4.2	
Haselnuß-Tafel (ges. Produkt)	2919	0.662	1.056	0.951	0.064	39.7	--
	291.9	0.911				14.6	
	29.19	0.958				9.9	
	2.919	0.997				5.9	
	0.2919	1.010				4.6	
Haselnuß-Mürbegebäck (ges. Produkt)	2213	0.379	1.056	0.951	0.064	68.2	779
	221.3	0.778				28.0	
	22.13	0.886				17.1	
	2.213	0.919				13.8	
	0.2213	0.98				7.7	
Florentiner Nußgebäck (ges. Produkt)	3317	0.615	1.056	0.951	0.064	44.5	--
	331.7	0.855				20.3	
	33.17	0.911				14.6	
	3.317	0.99				6.7	
	0.3317	0.986				7.1	

Tab. 7.15 Meßwerte der EAST-Inhibitionen beim Apfel

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B _o [Skt.]	Ext. B _u [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Apfel 1 (Golden Delicious, homolog)	1591	0.024	1.009	0.907	0.007	98.3	0.45
	159.16	0.054				95.3	
	15.91	0.129				87.8	
	1.591	0.302				70.6	
	0.1591	0.678				33.0	
	0.01591	0.979				3.0	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B _o [Skt.]	Ext. B _u [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Maische ohne Ascorbinsäurezugabe (Standzeit 0 h)	530	0.059	1.009	0.907	0.007	94.8	2.4
	53.0	0.171				83.6	
	5.30	0.352				65.6	
	0.530	0.799				21.0	
	0.0530	1.105				0	
Maische ohne Ascorbinsäurezugabe (Standzeit 1 h)	534	0.037	1.009	0.907	0.007	97.0	1.6
	53.4	0.101				90.6	
	5.34	0.312				69.6	
	0.534	0.683				32.5	
	0.0534	0.987				2.2	
Maische ohne Ascorbinsäurezugabe (Standzeit 2 h)	855	0.097	1.095	1.113	0.008	91.8	29
	85.5	0.407				63.3	
	8.55	0.715				35.0	
	0.855	0.964				12.1	
	0.0855	1.021				6.8	
Maische ohne Ascorbinsäurezugabe (Standzeit 3 h)	718	0.113	1.095	1.113	0.008	90.3	20
	71.8	0.397				64.2	
	7.18	0.673				38.8	
	0.718	0.9				17.9	
	0.0718	1.004				8.4	
Endprodukt	113	0.993	1.272	1.381	0.025	22.4	--
	56.5	1.092				14.4	
	28.25	1.201				5.7	
	2.825	1.5				0	
	0.2825	1.41				0	
Maische mit Ascorbinsäurezugabe (Standzeit 0 h)	316	0.05	1.009	0.907	0.007	95.7	0.99
	31.6	0.127				88.0	
	3.16	0.318				69.0	
	0.316	0.694				31.4	
	0.0316	0.982				2.7	
Maische mit Ascorbinsäurezugabe (Standzeit 1 h)	299	0.037	1.009	0.907	0.007	97.0	0.77
	29.9	0.103				90.4	
	2.99	0.293				71.5	
	0.299	0.656				35.2	
	0.0299	0.936				7.3	
Maische mit Ascorbinsäurezugabe (Standzeit 2 h)	231	0.037	1.009	0.907	0.007	97.0	0.87
	23.1	0.123				88.4	
	2.31	0.349				65.9	
	0.231	0.722				28.6	
	0.0231	0.993				1.6	
Maische mit Ascorbinsäurezugabe (Standzeit 3 h)	375	0.042	1.009	0.907	0.007	96.5	0.77
	37.5	0.122				88.5	
	3.75	0.277				73.1	
	0.375	0.612				39.6	
	0.0375	0.945				6.4	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B _o [Skt.]	Ext. B _u [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Endprodukt	50	1.154	1.453	1.448	0.016	20.8	--
	25	1.287				11.6	
	12.5	1.378				5.2	
	1.25	1.606				0	
	0.125	1.433				1.4	
Apfel 2 (Golden Delicious, homolog)	500	0.025	1.092	1.135	0.001	97.8	1.7
	50.0	0.136				87.6	
	5.00	0.396				63.8	
	0.500	0.718				34.3	
	0.0500	0.972				11.0	
	0.00500	1.008				7.8	
Trester Apfelpüree	183	0.311	1.007	0.953	0.005	69.5	23
	18.3	0.526				48.0	
	1.83	0.89				11.7	
	0.183	0.94				5.8	
	0.0183	0.974				3.3	
Trester Dekanteraft 1	40	0.479	1.092	1.135	0.001	56.2	28
	4.0	0.885				19.0	
	0.40	0.924				15.4	
	0.040	1.004				8.1	
	0.0040	1.078				1.3	
Trester Dekanteraft 2	22	0.459	1.007	0.953	0.005	54.7	16
	2.2	0.744				26.3	
	0.22	0.912				9.5	
	0.022	0.968				3.9	
	0.0022	0.969				3.8	
Trester Dekanteraft 3	26	1.039	1.523	1.480	0.019	32.2	--
	2.6	1.241				18.8	
	0.26	1.375				9.8	
	0.026	1.467				3.7	
	0.0026	1.495				1.9	
Trester Preßsaft 1	80	0.656	1.523	1.480	0.019	57.7	48
	8.0	1.179				22.9	
	0.80	1.495				1.9	
	0.080	1.5				1.5	
	0.0080	1.549				0	
Trester Preßsaft 2	141	0.122	1.007	0.953	0.005	88.3	5.2
	14.1	0.377				62.9	
	1.41	0.671				33.5	
	0.141	0.955				5.2	
	0.0141	1.046				0	
Apfel 3 (Golden Delicious, homolog)	1367	0.018	1.224	1.337	0	98.5	0.73
	136.7	0.048				96.1	
	13.67	0.168				86.3	
	1.367	0.462				62.3	
	0.1367	1.002				18.1	
	0.01367	1.247				0	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B ₀ [Skt.]	Ext. B _U [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Feinmus Apfelpüree	188	0.283	1.007	0.953	0.005	72.3	30
	18.8	0.564				44.2	
	1.88	0.871				13.5	
	0.188	0.968				3.9	
	0.0188	1.079				0	
Rohsaft Dekanterstsaft 1	51	0.502	1.157	1.123	0.007	57.0	34
	5.1	0.942				18.7	
	0.51	1.044				9.8	
	0.051	1.134				2.0	
	0.0051	1.173				0	
Rohsaft Dekanterstsaft 2	330	0.359	1.157	1.123	0.007	69.4	55
	33.0	0.645				44.5	
	3.30	0.985				15.0	
	0.330	1.05				9.3	
	0.0330	1.125				2.8	
Rohsaft Dekanterstsaft 3	67	0.378	1.157	1.123	0.007	67.7	53
	6.7	0.759				34.6	
	0.67	1.081				6.6	
	0.067	1.126				2.7	
	0.0067	1.178				0	
Rohsaft Preßsaft 1	40	0.471	1.157	1.123	0.007	60.0	18
	4.0	0.769				31.4	
	0.40	1.009				12.9	
	0.040	1.039				10.3	
	0.0040	1.152				0.4	
Rohsaft Preßsaft 2	40	0.287	1.157	1.123	0.007	75.7	7.9
	4.0	0.698				39.9	
	0.40	1.128				26.1	
	0.040	1.134				2.0	
	0.0040	1.155				0.2	
Apfel 4 (Golden Delicious, homolog)	2228	0.037	1.009	0.907	0.005	96.8	1.0
	222.8	0.074				93.1	
	22.28	0.156				85.0	
	2.228	0.355				65.1	
	0.2228	0.805				20.3	
	0.02228	1				0.9	
Endprodukt Apfelpüree	61	0.247	0.887	0.932	0.001	72.2	20
	6.1	0.649				26.9	
	0.61	0.727				18.1	
	0.061	0.837				5.6	
	0.0061	0.851				4.1	
Endprodukt Dekanterstsaft 1	64	0.408	1.272	1.183	0.025	69.3	35
	32	0.679				47.6	
	16	0.984				23.1	
	1.6	1.144				10.3	
	0.16	1.197				6.0	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B ₀ [Skt.]	Ext. B _U [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Endprodukt Dekanterstsaft 2	131	0.523	1.272	1.183	0.025	60.1	99
	65.5	0.833				35.2	
	32.75	0.956				25.3	
	3.275	1.152				9.6	
	0.3275	1.121				12.1	
Endprodukt Dekanterstsaft 3	59	0.376	1.272	1.183	0.025	71.9	38
	29.5	0.788				38.3	
	14.75	0.949				25.9	
	1.475	1.054				17.5	
	0.1475	1.312				0	
Endprodukt Preßsaft 1	49	0.588	1.272	1.183	0.025	54.9	43
	24.5	0.942				27.9	
	12.25	1.221				4.1	
	1.225	1.145				10.2	
	0.1225	1.357				0	
Endprodukt Preßsaft 2	160	0.848	1.272	1.183	0.025	34	--
	80	1.028				19.6	
	40	1.041				18.5	
	4	1.039				18.7	
	0.4	1.256				1.3	
Apfel 5 (Golden Delicious, homolog)	1370	0.11	1.116	1.108	0.002	99.2	0.78
	137.0	0.038				96.8	
	13.70	0.116				89.8	
	1.370	0.425				62.0	
	0.1370	0.972				12.9	
	0.01370	1.113				0.3	
Apfelkompott mit Stückchen	44	0.102	1.116	1.108	0.002	91.0	1.3
	4.4	0.29				74.2	
	0.44	0.792				29.1	
	0.044	1.166				0	
	0.0044	1.275				0	
Apfelkonfitüre	9	1.034	1.116	1.108	0.002	7.4	--
	0.9	1.085				2.8	
	0.09	1.098				1.6	
	0.009	1.116				0	
	0.0009	1.12				0	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B ₀ [Skt.]	Ext. B _U [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Fruchtaufstrich	40	0.952	1.116	1.108	0.002	14.7	--
	4.044	0.992				11.1	
	0.4044	1.077				3.5	
	0.04044	1.12				0	
	0.004044	1.13				0	
Apfelkompott (Baby-Apfel)	244	0.137	1.116	1.108	0.002	87.9	17
	24.4	0.487				56.5	
	2.44	0.927				17.0	
	0.244	1.27				0	
	0.0244	1.246				0	
Apfelmus	217	0.114	1.224	1.337	0	90.7	2.8
	21.7	0.314				74.4	
	2.17	0.648				47.1	
	0.217	1.101				10.1	
	0.0217	1.252				0	
Apfelringe	263	0.071	1.116	1.108	0.002	93.8	1.6
	26.3	0.196				82.6	
	2.63	0.466				58.4	
	0.263	0.871				22.0	
	0.0263	1.026				8.1	
Apfelchips	219	0.101	1.224	1.337	0	91.8	1.2
	21.9	0.137				88.8	
	2.19	0.485				60.4	
	0.219	0.948				22.6	
	0.0219	1.197				2.2	
Apfelsaft (naturtrüb)	25	0.754	1.095	1.113	0.008	31.4	--
	2.5	0.972				11.3	
	0.25	1.025				6.4	
	0.025	1.041				5.0	
	0.0025	1.087				0	
Apfelsaft (klar)	17	0.839	1.453	1.448	0.016	42.7	--
	8.5	1.295				11	
	4.25	1.345				7.5	
	0.425	1.4				3.7	
	0.0425	1.347				7.4	
Apfelessig	19	0.786	1.224	1.337	0	35.8	--
	1.9	1.162				5.1	
	0.19	1.176				3.9	
	0.019	1.236				0	
	0.0019	1.229				0	
Baby-Apfelsaft	32	0.82	1.453	1.448	0.016	44.0	--
	16	1.18				19.0	
	8	1.367				6.0	
	0.8	1.398				3.8	
	0.08	1.275				12.4	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B ₀ [Skt.]	Ext. B _U [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Direktsaft (natürtrüb)	112	0.185	1.453	1.448	0.016	88.2	38
	56	0.408				72.7	
	28	0.996				31.8	
	2.8	1.367				6.0	
	0.28	1.486				0	

