
Chemische Evaluierung des allergenen Potentials
tierischer Proteine in Weinen durch
immunologische, elektrophoretische und
chromatographische Verfahren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

aus dem
Institut für Lebensmittelchemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Patrick Weber
aus Hamburg

Hamburg 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2006 bis November 2009 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Bisping

Tag der Disputation: 5. Februar 2010

Prüfungskommission:
Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
Prof. Dr. E. Stahl-Biskup
Dr. A. Paschke

Danksagungen

Bedanken möchte ich mich zuallererst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart für die Möglichkeit, diese Dissertation am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg anfertigen zu können. Besonderer Dank gilt hier Frau Dr. Angelika Paschke, die diese Dissertation im Arbeitskreis Lebensmittelallergie betreut hat und jederzeit für mich ein offenes Ohr hatte und mich sowohl fachlich, als auch menschlich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt hat. Natürlich möchte ich mich in diesem Zusammenhang auch bei Herrn Prof. Dr. Bernward Bisping für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens dieser Dissertation bedanken.

Für die finanzielle Ermöglichung dieser Arbeit gilt mein Dank Herrn Dr. Klaus Rückrich und Herrn Dr. Rudolf Nickenig vom Deutschen Weinbauverband e. V., sowie Frau Dr. Claudia Stein-Hammer und Frau Ursula Fradera von der Deutschen Weinakademie GmbH. Die nette Zusammenarbeit und Unterstützung hat mir jederzeit Freude bereitet und meine Arbeit sehr erleichtert.

Mit Rat und Tat zur Seite standen mir im Verlauf meiner Dissertation auch besonders Herr Siegmart Görtges und Herr Dr. Jürgen Meinl von der Erbslöh GmbH, sowie Herr Dr. Hartmut Rehbein vom Max Rubner Institut. Hierfür möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Auch möchte ich mich herzlich bei den wissenschaftlichen Projektpartnern bedanken, die diese Arbeit mit ihrer äußerst fruchtbaren Kooperation unterstützt haben. Besonderer Dank geht hierbei an Herrn Dr. Gerhard Scholten und Herrn Hans-Peter Bach vom Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Mosel, Herrn Dr. Hartmut Kratzin vom Max Planck Institut in Göttingen, sowie Herrn Dr. Knut Brockow und Herrn Prof. Dr. Dr. Johannes Ring von der Technischen Universität München.

Zuletzt gilt mein Dank all den Damen, die mich im Labor tatkräftig unterstützt haben und ohne die diese Dissertation in diesem Umfang niemals möglich gewesen wäre: Svenja Schloß, Annelie Damerau, Mandy Elias, Annika Sötje und Bettina Jacobsen.

„Wollte man warten, bis man etwas so gut könnte, dass niemand etwas daran auszusetzen fände, brächte man nie etwas zuwege.“

Friedrich Nietzsche

Deutscher Philosoph, 1835 - 1910

Diese Arbeit widme ich von ganzem Herzen meinen
Eltern Monika und Jürgen Weber für Ihre beispiellose
Unterstützung in allen Abschnitten meiner Promotion.

Inhaltsverzeichnis

A. Abkürzungsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
2. Grundlagen	2
2.1. Allergien	2
2.1.1. Lebensmittelallergien.....	3
2.1.2. Antikörper	5
2.1.3. Allergene und Epitope	5
2.1.4. Pathophysiologie von Lebensmittelallergien	6
2.1.5. Resorption von Lebensmittelallergenen im Körper.....	8
2.2. Wein	10
2.2.1. Weinschönung.....	12
2.2.1.1. Einsatz tierischer Proteine in der Weinschönung	13
2.2.1.2. Weinstabilisierung	15
2.2.2. Einsatz von Lysozym.....	16
2.3. Lebensmittelallergien gegen tierische Produkte in der Weinherstellung	17
2.3.1. Hühnerei-Eiklar und Lysozym.....	17
2.3.2. Kasein aus Kuhmilch	18
2.3.3. Fischgelatine und Hausenblase	19
2.4. Kennzeichnung tierischer Proteine auf Weinen.....	20
3. Zielsetzung der Arbeit.....	22
4. Ergebnisse	24
4.1. Untersuchung des allergenen Potentials von Weinen, welche mit verschiedenen proteinogenen Schönungsmitteln geschönt wurden, mittels ELISA	24
4.1.1. Abstract	25
4.1.2. Hinweis zum Copyright.....	25
4.2. Lysozym in Wein: Eine Risikobewertung für Konsumenten mit Hühnerei-Allergie.....	26
4.2.1. Abstract	26
4.2.2. Hinweis zum Copyright.....	27
4.3. Charakterisierung, Antigenität und Detektion von Fischgelatinen und Hausenblasen, welche als Prozesshilfsstoffe in Weinen verwendet werden	28
4.3.1. Abstract	28
4.3.2. Hinweis zum Copyright.....	29
4.4. Bestimmung des Lebensmittelallergens Kasein vom Rind in Weißweinen mittels quantitativem, indirektem ELISA, SDS-PAGE, Western Blot und Immunfärbung	30
4.4.1. Abstract	30
4.4.2. Hinweis zum Copyright.....	31

4.5. Kompetitiver indirekter ELISA zur Bestimmung von Parvalbuminen verschiedener Fischspezies in Fischgelatinen und Hausenblasen zur menschlichen Ernährung mittels PARV-19 Anti-Parvalbumin Antikörpern.....	32
4.5.1. Abstract	32
4.5.2. Hinweis zum Copyright.....	33
5. Zusammenfassende Diskussion.....	34
5.1. Diskussion der Methoden zum Nachweis tierischer Schönungsmittel und Lysozym in Weinen	34
5.2. Diskussion zur chemischen Evaluierung des allergenen Potentials tierischer Proteine in Weinen	38
5.2.1. Diskussion zur chemischen Evaluierung des allergenen Potentials von Lysozym und Eiklar in Weinen.....	41
5.2.1.1. <i>Lysozym</i>	41
5.2.1.2. <i>Hühnerei-Eiklar</i>	42
5.2.2. Diskussion zur chemischen Evaluierung des allergenen Potentials von Kaseinat in Weinen.....	43
5.2.3. Diskussion zur chemischen Evaluierung des allergenen Potentials von Fischgelatine und Hausenblase in Weinen	45
5.3. Schlussfolgerung	48
6. Literatur.....	51
7. Zusammenfassung.....	59
8. Summary	61
9. Anhang	63
9.1. Liste verwendeter Chemikalien	63
9.2. Eidesstattliche Versicherung	64
9.3. Lebenslauf.....	65
9.4. Liste der Publikationen	67
9.5. Liste der Vorträge.....	68
9.6. Liste der Poster	68

A. Abkürzungsverzeichnis

ALA	α -Lactalbumin
APC	Antigen präsentierende Zelle
B	Signal of analyte
B ₀	Signal at zero dosage of analyte
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxy-ethyl)-amino-tris(hydroxymethyl)-methane
BLG	β -Lactoglobulin
BSA	Biologischer Säureabbau
BSE	Bovine spongiforme Enzephalitis / bovine spongiform encephalitis
CBB	Coomassie brilliant blue
CF	Correction factor
CMA	Kuhmilchallergie
CV	Coefficient of variation
DBPCFC	Doppelt-blind Placebo-kontrollierte Lebensmittel-Expositionsstudie / double-blind placebo-controlled food challenge
DLR	Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum
EAACI	European Academy of Allergology and Clinical Immunology
EC	Europäische Gemeinschaft / European Community
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EU	Europäische Union / European union
FG	Fish gelatine
GMP	Code of Good Manufacturing Practice
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie / high performance liquid chromatography
HPLC-FLD	Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Fluoreszenzdetektion / high performance liquid chromatography with fluorescence detection
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunoglobulin
IG	Isinglass
LOAEL	Lowest observed adverse effect level
LOD	Limit of detecton
LODC	Limit of decision
LOQ	Limit of quantitation
MALDI-TOF	Matrixunterstützte Laser Desorption - Ionisation mit Flugzeit- Massenspektrometer / matrix assisted laser desorption – ionisation with time of flight detector

