

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 Apfelmaischn hergestellt. Nahezu alle untersuchten Zwischenstufen wiesen ein allergenes Restpotential auf. Die nach verschiedenen Standzeiten aus den Apfelmaischn

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 Karottensaftherstellung 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*, *Levantine*, *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.