Tab. 7.16 Meßwerte der EAST-Inhibitionen bei der Karotte

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B ₀ [Skt.]	Ext. B _U [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Karotte (homolog, Berlikumer)	2510	0.143	2.198	1.75	0.023	94.5	34
	251	0.502				78.0	
	25.1	1.202				45.8	
	2.51	1.897				13.8	
	0.251	2.117				3.7	
	0.0251	2.198				0	
Erhitzung im Kochwasser (100 °C), 10 min	950	0.459	2.198	1.75	0.023	80.0	17
	95	0.674				70.0	
	9.5	1.251				43.5	
	0.95	1.789				18.8	
	0.095	1.969				10.5	
	0.0095	2.066				6.1	
Erhitzung im Kochwasser (100 °C), 20 min	1134	0.486	2.198	1.75	0.023	78.7	12
	113.4	0.604				73.3	
	11.34	1.126				49.3	
	1.134	1.678				23.9	
	0.1134	1.832				16.8	
	0.01134	1.986				9.8	
Erhitzung im Kochwasser (100 °C), 30 min	938	0.417	2.198	1.75	0.023	81.9	14
	93.8	0.661				70.7	
	9.38	1.2				45.9	
	0.938	1.749				20.6	
	0.0938	1.928				12.4	
	0.00938	1.982				9.9	
Erhitzung im Kochwasser (100 °C), 40 min	820	0.464	2.198	1.75	0.023	79.7	14
	82	0.741				67.0	
	8.2	1.228				44.6	
	0.82	1.655				25.0	
	0.082	1.841				16.4	
	0.0082	2.074				5.7	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B _o [Skt.]	Ext. B _u [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Erhitzung im Autoklav (121 °C, 1 bar Überdruck), 10 min	332	0.579	1.887	1.618	0.015	69.9	26
	33.2	0.901				52.7	
	3.32	1.359				28.2	
	0.332	1.571				16.9	
	0.0332	1.622				14.2	
	0,00332	1.745				7.6	
Erhitzung im Autoklav (121 °C, 1 bar Überdruck), 20 min	314	0.501	1.887	1.618	0.015	74.0	13
	31.4	0.75				60.7	
	3.14	1.265				33.2	
	0.314	1.485				21.5	
	0.0314	1.7				10.0	
	0.00314	1.803				4.5	
Erhitzung im Autoklav (121 °C, 1 bar Überdruck), 30 min	327	0.444	1.887	1.618	0.015	77.1	11
	32.7	0.691				63.9	
	3.27	1.22				35.6	
	0.327	1.47				22.3	
	0.0327	1.588				16.0	
	0.00327	1.77				6.3	
Erhitzung im Autoklav (121 °C, 1 bar Überdruck), 40 min	290	0.508	1.887	1.618	0.015	73.7	10
	29	0.75				60.7	
	2.9	1.199				36.8	
	0.29	1.579				16.5	
	0.029	1.565				17.2	
	0.0029	1.832				2.9	
Karotte 1 (Karotan, homolog)	6083	0.072	1.22	1.248	0.012	95.0	38.9
	608.3	0.243				80.9	
	60.83	0.54				56.3	
	6.083	0.931				23.9	
	0.6083	1.169				4.2	
	0.06083	1.203				1.4	
Blanchierte Karotten Saft A/B	632	0.144	1.22	1.248	0.012	89.1	22
	63.2	0.389				68.8	
	6.32	0.887				27.6	
	0.632	1.083				11.3	
	0.0632	1.174				3.8	
	0.00632	1.22				0	
Maische Saft A/B	294	0.165	1.22	1.248	0.012	87.3	13
	29.4	0.463				62.7	
	2.94	0.909				25.8	
	0.294	1.149				5.9	
	0.0294	1.22				0	
	0.00294	1.22				0	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B _o [Skt.]	Ext. B _u [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Feinmaische Saft A/B	175	0.28	1.22	1.248	0.012	77.8	17
	17.5	0.613				50.3	
	1.75	0.926				24.3	
	0.175	1.167				4.4	
	0.0175	1.22				0	
	0.00175	1.22				0	
Rohsaft Saft A/B	1276	0.165	1.22	1.248	0.012	87.3	45
	127.6	0.467				62.3	
	12.76	0.799				34.9	
	1.276	0.999				18.3	
	0.1276	1.22				0	
	0.01276	1.22				0	
Trester Saft A/B	96	0.359	1.22	1.248	0.012	71.3	22
	9.6	0.754				38.9	
	0.96	1.064				12.9	
	0.096	1.202				1.5	
	0.0096	1.22				0	
	0.00096	1.22				0	
Rohsaft (1 x pasteur.) Saft A	1620	0.179	1.22	1.248	0.012	86.2	48
	162	0.49				60.4	
	16.2	0.73				40.6	
	1.62	1.06				13.2	
	0.162	1.22				0	
	0.0162	1.22				0	
Rohsaft (2 x pasteur.) Saft A	801	0.25	1.22	1.248	0.012	80.3	22
	80.1	0.433				65.2	
	8.01	0.761				38.0	
	0.801	1.01				17.4	
	0.0801	1.088				10.9	
	0.00801	1.22				0	
Endprodukt Saft A	1305	0.25	1.22	1.248	0.012	80.3	10
	130.5	0.384				69.2	
	13.05	0.581				52.9	
	1.305	0.905				26.1	
	0.1305	1.041				14.8	
	0.01305	1.22				0	
Endprodukt Saft B	912	0.216	1.22	1.248	0.012	83.1	11
	91.2	0.399				68.0	
	9.12	0.633				48.6	
	0.912	0.972				20.5	
	0.0912	0.963				21.3	
	0.00912	1.134				7.1	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B ₀ [Skt.]	Ext. B _U [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Karotte 2 (Karotan, homolog)	1837	0.104	1.019	1.004	0.032	92.7	7.3
	183.7	0.163				86.7	
	18.37	0.409				61.8	
	1.837	0.699				32.4	
	0.1837	0.92				10.0	
	0.01837	0.975				4.5	
Geschälte Karotten Saft C	1080	0,084	0.99	1.047	0.025	93.9	6.0
	108	0.189				83.0	
	10.8	0.41				60.1	
	1.08	0.791				20.6	
	0.108	0.958				3.3	
	0.00108	0.982				0.8	
Blanchierte Karotten Saft C	515	0.103	1.019	1.004	0.032	92.8	3.0
	51.5	0.195				83.5	
	5.15	0.477				54.9	
	0.515	0.685				33.8	
	0.0515	0.817				20.5	
	0.00515	0.921				9.9	
Maische Saft C	360	0.111	1.019	1.004	0.032	92.0	2.1
	36	0.274				75.5	
	3.6	0.476				55.0	
	0.36	0,689				33.4	
	0.036	0.815				20.7	
	0.0036	0.881				14.0	
Gesäuerte Feinmai- sche Saft C	328	0.134	1.019	1.004	0.032	89.7	2.0
	32.8	0.274				75.5	
	3.28	0.472				55.4	
	0.328	0.723				30.0	
	0.0328	0.708				31.5	
	0.00328	0.911				10.9	
Rohsaft Saft C	628	0.111	1.019	1.004	0.032	92.0	7.9
	62.8	0.283				74.6	
	6.28	0.552				47.3	
	0.628	0.675				34.9	
	0.0628	0.793				22.9	