MES	4-Morpholineethanesulfonic acid
MOPS	4-Morpholinepropanesulfonic acid
MS/MS	Tandem-Massenspektrometer / tandem mass spectrometer
MW	Molecular weight
NCBI	National center of biotechnology information
NOAEL	No observed adverse effect level
OD	Optical density
PBS	Phosphate-buffered saline
PP	Peyer'sche Plaques
PMF	Peptide mass fingerprint
RAST	Radio-allergosorbent test
s	Standard deviation
SBPCFC	Einfach-blind Placebo-kontrollierte Lebensmittel-Expositionsstudie / single-blind placebo-controlled food challenge
SDS	Natriumdodecylsulfat / sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gel-Elektrophorese / sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel-electrophoresis
SPT	Skin Prick Test
sw-ELISA	Sandwich ELISA
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tween 20	Polyethylen-sorbitan monolaurate
WAO	World Allergy Organization

1. Einleitung

Tierische Proteine werden seit hunderten von Jahren in der Produktion von Weinen eingesetzt. In einem Prozess, der als *Schönung* bezeichnet wird, dienen sie der Verhinderung von Trübungen, sowie der Ausformung und Verfeinerung des Weincharakters durch Adsorption unerwünschter Stoffe. Traditionell werden hierfür Schwimmblasen von Fischen, Kuhmilch- oder Hühnereiproteine verwendet. In neuerer Zeit haben jedoch auch Fischgelatinen, sowie das zur Kontrolle der Mikroflora geeignete Enzym *Lysozym*, welches aus Hühnerei-Eiklar gewonnen wird, in der Weinherstellung an Bedeutung gewonnen.

Obwohl für die Verwendung tierischer Proteine in der Weinproduktion keinerlei negative Auswirkungen auf die Gesundheit des Verbrauchers bekannt sind, sind diese in den letzten Jahren in den Fokus des Interesses gerückt. Ursächlich hierfür sind verschiedene rechtliche Regelungen, die zwischen 2000 – 2004 in der Europäischen Union (EU), Australien, Neuseeland, Japan und den USA erlassen wurden und als Zweck die Regelung der Kennzeichnung allergener Stoffe auf Lebensmitteln verfolgen. Da Proteine aus Fisch, Milch und Ei zu den bedeutendsten Lebensmittelallergenen gehören, wird nach diesen Regelungen auch die Kennzeichnung auf Weinen festgelegt. Hintergrund hierfür ist das mögliche Zurückbleiben kleiner Mengen dieser Schönungsmittel im Wein, welche in entsprechend allergischen Individuen zu allergischen Reaktionen führen können. Allerdings war diese Annahme aus wissenschaftlicher und technologischer Sicht anfechtbar. Die Schönungsmittel reagieren mit den zu entfernenden Substanzen zu unlöslichen Verbindungen, welche im Laufe der Weinproduktion präzipitieren und aus dem Wein durch geeignete Maßnahmen entfernt werden. Daher war es eine weit verbreitete Meinung unter den Weinproduzenten, dass keine Rückstände an Schönungsmitteln im Endprodukt Wein verbleiben. Zudem wirken weitere Behandlungsmethoden wie die Schönung mit Bentoniten, die der Vermeidung proteinogener Trübungen in Weinen dient, dem Proteingehalt in Weinen entgegen. Der Sinn der Weinkennzeichnung wurde somit seitens der Weinproduzenten angezweifelt und eine unnötige Verunsicherung und Irritation des Verbrauchers durch die Kennzeichnung derartiger Stoffe auf Weinen befürchtet. Aus Verbraucher orientierter Sicht würde eine unter Umständen überflüssige Kennzeichnung zudem mit einer unnötigen Einschränkung der Gewohnheiten und Lebensqualität von Lebensmittelallergikern einhergehen.

Da keine wissenschaftlichen Erkenntnisse über den Verbleib allergener, tierischer Proteine in Weinen vorlagen, wurden in der EU verschiedene chemische und medizinische Institute beauftragt, wissenschaftliche Erkenntnisse über Rückstände tierischer Proteine in Weinen und deren allergenem Potential zu erwirken. Auf Basis dieser Ergebnisse sollte eine Evaluierung der Weinkennzeichnung durch autorisierte Gremien, welche in der EU durch die European Food Safety Authority (EFSA) repräsentiert werden, erfolgen.

2. Grundlagen

2.1. Allergien

Unter einer Allergie wird nach der Definition der World Allergy Organization (WAO) eine durch spezifische immunologische Mechanismen verursachte Überempfindlichkeitsreaktion verstanden [Johansson et al., 2004]. Sie beschränkt sich auf pathophysiologische Mechanismen, in welchen spezifische Antikörper und/oder spezifisch sensibilisierte Lymphozyten des Immunsystems involviert sind [Aulepp und Vieths, 1992].

Allergien entstehen zunächst durch einen Kontakt des Organismus mit einem bestimmten Fremdstoff, dem sogenannten Allergen (auch *Immunogen* oder *Antigen* genannt). Diesem Kontakt schließt sich die Sensibilisierungsphase an, in welcher der Organismus spezifische Antikörper oder spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten gegen dieses Allergen bildet. Das klinische Bild einer Allergie zeigt sich erst nach wiederholtem Kontakt des Organismus mit dem Allergen, wobei dieses mit den gebildeten Antikörpern oder T-Lymphozyten im Sinne einer immunologischen Reaktion interagiert [Aulepp und Vieths, 1992]. Der Körper besitzt demnach die Fähigkeit, sich an den früheren Kontakt mit dem Fremdstoff zu „erinnern“. Dem gesunden Organismus soll diese Fähigkeit ermöglichen, bei erneutem Kontakt mit schädlichen Fremdstoffen schnell mit entsprechenden immunologischen Abwehrmechanismen reagieren zu können. Im Falle der Allergie handelt es sich bei dem Fremdstoff jedoch um einen ansonsten harmlosen Stoff, infolgedessen inadäquate immunologische Reaktionen ausgelöst werden, die zu typischen allergischen Symptomen wie Pruritus (Juckreiz), Erythema (Rötung der Haut), atopischen Ekzemen, Urticaria (Nesselsucht), Angioedema (Schwellungen der Haut und Schleimhäute), Koliken, allergischer Rhinitis (Fließ- oder Heuschnupfen), Magen-Darm-Beschwerden, allergischem Asthma oder anaphylaktischen Schockzuständen führen können [Jackson, 2003; Kownatzki, 1985]. Davon stellt neben dem allergischen Asthma der anaphylaktische Schock einen akut lebensbedrohlichen Zustand dar, bei welchem es aufgrund der Anschwellung der oberen Atemwege und der Mundregion, sowie eines massiven Blutdruckabfalles zur Mangelversorgung lebenswichtiger Organe mit Sauerstoff kommen kann [Jackson, 2003]. Allergien sind daher unangenehme und teilweise sogar lebensbedrohliche Erkrankungen, die eine gesundheitliche Beeinträchtigung und eine erhebliche Minderung der Lebensqualität, unter Umständen gar eine lebenslang beizubehaltende Änderung der Lebensgewohnheiten, nach sich ziehen können.

2.1.1. Lebensmittelallergien

Der Begriff „Lebensmittelallergie“ bezeichnet Allergien, welche bereits innerhalb von Minuten, seltener innerhalb von Stunden oder Tagen infolge einer Nahrungsaufnahme auftreten können. Typische klinische Krankheitsbilder umfassen gastrointestinale Symptome wie Koliken, Durchfall und Erbrechen, sowie allgemeine allergische Symptome. Im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme wurde in vielen Fällen auch von anaphylaktischen Schockzuständen mit Todesfolge berichtet [Yunginger et al., 1988].