	0.00628	0.874				14.7	
Trester Saft C	255	0.183	1.019	1.004	0.032	84.7	8.7
	25.5	0.434				59.2	
	2.55	0.63				39.4	
	0.255	0.712				31.1	
	0.0255	0.777				24.5	
	0.00255	0.725				19.8	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B _o [Skt.]	Ext. B _u [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Endprodukt Saft C	2726	0.105	1.019	1.004	0.032	92.6	7.8
	272.6	0.202				82.8	
	27.26	0.33				69.8	
	2.726	0.688				33.5	
	0.2726	0.713				31.0	
	0.02726	0.891				13.0	
Karotte 3 (Karotan, homolog)	1837	0.104	1.019	1.004	0.032	92.7	7.3
	183.7	0.163				86.7	
	18.37	0.409				61.8	
	1.837	0.699				32.4	
	0.1837	0.92				10.0	
	0.01837	0.975				4.5	
Feinmaische Saft D	392	0.143	1.019	1.004	0.032	88.8	4.9
	39.2	0.304				72.4	
	3.92	0.549				47.6	
	0.392	0.833				18.8	
	0.0392	0.95				7.0	
	0.00392	1.019				0	
Enzymierte Maische Saft D	416	0.109	1.019	1.004	0.032	92.2	4.7
	41.6	0.278				75.1	
	4.16	0.54				48.5	
	0.416	0.777				24.5	
	0.0416	0.938				8.2	
	0.00416	1.019				0	
Erhitzte Maische Saft D	312	0.163	1.019	1.004	0.032	86.7	8.5
	31.2	0.393				63.4	
	3.12	0.628				39.6	
	0.312	0.757				26.6	
	0.0312	0.831				19.1	
	0.00312	0.982				3.7	
Trester Saft D	254	0.282	1.019	1.004	0.032	74.7	17
	25.4	0.487				53.9	
	2.54	0.722				30.1	
	0.254	0.865				15.6	
	0.0254	0.91				11.0	
	0.00254	1.019				0	
Endprodukt Saft D	504	0.135	1.019	1.004	0.032	89.6	7.4
	50.4	0.306				72.2	
	5.04	0.569				45.6	
	0.504	0.79				23.2	
	0.0504	0.937				8.3	
	0.00504	1.019				0	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B _o [Skt.]	Ext. B _u [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Karotte 4 (Karotan, homolog)	3859	0.085	1.193	1.073	0.025	94.9	22
	385.9	0.191				85.8	
	38.59	0.528				56.9	
	3.859	0.864				28.2	
	0.3859	1.092				8.7	
	0.03859	1.193				0	
Feinmaische Saft E	375	0.181	1.193	1.073	0.025	86.6	11
	37.5	0.436				64.8	
	3.75	0.754				37.6	
	0.375	0.921				23.3	
	0.0375	1.023				14.6	
	0.00375	1.155				3.3	
Enzymierte Maische Saft E	353	0.177	1.193	1.073	0.025	87.0	9.8
	35.3	0.487				60.5	
	3.53	0.706				41.7	
	0.353	0.926				22.9	
	0.0353	1.1				8.0	
	0.00353	1.137				4.8	
Erhitzte Maische Saft E	284	0.263	1.193	1.073	0.025	79.6	11
	28.4	0.494				59.9	
	2.84	0.759				37.2	
	0.284	0.886				26.3	
	0.0284	1.075				10.1	
	0.00284	1.133				5.1	
Trester Saft E	92	0.392	1.193	1.073	0.025	68.6	12
	9.2	0.64				47.4	
	0.92	0.87				27.7	
	0.092	0.937				21.9	
	0.0092	1.002				16.4	
	0.00092	1.059				11.5	
Endprodukt Saft E	776	0.207	1.193	1.073	0.025	84.4	17
	77.6	0.399				68.0	
	7.76	0.72				40.5	
	0.776	0.925				23.0	
	0.0776	1.027				14.2	
	0.00776	1.137				4.8	
Konserven 1	1212	0.379	0.961	0.97	0.011	61.3	64
	121.2	0.443				54.5	
	12.12	0.596				38.4	
	1.212	0.771				20.0	
	0.1212	0.828				14.0	
	0.01212	1.074				0	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B _o [Skt.]	Ext. B _u [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Konserven 2	162	0.357	0.961	0.97	0.011	63.6	40
	16.2	0.57				41.2	
	1.62	0.729				24.4	
	0.162	0.874				9.2	
	0.0162	0.906				5.8	
	0.00162	0.986				0	
Konserven 3	1320	0.206	0.693	0.688	0.003	70.6	264
	132	0.409				41.2	
	13.2	0.597				13.9	
	1.32	0.663				4.4	
	0.132	0.684				1.3	
	0.0132	0.723				0	
Tiefkühlware 1	342	0.136	0.662	0.655	0.001	79.6	21
	34.2	0.285				57.0	
	3.42	0.506				23,60	
	0.342	0.63				4.8	
	0.0342	0.649				2.0	
	0.00342	0.682				0	
Tiefkühlware 2	780	0.131	0.662	0.655	0.001	80.3	39
	78	0.269				59.5	
	7.8	0.475				28.3	
	0.78	0.598				9.7	
	0.078	0.615				7.1	
	0.0078	0.687				0	
Karottensalat 1	114	0.248	0.693	0.688	0.003	64.5	45
	11.4	0.496				28.6	
	1.14	0.607				12.5	
	0.114	0.74				0	
	0.0114	0.737				0	
	0.00114	0.824				0	
Karottensalat 2	246	0.251	0.693	0.688	0.003	64.1	92
	24.6	0.479				31.0	
	2.46	0.685				1.2	
	0.246	0.695				0	
	0.0246	0.684				1.3	
	0.00246	0.808				0	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B _o [Skt.]	Ext. B _u [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Trockenprodukt 1	156	0.254	0.662	0.655	0.001	61.7	68
	15.6	0.47				29.1	
	1.56	0.581				12.3	
	0.156	0.679				0	
	0.0156	0.701				0	
	0.00156	0.698				0	
Trockenprodukt 2	648	0.218	0.693	0.688	0.003	68.9	207
	64.8	0.48				30.9	
	6.48	0.668				3.6	
	0.648	0.678				2.2	
	0.0648	0.667				3.8	
	0.00648	0.754				0	
Trockenprodukt 3	246	0.192	0.662	0.655	0.001	71.1	39
	24.6	0.367				44.6	
	2.46	0.566				14.5	
	0.246	0.608				8.2	
	0.0246	0.692				0	
	0.00246	0.716				0	
Babybrei 1	180	0.429	0.961	0.97	0.011	56.0	70
	18	0.567				41.5	
	1.8	0.741				23.2	
	0.18	0.911				5.3	
	0.018	0.927				3.6	
	0.0018	0.957				0.4	
Babybrei 2	264	0.297	0.961	0.97	0.011	69.9	33
	26.4	0.505				48.0	
	2.64	0.683				29.3	
	0.264	0.827				14.1	
	0.0264	0.9				6.4	
	0.00264	0.936				2.6	
Babybrei 3	252	0.277	0.961	0.97	0.011	72.0	13
	25.2	0.416				57.4	
	2.52	0.66				31.7	
	0.252	0.705				27.0	
	0.0252	0.754				21.8	
	0.00252	0.838				13.0	

Inhibitor	Konzentration [mg/L]	Ext. [Skt.]	Ext. B _o [Skt.]	Ext. B _u [Skt.]	Ext. NSB [Skt.]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [mg/L]
Karottensaft 1	162	0.195	0.693	0.688	0.003	72.2	25
	16.2	0.384				44.8	
	1.62	0.55				20.7	
	0.162	0.583				16.0	
	0.0162	0.624				10.0	
	0.00162	0.707				0	
Karottensaft 2	66	0.292	0.909	0.889	0.004	67.6	18
	6.6	0.577				36.4	
	0.66	0.743				18.2	
	0.066	0.888				2.3	
	0.0066	0.889				2.2	
	0.00066	0.924				0	
Karottensaft 3	96	0.295	0.909	0.889	0.004	67.3	15
	9.6	0.489				46.0	
	0.96	0.689				24.1	
	0.096	0.74				18.5	
	0.0096	0.722				20.5	
	0.00096	0.912				0	
Karottensaft 4	354	0.23	0.693	0.688	0.003	67.1	81
	35.4	0.414				40.4	
	3.54	0.539				22.3	
	0.354	0.677				2.3	
	0.0354	0.674				2.8	
	0.00354	0.67				3.3	
Karottensaft 5	198	0.269	0.909	0.889	0.004	70.1	40
	19.8	0.535				41.0	
	1.98	0.767				15.6	
	0.198	0.79				13.0	
	0.0198	0.783				13.8	
	0.00198	0.846				6.9	

7.14 Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmittel, Zubehör

7.14.1 Chemikalien

Aceton	Merck	F, R11, S9-16-23.2-33
6-Aminohexansäure	Merck	
Ammoniumperoxodisulfat, p.A.	Merck	Xn, R8-22-42/43, S17-26-43.1
Anti-Human-IgE (Kaninchen)	Dako	
Anti-Kaninchen-IgG, biotinyliert (Ziege)	Dako	
Bovine Serum Albumin, pH 7, reinst	Serva	
Bromcyan	Merck	T ⁺ , C, R26/27/28-34, S9-26-45
Bromphenolblau	Merck	
1-Butanol	Merck	Xn, R10-20, S16
Citronensäure	Merck	
Colloidal Gold Total Protein Stain (Fertiglösung)	Bio Rad	S24-25
Coomassie Brilliant Blue R/G 250	Serva	
Diethylether	Merck	F ⁺ , R12-19, S9-16-29-33
Diocetylatriumsulfosuccinat (DONS)	Fluka	Xn, R22, S22-24/25
EAST-Testkit	Allergo-pharma	
Elastase (Porcine Pancreas)	ICN	
Essigsäure, purum, > 99 %	Fluka	C, R10-35, S2-23.2-26
Ethanol, 96 %	Merck	F, R11, S7-16
Ethanolamin	Merck	Xi, R20-36/37/38
Formaldehyd, 37 %	Merck	T, R23/24/25-40-43, S26-36/37-44-51
Glutardialdehyd, 25 %	Merck	T, R25-36/37/38-42/43, S36-44
Glycerin, 87 %	Fluka	
n-Hexan	Fluka	F, Xn, R11-48/20, S9-16-24/25-29-51
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck	
Magermilchpulver	Glücksklee	
2-Mercaptoethanol	Serva	T, R22-24-36/37/38, S26-36/37-45
MES SDS Running Buffer (Fertiglösung)	Novex	
MG-Marker (2.5-16.9 kDa)	Merck	
MG-Marker (14-94 kDa)	Pharmacia	
Natriumacetat-Trihydrat	Merck	
Natriumazid	Merck	T ⁺ , R28-32, S28.1
Natriumcarbonat, wasserfrei	Merck	Xi, R36, S22-26
Natriumchlorid	Merck	
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva	Xn, R20/22-36/38, S26-28
Natriumhydrogencarbonat	Merck	
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	

Natriumhydroxid	Merck	C, R35, S226-37/39
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck	
Pancreatin (Porcine Pancreas)	Sigma	
Pepsin	Merck	
o-Phosphorsäure, 85 %	Merck	C, R34, S26-36/37/39-45
Ovalbumin	Fluka	
PBS-Tabletten	Serva	
Protease Typ XI (aus T. album)	Sigma	
Pufferlösung (pH 4.0)	Merck	
Pufferlösung (pH 7.0)	Merck	
Pyronin Y	Fluka	
Salzsäure, 37 %	Merck	C, R34-37, S26-36/37/39-45
Silbernitrat	Merck	C, R34, S26-45
Streptavidin-HRP-Konjugat	Medac	
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Fluka	
Titriplex III (EDTA)	Serva	Xn, R22
Tricin SDS Running Buffer (Fertiglösung)	Novex	
Tris-hydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck	Xi, R36/38
Trypsin	Sigma	
Tween 20	Serva	
Wasserstoffperoxid, 30 %	Merck	C, R34, S28-36/39

7.14.2 Geräte

Autoklav	Sano clav MCS-123	Wolf (Bad Überkingen-Hausen, Deutschland)
Blotting-Elektroden	Nova Blot 2117-250	LKB (Uppsala, Schweden)
Elektrophorese-Kammer	EI-9001-Xcell II Mini Cell	Novex (San Diego, CA, USA)
ELISA-Reader	Microplate Reader MRX	Dynex Technologies (Frankfurt, Deutschland)
Kühlschrank		Eisfink (Asperg, Deutschland)
Kühltruhe (-20 °C)	GTS 3663	Liebherr (Bischofshofen, Österreich)
Kühltruhe (-80 °C)	KLS 3085-1	Kryotec (Hamburg, Deutschland)
Gefriertrocknungsanlage I	Gamma A	Christ (Osterode, Deutschland)
Gefriertrocknungsanlage II	Beta 1-16	Christ (Osterode, Deutschland)
Magnetrührer		Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Mikrowelle		Sharp (Hamburg, Deutschland)
pH-Elektrode	H 6160	Schott (Mainz, Deutschland)
pH-Meter	CG 801	Schott (Mainz, Deutschland)
Schüttler	Typ 3016	GFL (Hannover, Deutschland)
Stromversorger I	Multi Drive XL	LKB (Uppsala, Schweden)
Stromversorger II	Power Ease 500	Novex (San Diego, CA, USA)
Thermostat	MGW Lauda RMT 6	Lauda (Lauda-Königshofen, Deutschland)

Trockenschrank		Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Ultra-Turrax	T 25	Jahnke und Kunkel (Staufen i. Br., 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)
Zentrifuge I	3 K 15	Sigma (Osterode, Deutschland)
Zentrifuge II	3 K 12	Sigma (Osterode, Deutschland)