In der allgemeinen Bevölkerung leiden derzeit schätzungsweise bis zu 4 % der Erwachsenen und bis zu 8 % der Kinder an einer Lebensmittelallergie [FDA, 2006; Zuberbier et al., 2004; EFSA, 2004; Helm und Burks, 2000; Anderson, 1991; Jansen et al., 1994]. Diese Prävalenz kann jedoch zwischen verschiedenen Bevölkerungsschichten, basierend auf deren Ernährungsgewohnheiten, Klima und Umwelt, stark schwanken. Obwohl die Zahl berichteter Allergien gegenüber Lebensmitteln in den letzten Jahren zugenommen hat, ist bis heute unklar, ob die Zahl von Lebensmittelallergien tatsächlich zunimmt oder ob dies lediglich auf die höhere Aufmerksamkeit bzw. bessere Diagnostik zurückzuführen ist [BFR, 2006]. Als Ursache für eine mögliche Zunahme an Lebensmittelallergien wird die starke Änderung der Ernährungsgewohnheiten sowie der Umwelt, die in den letzten Jahrzehnten stattgefunden hat, diskutiert [Hayakawa et al., 1999].

Ein Großteil der Lebensmittelallergien wird nur durch eine begrenzte Anzahl an Lebensmitteln ausgelöst. Über 90 % der Lebensmittelallergien weltweit werden von Kuhmilch, Hühnerei, Erdnüssen, Soja, Nüssen, Fisch, Schalentieren und Weizen verursacht [Ring et al., 2001]. Während bei Kindern Lebensmittelallergien vorwiegend durch den Verzehr von Hühnerei, Kuhmilch, Fisch, Erdnüssen und Nüssen ausgelöst werden, sind bei Erwachsenen Allergien gegen Früchte, Gemüse, Erdnüsse und Nüsse, sowie Fisch und Schalentiere dominant [EFSA, 2004; Crespo und Rodriguez, 2003]. Hühnerei und Kuhmilchallergien sind im Erwachsenenalter selten, da in bis zu 87 % der Fälle bereits im Kindesalter Toleranzen entwickelt werden [Host und Halken, 1990; Jackson et al., 2003; Savage et al., 2007].

Nach der Definition der European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI) gehören Lebensmittelallergien, genauso wie die Allergien im Allgemeinen, zu den Überempfindlichkeitsreaktionen. Überempfindlichkeitsreaktionen beschreiben objektive, reproduzierbare Symptome, welche durch eine bestimmte Menge eines Stimulus verursacht werden, welcher von „gesunden“ Personen vertragen wird [Johannson et al., 2001]. Demnach müssen toxische, mikrobielle oder pharmakologische Ursachen von den Überempfindlichkeitsreaktionen abgegrenzt werden. Ebenso gehören psychosomatische Faktoren nicht zu den Überempfindlichkeitsreaktionen. All diese negativen Reaktionen auf

Lebensmittel werden unter dem Begriff der Unverträglichkeitsreaktionen zusammengefasst (siehe Abbildung 2.1.).

Überempfindlichkeitsreaktionen werden in allergische und nicht-allergische Reaktionen unterteilt. Die nicht-allergischen Reaktionen basieren auf nicht-immunologischen Prozessen und umfassen beispielsweise metabolische Defekte (Lactase-Mangel, Gluten-unverträglichkeit) oder Pseudoallergien. Pseudoallergien werden wie die Allergien durch Freisetzung bestimmter Botenstoffe (sogenannter *Mediatoren*; siehe Kapitel 2.1.4) initiiert und gleichen im klinischen Bild demnach den immunvermittelten Reaktionen, jedoch erfolgt die Mediatorfreisetzung aufgrund pharmakologischer und nicht-immunologischer Mechanismen. Demzufolge sind keine spezifischen Antikörper gegen auslösende Substanzen nachweisbar. Bekannte Pseudoallergene sind in Lebensmitteln natürlicherweise vorkommende oder zugesetzte, niedermolekulare Stoffe wie verschiedene Konservierungsstoffe, Antioxidanten oder Farbstoffe [Kreft et al., 1995].

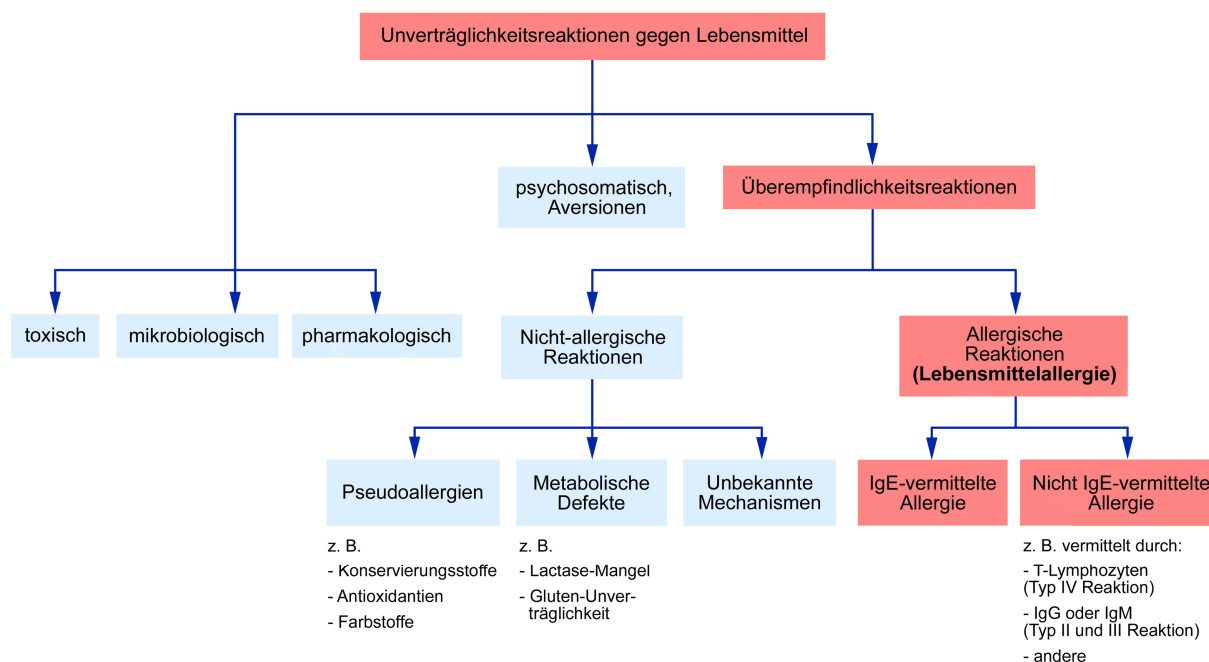


Abbildung 2.1. Übersicht über die Unverträglichkeitsreaktionen gegen Lebensmittel

Allergische Reaktionen, in diesem Falle Lebensmittelallergien, werden durch spezifische Antikörper und/oder spezifisch sensibilisierte Lymphozyten vermittelt. Von besonderer Bedeutung hierbei sind Antikörper des Isotyps IgE, welche nachfolgend besprochen werden. Aus diesem Grund findet eine weitere Unterteilung der Lebensmittelallergien in IgE-vermittelte und nicht IgE-vermittelte Reaktionen statt.

2.1.2. Antikörper

Antikörper (auch als *Immunglobuline*, *Ig*, bezeichnet) sind Glykoproteine, die im Organismus von Plasmazellen gebildet werden, welche aus der Population der B-Lymphozyten stammen. Ihre biologische Funktion besteht im gesunden Organismus darin, schädlichen Antigenen (z. B. Bakterien, Viren) sowie dem Befall durch Mikroorganismen oder Parasiten entgegen zu wirken, indem diese hochspezifisch das Antigen erkennen und daran binden, um es für körpereigene, zytotoxische Zellen zu markieren [Aulepp und Vieths, 1992].