7.14.3 Verbrauchsmittel, Zubehör

Blotmembran	Nitrocellulose, 0.2 µm	Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland)
Dauer-Elektrodenbrücken	Haushaltstücher	Vileda (Weinheim, Deutschland)
Färbe-Kunststoffschalen	8 Kammern	Bio Rad (Herkules, CA, USA)
Filterpapierscheiben	Rundfilter 6 mm	Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland)
Latexhandschuhe		
Folienglätter		Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Pinzette		
Probengefäße	Glas, 4 mL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Safe Lock, 2 mL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Stepper		Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipetten		Labsystems (Helsinki, Finnland)
Pipettenspitzen		Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Membranfilter		Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)
NuPAGE™ 10 % Bis-Tris Gele	1 mm; 10, 15 und 2D well	Novex (San Diego, CA, USA)
NuPAGE™ 16 % Tricin-Gele	1 mm; 10 well	Novex (San Diego, CA, USA)
Parafilm		American National Can (Neenah, WI, USA)
Mikrotiterplatten	Minisorb, 96 Kavitäten	Nunc (Roskilde, Deutschland)

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ANDRÉ F, ANDRÉ C, COLIN L, CACARACI F & CAVAGNA S (1994) Role of new allergens and of allergen consumption in the increased incidence of food sensitizations in France. *Toxicology* **93** 77-83
- ASERO R (1997) Relevance of pollen-specific IgE levels to the development of Apiaceae hypersensitivity in patients with birch pollen allergy. *Allergy* **52** 560-564
- ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, ANTONIOTTI P, CISLAGHI C & FALAGIANI P (1999) A new apple extract. *Allergy* **54** 87-88
- ASSELIN J, HÉBERT J & AMIOT J (1989) Effects of in vitro proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. *J Food Sci* **54** 1037-1039
- ASTWOOD JD, LEACH JN & FUCHS RL (1996) Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnol* **14** 1269-1273
- AULEPP H & VIETHS S (1992) Probleme der Nahrungsmittelallergie. *Dtsch Lebensm Rundsch* **88** 171-179
- BARGMAN TJ, RUPNOW JH & TAYLOR SL (1992) IgE-Binding proteins in almonds (*Prunus amygdalus*); identification by immunoblotting with sera from almond-allergic adults. *J Food Sci* **57** 717-720
- BAUER L, EBNER C, HIRSCHWEHR R, WÜTHRICH B, PICHLER C, FRITSCH R, SCHEINER O & KRAFT D (1996) IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: immunoblot investigation of birch-mugwort-celery-syndrome. *Clin Exp Allergy* **26** 1161-1170
- BOARD OF TRUSTEES (ed) (1995) Simulated Gastric Fluid. *The United States Pharmacopeia* **23** 2053
- BOCCAFOGLI A, VICENTINI L, CAMERANI A, COGLIATI P, D'AMBROSI A & SCOLOZZI F (1994) Adverse food reactions in patients with grass pollen allergic respiratory disease. *Allergy* **73** 301-308
- BOCK SA & ATKINS EM (1990) Pattern of food hypersensitivity during sixteen years of double-blind, placebo controlled food challenges. *J Pediatr* **117** 561-567
- BOEHNCKE WH, LOELIGER C, KUEHNEL P, KALBACHER H, BOHM BO & GALL H (1998) Identification of HLA-DR and DQ alleles conferring susceptibility to pollen allergy and pollen associated food allergy. *Clin Exp Allergy* **28** 434-441

- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72** 248-254
- BREITENEDER H, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, O'RIORDAIN G, SUSANI M, AHORN H, EBNER C, KRAFT D & SCHEINER O (1995) Molecular characterization of Api g 1, the major allergen of celery (*Apium graveolens*), and its immunological and structural relationships to a group of 17 kDa tree pollen allergens. *Eur J Biochem* **233** 484-489
- BRENNA O, POMPEI C, ORTOLANI C, PRAVETTONI V, FARIOLI L & PASTORELLO E (2000) Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *J Agric Food Chem* **48** 493-497
- BRUIJNZEL-KOOMEN C, ORTOLANI C, AAS K, BINDSLEV-JENSEN C, BJÖRKSTEN B & WÜTHRICH B (1995) Adverse reactions to food: Position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* **50** 623-635
- BUISSERET PD (1988) Allergie: Wenn die Immunantwort Fehler macht; in: Spektrum der Wissenschaft: Immunsystem, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 140-150
- BURKS AW, WILLIAMS LW, HELM RM, THRESHER W, BROOKS JR & SAMPSON HA (1991) Identification of soy protein allergens in patients with atopic dermatitis and positive soy challenges; determination of change in allergenicity after heating or enzyme digestion; in: Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing (Friedman M, ed) Plenum Press New York 295-307
- BURKS AW, WILLIAMS LW & THRESHER W (1992) Allergenicity of peanut and soybean extracts altered by chemical or thermal denaturation in patients with atopic dermatitis and positive food challenge. *J Allergy Clin Immunol* **90** 889-897
- BURKS AW & SAMPSON H (1993) Food allergies in children. *Curr Probl Pediatr* **23** 230-252
- CABALLERO T, PASCUAL C, GARCIA-ARA MC, OJEDA JA & MARTIN-ESTEBAN M (1997) IgE cross-reactivity between mugwort pollen (*Artemisia vulgaris*) and hazelnut (*Abellana nux*) in sera from patients with sensitivity to both extracts. *Clin Exp Allergy* **27** 1203-1211
- CABALLERO T & MARTIN-ESTEBAN M (1998) Association between pollen hypersensitivity and edible vegetable allergy: A review. *Invest Allergol Clin Immunol* **8** 6-16
- CALKHOVEN PG, AALBERSE M, KOSHTÉ VL, POS O, OEI HD & AALBERSE RC (1987) Cross reactivity among birch pollen, vegetables and fruits as detected by IgE antibodies is due to at least three distinct cross reactive structures. *Allergy* **42** 382-390
- CASTILLO R, DELGADO J, QUIRALTE J, BLANCO C & CARRILLO T (1996) Food hypersensitivity among adult patients: epidemiological and clinical aspects. *Allergol Immunopathol (Madrid)* **24** 93-97

- CESKA M & LUNDKVIST U (1972) A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochem* **9** 1021-30
- CHANDRA RK (1997) Food hypersensitivity and allergic disease: a selective review. *Am J Clin Nutr* **66** 526S-529S
- CLEMENTS RL (1965) Fruit proteins: extraction and electrophoresis. *Anal Biochem* **13** 390-401
- COOMBS RRA & GELL PGH (1963) The classification of allergic reactions underlying disease; in: Clinical aspects of immunology, Davis, Philadelphia 317
- CRESPO JF, 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
- DANSCHER G & NOORGARD JOR (1983) Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* **31** 1394-1399
- DE GROOT H, DE JONG NW, VUIJK MH & GERTH VAN WIJK R (1996) Birch pollinosis and atopy caused by apple, peach and hazelnut; comparison of three extraction procedures with two apple strains. *Allergy* **51** 712-718
- DIETSCHI R, WÜTHRICH B & JOHANSSON SGO (1987) Zum sogenannten "Sellerie-Karotten-Beifuß-Gewürz-Syndrom": RAST-Resultate mit neuen Gewürzdiscs. *Z Hautkr* **62** 524-531
- DIEZ-GOMEZ ML, QUIRCE S, CUEVAS M, SANCHEZ-FERNANDEZ C, BAZ G, MORADIELLOS FJ & MARTINEZ A (1999) Fruit-pollen-latex-cross-reactivity: implication of profilin (Bet v 2). *Allergy* **54** 951-961
- DOMINGUEZ J, CUEVAS M, URENA V, MUNOZ T & MONEO I (1990) Purification and characterization of an allergen of mustard seed. *Ann Allergy* **64** 352-357
- DREBORG S (1988) Food allergy in pollen-sensitive patients. *Ann Allergy* **61** 41-46
- DREBORG S & FOUCARD T (1983) Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy* **38** 167-72
- EBNER C, BIRKNER T, VALENTA R, RUMPOLD H, BREITENBACH M, SCHEINER O & KRAFT D (1991) Common epitopes of birch pollen and apples – studies by Western and Northern blot. *J Allergy Clin Immunol* **88** 588-594
- EBNER C, HIRSCHWEHR R, BAUER L, BREITENEDER H, VALENTA R, EBNER H, KRAFT D & SCHEINER O (1995) Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol* **95** 962-969
- EGGER D & BIENZ K (1987) Colloidal gold staining and immunoprobng of proteins on the same nitrocellulose blot. *Anal Biochem* **166** 413-417

- ERIKSSON NE, FORMGREN H & SVENONIUS E (1982) Food hypersensitivity in patients with birch pollen allergy. *Allergy* **37** 437-443
- ETESAMIFAR M & WÜTHRICH B (1998) IgE-mediated food allergies including oral allergy syndrome in 383 patients. *Allergologie* **21** 451-457
- FAHLBUSCH B, RUDESCHKO O, MÜLLER WD, SCHLENGVOIGT G, VETTERMANN S & JÄGER L (1995) Purification and characterization of the major allergen from apple and its allergenic cross-reactivity to Bet v 1. *Int Arch Allergy Immunol* **108** 119-126
- FERNANDEZ-RIVAS M, VAN REE R & CUEVAS M (1997) Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *J Allergy Clin Immunol* **100** 728-733
- FERNANDEZ-RIVAS M & CUEVAS M (1999) Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clin Exp Allergy* **29** 1239-1247
- FLING PS & GREGERSON DS (1986) Peptide and protein molecular weight determination by using a high molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* **155** 83-88
- FRITSCH R, BOHLE B, VOLLMANN U, WIEDERMANN U, JAHN-SCHMID B, KREBITZ M, BREITENEDER H, KRAFT D & EBNER C (1998) Bet v 1, the major birch pollen allergen, and Mal d 1, the major apple allergen, cross-react at the level of allergen-specific T helper cells. *J Allergy Clin Immunol* **102** 679-686
- GALLATI H & PRACHT L (1985) Peroxidase aus Meerrettich: Klinische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin. *J Clin Chem Clin Biochem* **23** 453-460
- GOMEZ M, CURIEL G, MENDEZ J, RODRIGUEZ M & MONEO I (1996) Hypersensitivity to carrot associated with specific IgE to grass and tree pollens. *Allergy* **51** 425-429
- HAEBERLE M (1987) Biogene Amine-klinische und lebensmittelchemische Aspekte. *Zbl Haut* **152** 157-168
- HALMEPURO L, VUONTELA K, KALIMO K & BJÖRKSTEN F (1984) Cross reactivity of IgE antibodies with allergens in birch pollens, fruits and vegetables. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **74** 235-240
- 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
- HEFLE SL (1996) The chemistry and biology of food allergens. *Food Technol* **50** 86-92
- HEINER DC & NEUCERE NJ (1975) RAST analysis of peanut allergens. *J Allergy Clin Immunol* **55** 82-83

- HEISS S, FISCHER S, MÜLLER WD, WEBER B, HIRSCHWEHR R, SPITZAUER S, KRAFT D & VALENTA R (1996) Identification of a 60 kd cross-reactive allergen in pollen and plant-derived food. *J Allergy Clin Immunol* **98** 938-947
- HELBLING A, LÓPEZ M, SCHWARZ HJ & LEHRER SB (1993) Reactivity of carrot-specific IgE antibodies with celery, apiaceous spices and birch pollen. *Ann Allergy* **70** 495-499
- HELBLING A, SCHWARZ HJ, LÓPEZ M & LEHRER SB (1994) Lettuce and carrot allergy: are they related? *Allergy Proc* **15** 33-38
- HERKENRATH C, GOTTMANN-LUCKERATH I & STEIGLEDER GK (1982) Combined allergy against hazel pollen and hazelnuts. *Z Hautkr* **57** 1399-1405
- HEUKESHOVEN J & DERNICK R (1986) Silberfärbung; In: Radola BJ (ed.), Elektrophoreseforum, TU München 22-27
- HILL DJ, HOSKING CS, ZHIE CY, LEUNG R, BARATWIDJAJA K & IKURA Y (1997) The frequency of food allergy in Australia and Asia. *Environ Toxicol Pharmacol* **4** 101-110
- HIRSCHWEHR R, VALENTA R, EBNER C, FERREIRA F, SPERR WR, VALENT P, ROHAC M, RUMPOLD H, SCHEINER O & KRAFT D (1992) Identification of common allergenic structures in hazel pollen and hazelnuts: A possible explanation for sensitivity to hazelnuts in patients allergic to tree pollen. *J Allergy Clin Immunol* **90** 927-936
- HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, O'RIORDAIN G, AHORN H, EBNER C, LAIMA DA CAMARA MACHADO M, PÜHRINGER H, SCHEINER O & BREITENEDER H (1999) Molecular characterization of Dau c 1, the Bet v 1 homologous protein from carrot and its cross reactivity with Bet v 1 and Api g 1. *Clin Exp Allergy* **29** 840-847
- HSIEH LS, MOOS JR M & LIN Y (1995) Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J Allergy Clin Immunol* **96** 960-970
- JANEWAY CA JR (1993) Das molekulare Arsenal des Immunsystems, in: Spektrum der Wissenschaft: Immunabwehr, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford. 22-29
- JANEWAY CA & TRAVERS P (1995) *Immunologie* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- JANKIEWICZ A, BALTES W, VIETHS S, BÖGL KW & DEHNE LI (1995) Nachweis von allergenen Sellerieproteinen in verarbeiteten Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie* **49** 10
- JANKIEWICZ A, AULEPP H, BALTES W, BÖGL KW, DEHNE LI, ZUBERBIER T & VIETHS S (1996) Allergic sensitization to native and heated celery root in pollen sensitive patients investigated by skin test and IgE binding. *Int Arch Allergy Immunol* **111** 268-278

- JANKIEWICZ A, BALTES W, BÖGL KW, DEHNE LI, JAMIN A, HOFFMANN A, HAUSTEIN D & VIETHS S (1997) Influence of food processing on the immunochemical stability of celery allergens. *J Sci Food Agric* **75** 359-370
- JANKIEWICZ A, AULEPP H, ALTMANN F, FÖTISCH K & VIETHS S (1998) Serological investigation of thirty celery allergic patients with particular consideration of the thermal stability of IgE binding celery allergens. *Allergo J* **7** 87-95
- JENSEN-JAROLIM E, WIEDERMANN U, GANGLBERGER E, ZÜRCHER A, STADLER BM, BOLTZ-NITULESCU G, SCHEINER O & BREITENEDER H (1999) Allergen mimotopes in food enhance type I allergic reactions in mice. *FASEB J* **13** 1586-1592
- JOHNSON DA, GAUTSCH JW, SPORTSMAN JR & ELDER JH (1984) Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal Technol* **1** 3-11
- JORDAN-WAGNER DL, WHISMAN BA & GOETZ DW (1993) Cross-allergenicity among celery, cucumber, carrot, and watermelon. *Ann Allergy* **71** 70-79
- KOPPELMAN SJ, BRUIJNZEEL-KOOMEN CA, HESSING M & DE JONGH HH (1999) Heat induced conformational changes of Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties. *J Biol Chem* **274** 4770-4777
- KYHSE-ANDERSEN J (1984) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10** 203
- LAHTI A, BJÖRKSTEN F & HANNUKSELA M (1980) Allergy to birch pollen and apple, and cross reactivity of the allergens studied with the RAST. *Allergy* **35** 297-300
- LEHRER SB, HORNER WE & REESE G (1996) Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Crit Rev Food Sci Nutr* **36** 553-564
- LEITNER A, JENSEN-JAROLIM E, GRIMM R, WÜTHRICH B, EBNER H, SCHEINER O, KRAFT D & EBNER C (1998) Allergens in pepper and paprika. Immunologic investigation of the celery-mugwort-spice-syndrome. *Allergy* **53** 36-41
- LIECHTENSTEIN LM (1993) Allergie und Immunsystem, in: Spektrum der Wissenschaft: Immunabwehr, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford. 110-119
- MARTINEZ A, FERNANDEZ-RIVAS M, MARTINEZ J & PALACIOS R (1997) Improvement of fruit allergenic extracts for immunoblotting experiments. *Allergy* **52** 155-161
- MOEREMANS M, DANEELS G, & DE MEY J (1985) Sensitive colloidal metal (gold or silver) staining of protein blots on nitrocellulose membranes. *Anal Biochem* **145** 315-321