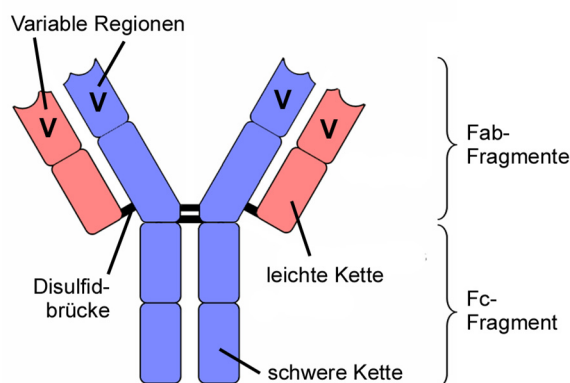


Abbildung 2.2. Schematische Darstellung eines monomeren Antikörpers

Antikörper bestehen in ihrer monomeren Grundstruktur aus einem Tetramer von zwei identischen leichten (ca. 25 kDa) und zwei identischen schweren (ca. 50 – 70 kDa) Peptidketten, die jeweils durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und in ihrer Form ein „Y“ bilden (Abbildung 2.2.). Weiterhin ist eine Unterteilung in zwei identische sogenannte Fab-Fragmente und das Fc-Fragment möglich. Die Fab-Fragmente besitzen an ihren aminoterminalen Enden variable Regionen, in

welchen die Aminosäuresequenzen verschiedener Antikörper stark variieren. Durch diese Regionen wird die Bindung an das Allergen bestimmt. Das Fc-Fragment hingegen bewirkt die Fähigkeit des Antikörpers, an Oberflächen von Mediatorsystemen (z. B. Makrophagen, neutrophile oder basophile Granulozyten, Mastzellen) zu binden [Kownatzki 1985; Kreft et al., 1995].

Antikörper werden in fünf Isotypen unterteilt, welche sich in ihrer Größe, Ladung, Aminosäuresequenz und ihrem Kohlenhydrat-Anteil in den schweren Peptidketten unterscheiden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Von ihnen ist das IgE, welches ein Molekulargewicht von ca. 190 kDa besitzt, für die Lebensmittelallergie von besonderer Bedeutung [Kreft et al., 1995].

2.1.3. Allergene und Epitope

Allergene sind körperfremde Stoffe, die hauptsächlich zur Gruppe der Proteine und Glykoproteine gehören und in der Regel Molmassen von mehr als 4000 Dalton besitzen. Jedoch können auch kleinere Verbindungen (sogenannte *Haptene*) durch Konjugation mit

Proteinen allergen wirken. Allergene besitzen nur begrenzt chemische Gemeinsamkeiten. Den verschiedenen Definitionen wie etwa, dass Allergene gegen Prozesse wie Erhitzung und Verdauung resistent sind und Molekulargewichte bis 70 kDa besitzen, stehen diverse Ausnahmen gegenüber [Lehrer et al., 1996; Kreft et al., 1995]. Somit ist nach wie vor unklar, warum bestimmte Proteine als Allergene fungieren.

Die Stelle des Allergens, welche die Bindung mit einem spezifischen Antikörper eingeht, wird als Epitop bezeichnet. Die Bindung beruht auf starken, nicht kovalenten Wechselwirkungen und ist hochspezifisch („Schlüssel-Schloss-Prinzip“). Epitope können sowohl durch die Primärstruktur des Proteins (Sequenzepitope), als auch durch die räumliche Struktur des Proteins (Konformationsepitope) bestimmt werden und können bereits durch wenige Aminosäuren kodiert sein. So wurde ein Epitop eines Fischallergenes aus Dorsch identifiziert, welches lediglich aus zwei Tetrapeptiden besteht [Elsayed und Apold, 1983].

2.1.4. Pathophysiologie von Lebensmittelallergien

Die verschiedenen Reaktionsmechanismen der Allergie wurden von *Coombs und Gell (1963)* vereinfacht in vier Typen unterteilt, wovon Typ I, ferner auch Typ IV, den Lebensmittelallergien im eigentlichen klinischen Sinne entspricht [Aulepp und Vieths, 1992]. Diese werden in diesem Kapitel schematisch und stark vereinfacht dargestellt.

Die Reaktion des Typ I, auch Sofortreaktion genannt, beschreibt die Beteiligung von Antikörpern des Typs IgE, welche an der Oberfläche von Gewebsmastzellen oder basophilen Granulozyten gebunden sind und ein bestimmtes Allergen erkennen können. Sie repräsentiert den Großteil der Lebensmittelallergien und wird üblicherweise in zwei Phasen unterteilt: Der Sensibilisierungsphase und der eigentlichen allergischen Reaktion [Aulepp und Vieths, 1992; Ring et al., 2001].

In der Sensibilisierungsphase, welche in Abbildung 2.3. dargestellt ist, interagiert das Allergen zunächst mit B-Lymphozyten des lymphatischen Systems, welche sich daraufhin zu identischen Klonen vermehren und teilweise in Antikörper produzierende Plasmazellen differenzieren. Die Vermehrung und Differenzierung wird durch Botenstoffe (*Lymphokine*), welche durch aktivierte T-Lymphozyten ausgeschüttet werden, stimuliert. Die Aktivierung der T-Lymphozyten wiederum erfolgt ebenfalls durch das Allergen mittels spezieller T-Lymphozyt-Rezeptoren. Allerdings erfolgt die Aktivierung nur für den Fall, dass das Allergen durch körpereigene Zellen der unspezifischen Immunabwehr (sogenannte *Antigen präsentierende Zellen, APC*; z. B. Makrophagen), welche das Allergen zuvor enzymatisch prozessiert haben, präsentiert wird. Die von den Plasmazellen produzierten IgE binden über ihr Fc-Fragment an die Oberfläche von Mastzellen, die im Bindegewebe angesiedelt sind,

oder basophilen Granulozyten, welche im Blutplasma zirkulieren. Der Organismus ist somit gegen das Allergen sensibilisiert [Kreft et al., 1995; Lichtenstein, 1993].

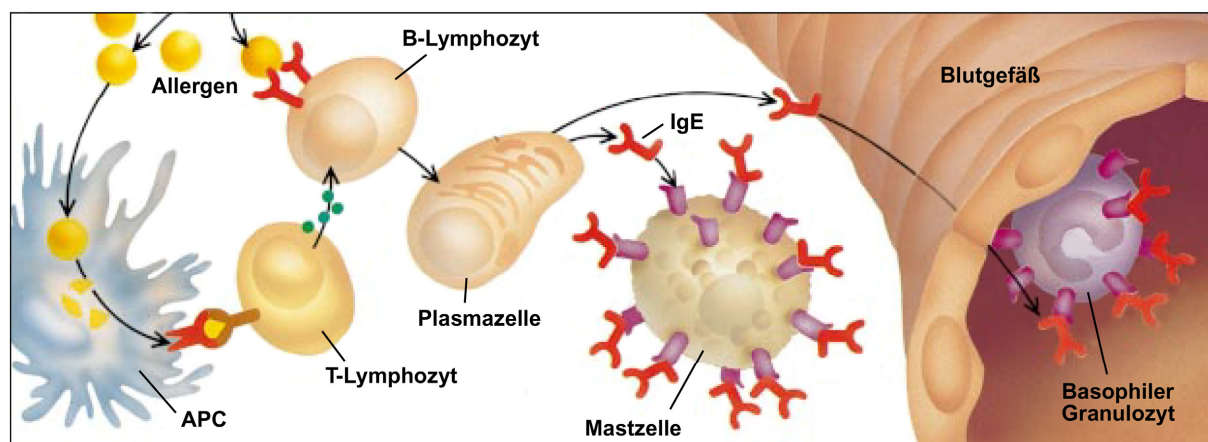


Abbildung 2.3. Sensibilisierungsphase der allergischen Typ I Reaktion [Lichtenstein, 1993; modifiziert]

Die Fähigkeit der B-Lymphozyten, gegen ein bestimmtes Allergen spezifische Antikörper zu produzieren, bleibt für Jahre oder sogar das gesamte Leben bestehen [Kreft et al., 1995; Aulepp und Vieths, 1992]. Warum jedoch ein Allergen mit B-Lymphozyten interagiert, ist im Detail nicht geklärt. Eine weitestgehend anerkannte Theorie besagt, dass anfänglich jeder der zirkulierenden B-Lymphozyten einen für sich spezifischen Antikörper an seiner Oberfläche exprimiert, ohne dass dieser B-Lymphozyt jemals mit einem Antigen oder Allergen in Kontakt getreten ist. Passt ein Antigen nun „zufällig“ auf diesen exprimierten Antikörper, so werden die zuvor beschriebenen Proliferations- und Reifungsvorgänge initiiert. Dieser Prozess wird als „klonale Selektion“ bezeichnet. Folglich spielen familiäre bzw. genetische Faktoren eine überaus wichtige Rolle in der Entwicklung von Immunitäten, aber auch von Lebensmittelallergien [Kreft et al., 1995; Jackson, 2003].