- 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
- MONEO I, GOMEZ M, SANCHEZ-MONGE R, ALDAY E, DE LAS HERAS M, ESTABAN I, BOOTELLO A & SALCEDO G (1999) Lack of cross reaction with Bet v 1 in patients sensitized to Dau c 1, a carrot allergen. *Ann Allergy* **83** 71-75
- MONERET-VAUTRIN DA & KANNY G (1995) Food-induced anaphylaxis. A new french multicenter survey. *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris)* **31** 256-263
- NIESTIJL JANSEN JJ, KARDINAAL AFM, HUIJBERS G, Vlieg-BOERSTRA BJ, MARTENS BP & OCKHUIZEN T (1994) Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol* **93** 446-456
- NORDLEE JA, TAYLOR SL, JONES RT & YUNGINGER JW (1981) Allergenicity of various peanut products as determined by RAST inhibition. *J Allergy Clin Immunol* **68** 376-382
- ORTOLANI C, ISPANO M, PASTORELLO E, BIGI A & ANSALONI R (1988) The oral allergy syndrome. *Ann Allergy* **61** 47-52
- ORTOLANI C, PASTORELLO EA, FARIOLI L, ISPANO M, PRAVETTONI V, BERTI C, INCORVAIA C & ZANUSSI C (1993) IgE-mediated allergy from vegetable allergens. *Ann Allergy* **71** 470-476
- PASTORELLO EA, PRAVETTONI V, FARIOLI L, ISPANO M, FORTUNATO D, MONZA M, GIUFFRIDA MG, RIVOLTA F, SCIBOLA E, ANSALONI R, INCORVAIA C, CONTI A & ORTOLANI C (1999) Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen. *J Allergy Clin Immunol* **104** 1099-1106
- PECORONI S, HANNAK K, GIER SCHNER K (1993) Influence of added ascorbic acid on the intensity and stability of the turbidity in natural cloudy apple juice. XXI. Berichtsband der Wissenschaftlich-Technischen Kommission der internationalen Fruchtsaftunion, Budapest
- PECORONI S & GÜNNIEWIG W (1997) Innovative Dekantertechnologie. *Flüss Obst* **64** 55-59
- PERREN R (1996) Rösttechnologie von Haselnüssen, Teil 1: Einfluß von Produkttemperatur und Röstgrad auf die Oxidationsstabilität der gerösteten Nüsse. *Z Süßwarenwirtschaft* **1** 12-15
- PETERSEN A, VIETHS S, AULEPP H, SCHLAAK M & BECKER WM (1996) Ubiquitous structures responsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* **98** 805-815
- PICHLER WJ, STICH O (1993) Nahrungsmittelallergien bei Pollensensibilisierungen. Teil II: Kreuzreaktionen bei Beifußpollen-Sensibilisierungen. *Allergologie* **16** 494-501
- V PIRQUET C (1906) Allergie. *Münch Med Wschr* **30** 1457-1458

- POFFET JR (1997) Polyphenole im Apfel- und Birnensaft. *Flüss Obst* **64** 348-353
- PUMPHREY RSH, WILSON PB, FARAGHER EB & EDWARDS SR (1999) Specific immunoglobulin E to peanut, hazelnut and brazil nut in 731 patients: similar patterns found at all ages. *Clin Exp Allergy* **29** 1256-1259
- QUIRCE S, BLANCO R, DIEZ-GOMEZ ML, CUEVAS M, EIRAS P & LOSADA E (1997) Carrot-induced asthma: Immunodetection of allergens. *J Allergy Clin Immunol* **99** 718-719
- RANCE F, DUTAU G (1997) Labial food challenge in children with food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* **8** 41-44
- RING J (1988) Angewandte Allergologie, 2. Auflage, Medizin Verlag GmbH, München
- RING J (1989) Nahrungsmittelallergien und andere nahrungsmittelbedingte Unverträglichkeitsreaktionen. *Akt Ernährung* **14** 49-56
- ROITT IM (1993) Leitfaden der Immunologie, 4. Auflage, Blackwell Wissenschaft, Berlin
- ROSSI RE, MONASTEROLO G, OPERTI D, CORSI M (1996) Evaluation of recombinant allergens Bet v 1 and Bet v 2 (profilin) by Pharmacia CAP system in patients with pollen-related allergy to birch and apple. *Allergy* **51** 940-945
- RUDESCHKO O, FAHLBUSCH B, HENZGEN M, SCHLENVOIGT G, HERRMANN D, VIETHS S & JÄGER I (1995) Investigation of the stability of apple allergen extracts. *Allergy* **50** 575-580
- SAMPSON HA, MENDELSON L & ROSEN JP (1992) Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *New Engl J Med* **327** 380-384
- SAMPSON HA & HO DG (1997) Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol* **100** 444-451
- SANCHEZ-MONGE R, LOMBARDERO M, GARCIA-SELLES FJ, BARBER D & SALCEDO G (1999) Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol* **103** 514-519
- SAVAL P, FUGLSANG G, MADSEN C & OSTERBALLE O (1993) Prevalence of atopic disease among Danish school children. *J Pediatr Allergy* **4** 117-129
- SCHEURER S, SON DY, BOEHM M, KARAMLOO F, FRANKE S, HOFFMANN A, HAUSTEIN D & VIETHS S (1999) Cross-reactivity and epitope analysis of Pru a 1, the major cherry allergen. *Mol Immunol* **36** 155-167
- SCHOCKER F, LEPP U, THOMAS M, SCHLAAK M & BECKER WM (1999) Identifizierung und Charakterisierung nicht pollenassoziierter Allergene der Haselnuß. *Allergo J* **8** 32

- SEIFERT HU, SEIFERT B, DÜNGEMANN H, VOCKS E, BORELLI S & GUGGER A (1988) Immunologische Kreuzreaktionen bei Nüssen, Roggenmehl, Kiwi, Sesam und Mohnsamen. *Allergologie* **11** 169-172
- SON DY, SCHEURER S, HOFFMANN A, HAUSTEIN D & VIETHS S (1995) Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Eur J Nutr* **38** 201-215
- STÄHLE-HAMATSCHEK S & GIERSCHEK K (1989) Trubzusammensetzung und ihr Einfluß auf die Trübungsstabilität in naturtrüben Apfelsäften. *Flüss Obst* **56** 543-557
- STEINHART H, PASCHKE A, BREDEHORST R, VIETHS S (Ed.) (2001) Elucidation of allergens and food. *J Chrom B; Special Issue* im Druck
- TAYLOR SL (1992) Chemistry and Detection of Food Allergens. *Food Technol* **5** 146-152
- TEUBER SS, BROWN RL & HAAPANEN LA (1997) Allergenicity of gourmet nut oils processed by different methods. *J Allergy Clin Immunol* **99** 502-507
- VALENTA R, BREITENEDER H, PETTENBURGER K, BREITENBACH M, RUMPOLD H, KRAFT D & SCHEINER O (1991) Homology of the major birch pollen allergen, Bet v 1, with the major allergens of alder, hazel and hornbeam at the nucleic acid level as determined by cross-hybridization. *J Allergy Clin Immunol* **87** 677-682
- VALENTA R, DUCHENE M, EBNER C, VALENT P, SILLABER C, DEVILLER P, FERREIRA F, TEIKL M, EDELMAN H, HIRSCHWEHR R, EBNER C, KRAFT D & SCHEINER O (1992A) Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med* **175** 377-385
- VALENTA R, DUCHENE M, VRTALA S, VALENT P, SILLABER C, FERREIRA F, TEJKL M, HIRSCHWEHR R, EBNER C, KRAFT D & SCHEINER O (1992B) Profilin, a novel plant pan-allergen. *Int Arch Allergy Immunol* **99** 271-273
- VANEK-KREBITZ M, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, LAIMER DE CAMARA MACHADO M, SUSANI M, EBNER C, KRAFT D, SCHEINER O & BREITENEDER H (1995) Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*) and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochem Biophys Res Commun* **211** 538-551
- VAN REE R, VOITENKO V, VAN LEEUVEN WA & AALBERSE RC (1992) Profilin is a cross reactive allergen in pollen and vegetable foods. *Int Arch Allergy Immunol* **98** 97-104
- VAN REE R, FERNANDEZ-RIVAS M, CUEVAS M, VAN WIJNGAARDEN M & AALBERSE RC (1995) Pollen-related allergy to peach and apple: an important role for profilin. *J Allergy Clin Immunol* **95** 726-734
- VIELUF D, BEIL D, BEAUREGARD K, VIELUF I, KINDER H, BEHRENDT H, STEINHART H & RING J (1997) Xenobiotics and food allergy: in vivo and in vitro studies in patients with apple allergy. *Int Arch Allergy Immunol* **113** 352-54