Die eigentliche allergische Reaktion wird durch den erneuten Kontakt mit dem Allergen ausgelöst (Abbildung 2.4.). Hierbei reagieren zwei Oberflächen-gebundene IgE mit einem Allergen, welches folglich über mindestens zwei Epitope verfügen muss. Dieser als „bridging“ bezeichnete Vorgang führt zur Aktivierung der Zelle und zur Sezernierung präformierter Mediatoren (lat. *mediator* = Vermittler), welche das klinische Bild der allergischen Reaktion prägen. Der Begriff Mediator beschreibt dabei eine Vielzahl an zusammenwirkenden Substanzen wie Histamin, Serotonin, Prostaglandine oder Leukotriene, welche im Körper neben der Aktivierung von anderen Immunzellen zur Gefäßerweiterung, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Kontraktion glatter Muskulatur, Stimulation von Schleimhautdrüsen und der Erzeugung von Juckreiz führen [Kownatzki, 1985; Jackson, 2003]. Aktivierte Immunzellen wie die eosinophilen oder basophilen Granulozyten werden aus der Blutbahn in das umliegende Gewebe „gelockt“ und sezernieren dort neben weiteren Mediatoren toxische

Proteine, welche die allergische Reaktion verstärken und zur Schädigung des Gewebes führen können [Kreft et al., 1995; Aulepp und Vieths, 1992].

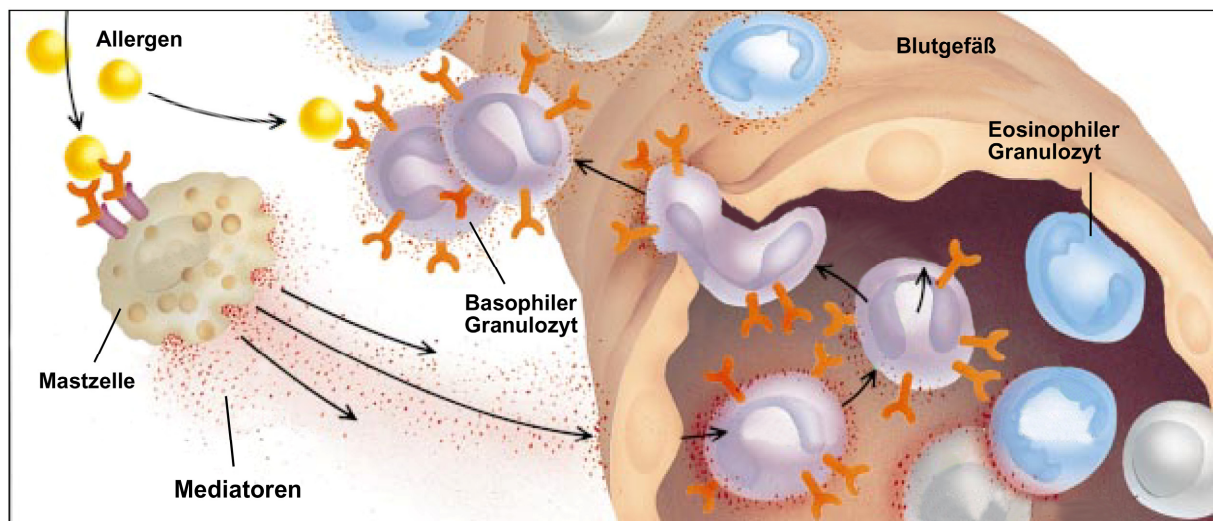


Abbildung 2.4. Pathophysiologie der allergischen Typ I Reaktion [Lichtenstein, 1993; modifiziert]

Die Typ IV Reaktion, auch Spätreaktion genannt, wird, im Gegensatz zur Typ I Reaktion, ausschließlich über spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten vermittelt. Sie läuft daher unabhängig von Antikörpern ab. Schematisch gesehen verfügen die T-Lymphozyten dabei nach der Sensibilisierungsphase über spezifische T-Lymphozyt-Rezeptoren, welche bei erneutem Kontakt mit dem Allergen die Produktion von Mediatoren wie Leukotrienen oder Prostaglandinen aktivieren. Diese Mediatoren führen zur Aktivierung von Entzündungszellen wie den Makrophagen oder eosinophilen Granulozyten, welche in das betroffene Gewebe wandern und dort ihrerseits Mediatoren freisetzen. Das klinische Bild der Spätreaktion manifestiert sich aufgrund der langsamen Produktion von Mediatoren in den T-Lymphozyten erst nach mehreren Stunden bis Tagen, wobei Spätreaktionen sowohl isoliert, jedoch auch zusammen mit Sofortreaktionen auftreten können und diese verstärken [Aulepp und Vieths, 1992; Ring et al., 2001; Jackson, 2003; Kreft et al., 1995]. Im Detail werden die Typ IV Reaktionen noch in weitere Untergruppen unterteilt, die an dieser Stelle jedoch nicht weiter erwähnt werden sollen.

2.1.5. Resorption von Lebensmittelallergenen im Körper

Damit Lebensmittelallergene im Organismus mit dem Immunsystem interagieren können, müssen diese in immunologisch intakter Form unterschiedliche physikalische Barrieren, insbesondere die Schleimhäute (Mukosa) der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes, durchdringen. Die Art und Weise des Eintritts allergener Stoffe unterliegt dabei komplizierten Mechanismen, die bis heute nicht vollständig verstanden sind oder deren Relevanz unklar

ist. Bereits bekannt ist, dass trotz Proteolyse durch die Magensäure oder durch Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin, ein geringer Anteil der Proteine nicht oder nur teilweise im Gastrointestinaltrakt hydrolysiert wird [Untersmayr und Jensen-Jarolim, 2006]. Hierdurch gelangen Allergene in ihrer immunologisch intakten Form in Kontakt mit der Mukosa. Dabei spielt die Darmmukosa, welche mit ihrer Oberfläche von bis zu 300 m² das größte Immunorgan des Körpers darstellt, eine entscheidende Rolle [Kreft et al., 1995]. Die drei bekanntesten Eintrittsmechanismen, die im Darm ablaufen, werden in diesem Kapitel dargestellt.

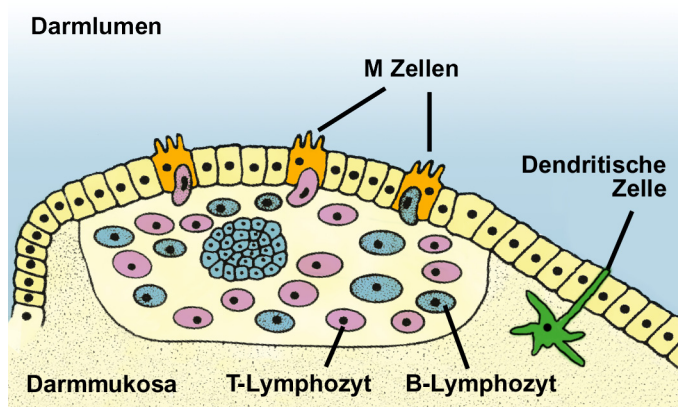


Abbildung 2.5. Schematische Darstellung eines Peyer'schen Plaques und einer Dendritischen Zelle [Jackson, 2003; modifiziert]

Peyer'sche Plaques: Aufgrund ihrer Größe und Eigenladung können Proteine nicht direkt durch das Epithelgewebe der gastrointestinalen Mukosa in den Körper diffundieren. Eine wichtige Rolle bei dem Eintritt von Proteinen in die Mukosa scheinen die Peyer'schen Plaques (engl. Peyer's patch; PP) zu spielen (Abbildung 2.5.). Bei diesen Plaques handelt es sich um Anhäufungen von B- und T-Lymphozyten innerhalb der Darmmukosa, die teilweise zu Follikeln zusammengelagert sind [Jackson, 2003; Shao et al., 2001]. Über die Oberfläche der PP verteilt befinden sich spezielle Epithelzellen („microfold cells“; M Zellen), die auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl von Glykoproteinrezeptoren besitzen. Durch diese Rezeptoren können Glykoproteine aus dem Darm lumen in die M Zellen aufgenommen und den Lymphozyten der PP präsentiert werden, weshalb die M Zellen zu den APC gehören [Shao et al., 2001; Kreft et al., 1995]. Dieser Kontakt zwischen Allergenen und Lymphozyten kann zur immunologischen Toleranz, physiologischen Immunreaktion oder, im Falle der Lebensmittelallergie, zur pathologischen Immunreaktion führen. Die PP sind folglich Bestandteil des mukosalen Immunsystems. Da die Lymphozyten kein statisches System darstellen, können sich diese nach Aktivierung über das lokale Gewebe oder andere Körperteile verteilen und dort zu Symptomen führen [Burks et al., 2008; Jackson, 2003].

Dendritische Zellen: Einem ähnlichen Mechanismus unterliegt der Transport von Antigenen mittels der Dendritischen Zellen. Diese Zellen der Immunabwehr gehören ebenfalls zur Gruppe der APC, welche unter anderem im Epithel der Darmmukosa vorkommen. Dendritische Zellen können mit Hilfe ihrer Dendriten das Epithel durchdringen und so

Antigene aus dem Darmlumen durch Phagozytose aufnehmen (Abbildung 2.5.). Die Antigene werden, ebenso wie bei den M Zellen, prozessiert und den Lymphozyten an der basalen Zelloberfläche präsentiert [Burks et al., 2008].

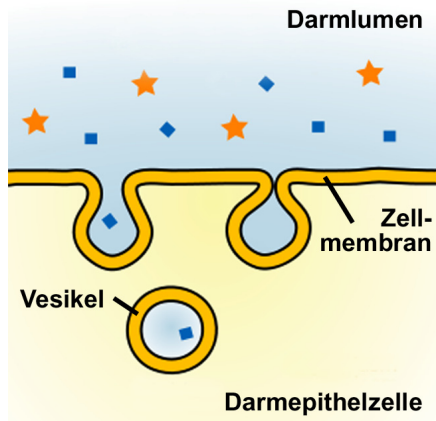


Abbildung 2.6. Schematische Darstellung der Pinozytose

Epithelzellen: Einen dritten Eintrittsweg der Allergene in den Organismus stellt die Pinozytose der Darmepithelzellen dar (Abbildung 2.6.). Bei diesem Prozess umschließt die Zellmembran der Zellen einen flüssigen Teil des Darmlumens unter Bildung von Vesikeln (sog. *Endosomen*), welche anschließend durch die Zelle diffundieren und deren Inhalt enzymatisch modifiziert werden kann. Auf diesem Wege werden wasserlösliche Antigene in die Epithelzellen aufgenommen und können an deren basalen Oberflächen den Zellen der Immunabwehr präsentiert werden. In diesem Zusammenhang werden

auch Antigen-Rezeptoren bzw. Rezeptoren für Antikörper-Antigen-Komplexe an der apikalen Seite der Epithelzellen diskutiert [Burks et al., 2008; Shao et al., 2001].

Ferner werden zu diesen drei bekannten Eintrittswegen entzündliche Beeinträchtigungen der physikalischen Darmbarriere wie etwa der Befall mit den infektiösen Mikroorganismen *Staphylococcus aureus* oder *Salmonella spp.* oder Autoimmunerkrankungen wie die Crohn-Krankheit als Ursachen für Lebensmittelallergien diskutiert [Shao et al., 2001; Untersmayr und Jensen-Jarolim, 2006]. Die Mukosa der Atemwege und des Magens stellt aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur Darmmukosa ebenfalls eine potente Eintrittsmöglichkeit für Allergene da, was das schnelle Auftreten von allergischen Reaktionen nach dem Verzehr allergener Nahrungsmittel erklären könnte [Dirks et al., 2005; Enrique et al., 2005; Walker, 2004].

2.2. Wein

Wein ist das durch alkoholische Gärung aus dem Saft frischer Weintrauben gewonnene Getränk. Die Weintraube gehört botanisch gesehen zur Familie der Rebengewächse (*Vitaceae*), wobei in Europa fast ausschließlich die Art *Vitis vinifera* L. zur Weinproduktion herangezogen wird. Von ihr sind mehr als 8000 Sorten bekannt [Baltes, 2000; Hoffmann, 1970]. Mit einer weltweiten Jahresproduktion von mehr als 28 Mrd. Litern zählt Wein zu den bedeutendsten alkoholischen Getränken, wobei Frankreich und Italien Spitzenreiter in der Weinproduktion sind [OIV, 2005].

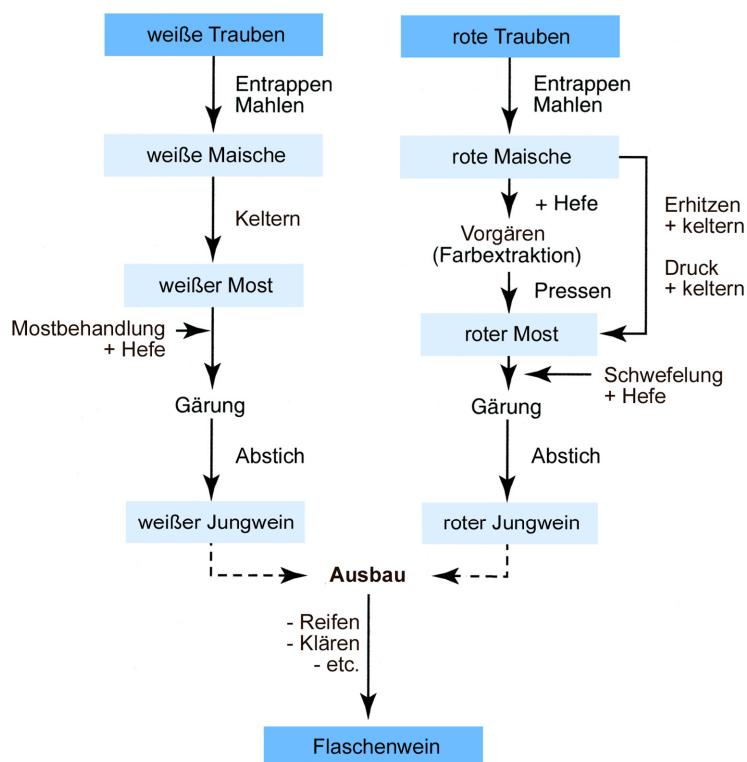


Abbildung 2.7. Schema der Weiß- und Rotweinerstellung [Krämer, 2002; modifiziert]

Zur Gewinnung des Weines werden die Weintrauben zum Zeitpunkt der Vollreife geerntet („Weinlese“), von den Stielen befreit („Entrappung“) und schonend unter Erhalt der Traubenkerne zerquetscht oder zermahlen (siehe Abbildung 2.7.). Durch Abpressen („Kelttern“) der festen Bestandteile wie Häute, Kerne oder Stiele der Weintrauben, wird aus der Maische der Most und der Pressrückstand, welcher als Trester bezeichnet wird, gewonnen. Der Most stellt das Ausgangsprodukt für die alkoholische Gärung dar und

enthält neben Wasser als Hauptbestandteil 10 – 25 % an den vergärbaren Zuckern Glucose und Fructose. Most oder Maische werden für gewöhnlich durch Schwefelung (Zugabe von Sulfit-Salzen oder schwefliger Säure) gegen Oxidation und Verderb durch Mikroorganismen geschützt [Baltes, 2000; Franzke, 1996].

Vor der Gärung werden letzte Schmutz- und Fremdstoffe durch Separatoren, spezielle Filter oder durch Schönung aus dem Most entfernt (der Begriff „Schönung“ wird im nachfolgenden Kapitel 2.2.1. behandelt). Anschließend erfolgt der Zusatz von Hefen der Gattung *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, etc.), welche den Zucker des Mostes primär zu Ethanol und Kohlensäure vergären. Ab einem Ethanolgehalt von 12 – 15 Volumen-% kommt die Gärung zum Stillstand und die sich dadurch absetzende Hefe wird zusammen mit anderen sedimentierten Stoffen aus dem Wein entfernt („Abstich“) [Belitz et al., 2001].