- VIETHS S, SCHÖNING B, BROCKMANN S & AULEPP H (1992A) Untersuchungen zur Allergie gegen Lebensmittel pflanzlicher Herkunft: Herstellung und Charakterisierung von Obst- und Gemüseextrakten für serologische Untersuchungen. *Dtsch Lebensm Rundsch* **88** 239-43 + 273-78
- VIETHS S, BROCKMANN S & SCHÖNING B (1992B) Nahrungsmittelallergie gegen Obst und Gemüse: Eine aktuelle serologische Untersuchung zur Sensibilisierung von Pollenallergikern. *Allergologie* **15** 367-379
- VIETHS S, SCHÖNING B & BALTES W (1992C) Allergy to fruits and vegetables in pollen-sensitive patients: Allergen characterization by IgE immunoblotting and peroxidase staining. *Food Agric Immunol* **4** 181-197
- VIETHS S, SCHÖNING B & JANKIEWICZ A (1993A) Occurrence of IgE binding allergens during ripening of apple fruits. *Food Agric Immunol* **5** 93-105
- VIETHS S, SCHÖNING B, AULEPP H & BALTES W (1993B) Identifizierung kreuzreagierender Allergene in Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie* **47** 49-53
- VIETHS S, JANKIEWICZ A, SCHÖNING B & AULEPP H (1994A) Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18 kDa allergen. *Allergy* **49** 262-271
- VIETHS S, FISCHER K, DEHNE LI, AULEPP H, WOLLENBERG H & BÖGL KW (1994B) Versteckte Allergene in Lebensmitteln. *Bundesgesundhbl* **2** 51-60
- VIETHS S, JANCK K, AULEPP H & PETERSEN A (1995) Isolation and characterization of the 18 kDa major apple allergen and comparison with the major birch pollen allergen (Bet v 1). *Allergy* **50** 421-430
- VIETHS S, JANKIEWICZ A, AULEPP H & HAUSTEIN D (1997) Allergy to heated and processed foods. *Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut* **91** 250-262
- VIETHS S, HOFFMANN A, HOLZHAUSER T, MÜLLER U, REINDL J & HAUSTEIN D (1998) Factors influencing the quality of food extracts for in vitro and in vivo diagnosis. *Allergy* **53** 65-71
- VIETHS S, REINDL J, MÜLLER U, HOFFMANN A & HAUSTEIN D (1999) Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple in vitro procedure. *Eur Food Res Technol* **209** 379-388
- VOCKS E, BORGA A, SZLISKA C, SEIFERT HU, SEIFERT B, BUROW G & BORELLI S (1993) Common allergenic structures in hazelnut, rye grain, sesame seeds, kiwi and poppy seeds. *Allergy* **48** 168-172
- WADEE A, BOTING L & RABSON A (1990) Fruit allergy: demonstration of IgE antibodies to a 30 kDa protein present in several fruits. *J Allergy Clin Immunol* **85** 801-807

WÜTHRICH B & DIETSCHI R (1985) The celery-carrot-mugwort-condiment syndrome: skin test and RAST results. *Schweiz Med Wschr* **115** 258-264

WÜTHRICH B (1986) Nahrungsmittelallergien. *Internist* **27** 362-371

WÜTHRICH B, STÄGER J & JOHANSSON SG (1990) Celery allergy associated with birch and mugwort pollinosis. *Allergy* **45** 566-571

WÜTHRICH B, SCHNYDER UW, HENAUER SA & HELLER A (1993) Häufigkeit der Pollinosis in der Schweiz. Ergebnisse einer repräsentativen Umfrage unter Berücksichtigung allergischer Erkrankungen. *Schw med Wschr* **116** 909-917

WÜTHRICH B (1993) Zur Nahrungsmittelallergie. *Allergologie* **16** 280-287

WÜTHRICH B (1996) Diagnostik-Häufigkeit der Symptome und der allergieauslösenden Nahrungsmittel bei Erwachsenen; in: Wüthrich B (ed.): Nahrungsmittel und Allergie, Düstri-Verlag, München

YOUNG E, STONEHAM MD, PETRUCKEVICH A, BARTON J & BUCKS UK (1994) A population study of food intolerance. *Lancet* **343** 1127-1130

ZIMMER, E., PECORONI, S., DIETRICH, H., GIER SCHNER, K.: Verfahrenstechnische und chemische Grundlagen der Herstellung von trübem Apfelsaft unter besonderer Berücksichtigung von kontinuierlichen Verfahren. *Flüss. Obst* **61** 405-412 (1994)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Michael Wigotzki
geboren am:	28.01.1972
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1978 - 1982	Grundschule Bandwirkerstraße in Hamburg
1982 - 1991	Matthias-Claudius-Gymnasium in Hamburg Abschluß: Abitur

Bundeswehr

1991 - 1992	Grundwehrdienst in Itzehoe (Beobachtungsbataillon 63)
-------------	---

Studium

1992 - 1997	Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Hamburg
April 1997	Erste lebensmittelchemische Staatsprüfung sowie Diplom in Lebensmittelchemie Titel der Diplomarbeit: "Beitrag zur Aufklärung der Epitopstrukturen der Hauptallergene der Kiwi"

Berufstätigkeit

1997 - 2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie der Universität Hamburg
-------------	--

Praktikum

seit November 2000	Lebensmittelchemisches Praktikum im Hygiene Institut Hamburg
--------------------	---

Vorträge und Poster

M. WIGOTZKI, H. STEINHART & A. PASCHKE:

Einfluß der Verarbeitung auf die Allergenität von Haselnüssen. *Arbeitstagung des Regionalverbandes Nord der GDCh, Fachgruppe Lebensmittelchemie, April 1999 (Hamburg)*

M. WIGOTZKI, H. STEINHART & A. PASCHKE:

Untersuchung der Allergenität von Haselnüssen in verarbeiteten Produkten. *Deutscher Lebensmittelchemikertag, September 1999 (Hamburg)*

M. WIGOTZKI, H. STEINHART & A. PASCHKE:

Untersuchungen zur Allergenität von Äpfeln während der Safftherstellung. *Deutscher Lebensmittelchemikertag, September 2000 (Stuttgart)*

Publikationen

H. STEINHART, D. BEIL, H. KINDER, M. WIGOTZKI & A. PASCHKE (1998): Lebensmittel-Allergien und andere Überempfindlichkeitsreaktionen. *Getreide Mehl und Brot* **52** 118-120

M. WIGOTZKI, S. SCHUBERT, H. STEINHART & A. PASCHKE (2000): Effects of in vitro Digestion on the IgE-binding Activity of Proteins from Hazelnuts (*Corylus avellana*). *Internet Symposium on Food Allergens* **2** 1-8

M. WIGOTZKI, H. STEINHART & A. PASCHKE (2000): Influence of Varieties, Storage and Heat Treatment on IgE-Binding Proteins in Hazelnuts (*Corylus avellana*). *Food and Agricultural Immunology* **12** 217-229

M. WIGOTZKI, H. STEINHART & A. PASCHKE (2001): Determination of the Allergenicity of Various Hazelnut Products by Immunoblotting and EAST-Inhibition. In: H. Steinhart, A. Paschke, R. Bredehorst & S. Vieths (Hrsg.): Elucidation of allergens and food. *Journal of Chromatography B; Special Issue* **im Druck**

A. PASCHKE, K. ZUNKER, M. WIGOTZKI & H. STEINHART (2001): Determination of the IgE-binding activity of soy lecithin and refined and non refined soybean oils. In: H. Steinhart, A. Paschke, R. Bredehorst & S. Vieths (Hrsg.): Elucidation of allergens and food. *Journal of Chromatography B; Special Issue* **im Druck**

H. STEINHART, M. WIGOTZKI & K. ZUNKER (2001): Introducing allergists to food chemistry. *Allergy* **56** 9-11

A. PASCHKE, H. KINDER, K. ZUNKER, M. WIGOTZKI, R. WEßBECHER, I. VIELUF, H. STEINHART (2001): Characterization of Cross-reacting Allergens in Mango Fruit. *Allergy* **56** 237-242