Die Gewinnung von Rotweinen unterscheidet sich von der der Weißweine, da hier der Übergang der roten Farbstoffe, die der Stoffklasse der Anthocyane angehören, aus der Traubenhaut in den Most gewährleistet sein muss und der Wein so seine charakteristische rote Farbe erhält. Üblicherweise wird dies durch Erhitzung der Maische auf ca. 50 – 80 °C oder durch drucktechnische Verfahren, wodurch die Zellwände der Traubenhaut zerstört werden, erreicht. Traditionell kann die Maische auch einer Vorgärung unterzogen werden,

wobei durch den gebildeten Alkohol die Anthocyane aus der Traubenhaut herausgelöst werden (siehe Abbildung 2.7.) [Krämer, 2002; Hoffmann, 1970].

Der so, gegebenenfalls durch wiederholte Gärung und Abstich gewonnene Jungwein wird in der Regel geschwefelt und anschließend durch Reifung in Fässern, Tanks oder Flaschen und durch verschiedene andere Prozesse in seinem Charakter ausgeformt, gehoben und verfeinert. Diese Prozesse werden als „Ausbau“ des Weines bezeichnet. Bestandteil des Ausbaues ist auch die Klärung, in welcher durch Filtrations-, Separations- und Schönungsvorgänge ein klarer, stabiler Wein erhalten wird. Weiterhin findet im Jungwein ein als biologischer Säureabbau (BSA) bekannter Prozess statt, in welchem durch verschiedene Milchsäurebakterien (u. a. *Oenococcus oeni*, *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus spp.*, *Micrococcus spp.*) Äpfelsäure in erster Linie zur milderen Milchsäure und Kohlendioxid abgebaut wird. Je nach Charakter des Weines ist der BSA wünschenswert oder muss durch Schwefelung oder Zusatz von Lysozym (siehe Kapitel 2.2.2) unterbunden werden [Krämer, 2002; Hoffmann, 1970; Vogt et al., 1974]. Die ausgebauten Weine werden abschließend filtriert und so verzehrfähig abgefüllt.

Der fertige Wein weist neben einem Alkoholgehalt zwischen 5 – 18 Vol. % nur noch geringe Gehalte an vergärbaren Zuckern auf (Tabelle 2.1.). Neben organischen Säuren und Gerbstoffen sind u. a. Gärnebenprodukte wie Glycerin, höhere Alkohole, Ester und Aldehyde nachweisbar und tragen als wertbestimmende Bestandteile zum Bukett des Weines bei [Gollmick et al., 1970].

Tabelle 2.1. Zusammensetzung von Weinen [Gollmick et al., 1970; Franzke, 1996; Belitz et al., 2001].

	Weißweine	Rotweine
Alkoholgehalt	5 – 18 Vol. %	
Gesamtsäure	4 – 9 g/L	4 – 6 g/L
Vergärbare Zucker	0 – 150 g/L	
Gerbstoffe	≤ 0,5 g/L	1 – 2,5 g/L
pH	2,8 – 3,8	

2.2.1. Weinschönung

Die Weinschönung dient der Klärung, Stabilisierung und Verbesserung des Weines durch Entzug unerwünschter Stoffe wie Proteine, Metallionen, Gerüche, Gerb- und Farbstoffe oder überschüssiger Säuren und ist seit vielen Jahrhunderten fester Bestandteil der Weinproduktion. Diese Stoffe können zu kolloidalen Trübungen, Verfärbungen oder Geschmacksbeeinträchtigungen des Weines führen. Durch Zusatz oberflächenaktiver Stoffe werden diese in der Weinschönung adsorbiert und/oder durch Bildung von flockigen Niederschlägen eingeschlossen und anschließend sedimentiert. Das Sediment wird zuletzt von dem geschönten Wein abgestochen. Als Materialien zur Weinschönung werden anorganische Substanzen wie Bentonit (siehe Kapitel 2.2.1.2), Kaliumhexacyanoferrat oder

Kieselol und organische Materialien wie Aktivkohle, Tannin und verschiedene tierische Proteine (siehe Kapitel 2.2.1.1.) verwendet [Vogt et al., 1974; Belitz et al., 2001].

Kolloidale Trübungen bestehen primär aus Gerbstoffverbindungen, Proteinen, Pektinen, Pflanzenschleimen und gewissen Metallsalzen. Metallionen wie Eisen, Kupfer und Zinn werden in der sogenannten *Blauschönung* durch Zusatz von Kaliumhexacyanoferrat aus dem Wein ausgefällt, wobei ebenfalls ein Teil der Proteine entfernt wird. Die Blauschönung bewirkt somit auch eine gewisse Stabilität gegen Proteintrübungen. Vollständig hingegen werden Proteintrübungen durch den Einsatz von Bentoniten verhindert (siehe Kapitel 2.2.1.2.). Darüber hinaus werden kolloidale Trübungen, sowie Gerbstoffe, durch den Einsatz von tierischen Proteinen in ihrem Gehalt reduziert (siehe Kapitel 2.2.1.1.). Fehlerhafte Geruchs-, Geschmacks- und Farbstoffe hingegen werden in der Weinschönung durch Aktivkohle adsorbiert. Ihre Klärwirkung, also die Adsorption von Trubteilchen, ist wegen ihrer Ladungsneutralität jedoch nur gering [Gollmick et al., 1970; Vogt et al., 1974].

2.2.1.1. Einsatz tierischer Proteine in der Weinschönung

Wie zuvor erwähnt, werden in der Weinschönung tierische Proteine zur Entfernung kolloidaler Trübungen und zur Verringerung des Gerbstoffgehaltes eingesetzt. Traditionell werden hierfür noch heute Produkte mit einem hohen Proteingehalt wie Hühnerei-Eiklar, Kaseine aus Kuhmilch, Hausenblasen und Gelatinen verwendet.

Hühnerei-Eiklar wird aus dem Ei des Haushuhnes, welches der Art *Gallus gallus* angehört, gewonnen. Das in der Oenologie häufig missverständlich als „Albumin“ bezeichnete Produkt wird in der Weinschönung entweder direkt als flüssiges Eiklar oder als pasteurisiertes oder sprühgetrocknetes Eiklarpulver verwendet. Das weiße, pulverförmige Produkt besteht zu 68 – 86 % aus Protein, 3 – 15 % Wasser und 5 – 12 % aus Kohlenhydraten (Abbildung 2.8.).

Kasein wird durch Säurefällung aus der Kuhmilch von Rindern der Gattung *Bos* gewonnen,

wobei in westlichen Ländern die Art *Bos primigenius taurus* (Hausrind) bei weitem dominiert. Aufgrund seiner schlechten Löslichkeit im Wein wird das gefällte Kasein in der Regel mit Kalilauge neutralisiert, separiert und durch Sprühtrocknung getrocknet. Das daraus resultierende Kaliumkaseinat (Abbildung 2.8.) besitzt bessere Lösungseigenschaften im Wein.



Abbildung 2.8. Tierische Schönungsmittel und Lysozym

Kaliumkaseinat besteht zu ca. 85 % aus Protein, ca. 8 % aus Wasser und ca. 5 % aus Mineralstoffen.

Hinter dem Begriff „Hausenblase“ verbirgt sich ursprünglich die Schwimmblase des Hausens (*Huso huso*), einer Störart. Aufgrund der Knappheit dieser Fischbestände werden jedoch unter dem Begriff Hausenblase in der Weinschönung heutzutage die Schwimmblasen vieler verschiedener Knochenfische (*Osteichthyes*) verstanden, die zum Beispiel den Gattungen *Acipenser* (z. B. Stör), *Gadus* (z. B. Kabeljau), *Pollachius* (z. B. Seelachs) oder *Merluccius* (z. B. Seehecht) angehören. Zur Gewinnung wird die ausgenommene Schwimmblase gewaschen, von anhaftendem Muskelgewebe befreit und anschließend getrocknet, sodass sie zu etwa 75 – 85 % aus Kollagen (Typ I) und 10 – 25 % aus Wasser besteht (siehe Abbildung 2.8.).

Der Hausenblase chemisch ähnlich ist die Gelatine. Sie besteht im getrockneten Zustand zu 82 – 87 % aus Kollagen und 13 – 17 % aus Wasser (siehe Abbildung 2.8.) und wird aus Knochen, Knorpeln und Häuten von Schweinen, Rindern oder verschiedenen Speisefischen (wie Kabeljau, Seelachs, Schellfisch oder Seehecht) gewonnen. Aufgrund der bovinen spongiformen Enzephalitis (BSE) und dem Bedarf an Weinen, die den jüdischen und muslimischen Speisegesetzen entsprechen, hat die Fischgelatine deutlich an Bedeutung gewonnen. Zur Herstellung wird das Ausgangsmaterial in Säure aufgeschlossen und der gewonnene Extrakt über Kieselgur und Ionenaustauscher aufgereinigt. Durch Trocknung im Trockentunnel wird aus dem Extrakt die feste Gelatine gewonnen und zu Pulver zermahlen. Gelatine wird in der Weinschönung auch in Kombination mit Tanninen oder Kieselgel angewendet, um deren Wirkung zu verstärken bzw. um gerbstoffarme Weine nicht zu sehr zu strapazieren.

Die Schönungswirkung der tierischen Produkte beruht darauf, dass die enthaltenen Proteine mit den im Wein enthaltenen Gerbstoffen unlösliche Verbindungen bilden, welche langsam zu Flocken aggregieren und sedimentieren.

Diesem Vorgang liegen vermutlich verschiedene nicht-kovalente, hydrophobe und hydrophile (Wasserstoffbrücken) Wechselwirkungen zugrunde, die zur Bildung unlöslicher Gerbstoff-Protein-Komplexe führen [Frazier et al., 2003]. Die Gerbstoffe des Weines (auch als *Oenotannine* bezeichnet) gehören zur Gruppe der Polyphenole und werden von

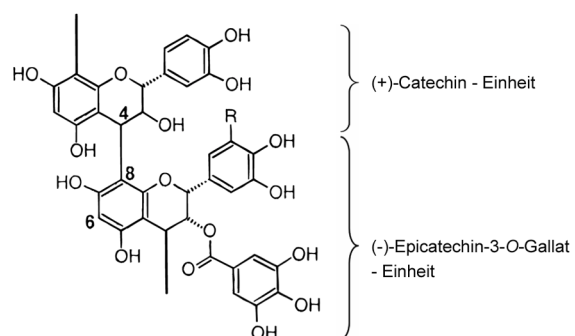


Abbildung 2.9. Beispiel für ein Weintrauben-Proanthocyanidin [Fulcrand et al., 1999; modifiziert]

den Proanthocyanidinen dominiert, die beispielhaft in Abbildung 2.9. dargestellt sind [Cheynier, 2005]. Aufgrund der Eigenladung der tierischen Proteine besitzen die Komplexe eine positive Nettoladung. Negativ geladene Trubteilchen des Weines wie etwa die Hefe werden daher adsorbiert und zusammen mit den Komplexen sedimentiert. Ferner tritt durch die Flockenbildung ein Einschluss kolloidaler Teilchen ein, welche dadurch ebenfalls sedimentiert werden. Das Ergebnis ist die Entfernung kolloidaler Trübungen aus den Weinen und gleichzeitig eine Reduktion der Gerbstoffe, was eine geschmackliche Harmonisierung der Weine bewirkt. In dieser Hinsicht unterscheiden sich die tierischen Proteine in ihren Eigenschaften. Während Fischgelatine und Hausenblase vermehrt kolloidale Teilchen adsorbieren und daher besonders zur Schönung gerbstoffarmer Weine geeignet sind, werden durch Hühnerei-Eiklar oder Kaliumkaseinat vermehrt Gerbstoffe aus dem Wein entfernt, was zu einer stärkeren Geschmacksharmonisierung speziell bei gerbstoffreichen Weinen führt [Vogt et al., 1974; Gollmick et al., 1970].

2.2.1.2. Weinstabilisierung

Die Weinstabilisierung befasst sich mit der vorbeugenden Verhinderung von Trübungen in Weinen. Während der Lagerung können Trübungen in erster Linie durch Metallverbindungen, Weintrauben- und Hefe-Proteine oder Weinsteinbildung verursacht werden und stellen ein starkes Qualitätskriterium für den Wein dar.

Neben dem zuvor erwähnten Kaliumhexacyanoferrat werden speziell zur Verhinderung von Proteintrübungen verschiedene Tonminerale wie Kaolin oder insbesondere verschiedene Bentonite (siehe Abbildung 2.10.) eingesetzt. Instabile Proteine, die u. a. aus der Komplexbildung mit Gerbstoffen oder Schwermetallen hervorgehen, besitzen in der Regel eine positive Nettoladung, weshalb sie von den tierischen Schönungsmitteln nur unzureichend erfasst werden [Gollmick et al., 1970]. Bentonite sind komplexe Natrium-, Calcium- und Aluminiumsilikate, die in Wein gute Quelleigenschaften und infolge der großen



Abbildung 2.10. Bentonit

Oberfläche (ca. 50000 cm² pro g Material) eine hohe Adsorptionsfähigkeit besitzen. Die Oberfläche des Bentonites ist im Gegensatz zu den proteinogenen Schönungsmitteln negativ geladen, wodurch positive Eiweißteilchen der Weine adsorbiert und zusammen mit dem Bentonit sedimentiert werden. Das Sediment wird anschließend durch Filtration oder Dekantieren abgetrennt, sodass derart behandelte Weine auch nachhaltig gegen kolloidale Eiweißtrübungen stabil sind [Vogt et al., 1974].

Bentonit findet hauptsächlich in der Behandlung von Weißweinen und kaum in der von Rotweinen Verwendung. Ursächlich hierfür ist zum einen die Minderung der Farbintensität durch Adsorption von Farbstoffen. Zum anderen sind Rotweine durch ihren höheren Gehalt an Gerbstoffen (siehe Tabelle 2.1.), welche zur natürlichen Sedimentation instabiler Proteine führen, hinreichend gegen Proteintrübungen stabil [Vogt et al., 1974].

Eine weitere Ursache für kolloidale Trübungen kann die Bildung von Weinstein sein. Weinstein bezeichnet ein Gemisch aus Kaliumhydrogen- und Calciumtartrat, welches aufgrund der Alkoholbildung und der Veränderung des pH-Wertes bereits während der Gärung, jedoch auch nachhaltig unter kühlen Lagerbedingungen ausfällt oder den Wein als Kolloid trübt. Dies wird in der Regel durch Zusatz von Metaweinsäure oder durch das Kälteverfahren verhindert. Beim Kälteverfahren wird der Wein für mehrere Tage nahe seines Gefrierpunktes gekühlt (ca. -2 bis -4 °C) und der so abgeschiedene Weinstein abgetrennt. Deutlich kostengünstiger ist der Zusatz von Metaweinsäure. Metaweinsäure bildet mit Kalium ein leicht lösliches Salz, wodurch Kalium dem Weinstein nicht mehr zur Verfügung steht. Der Wein wird somit für eine gewisse Zeit stabilisiert, jedoch geht Metaweinsäure langsam in Weinsäure über [Troost, 1972].

2.2.2. Einsatz von Lysozym

Traditionell wird die bakterielle Aktivität in Maische, Most und Jungwein durch Schwefelung kontrolliert. Allerdings sind auch negative Effekte wie Unverträglichkeiten und sensorische Beeinflussungen durch Schwefelung bekannt. Sulfite stellen die Ursache für einen Großteil der Weinunverträglichkeiten dar [Vally und Thompson, 2003]. Daher wurde im Jahre 2001 die Verwendung von Lysozym in der Weinproduktion als Substitution zur Schwefelung erlaubt [Sigler, 2004].

Lysozym ist ein 14,4 kDa schweres, basisches Protein, welches aus Hühnerei-Eiklar isoliert wird. Aufgrund seiner enzymatischen Aktivität gehört es zur Gruppe der Muramidasen, da es das in Zellwänden von Bakterien vorkommende Murein spalten kann. Somit besitzt Lysozym lytische Eigenschaften insbesondere gegenüber Gram-positiven Bakterien, welche beim sauren pH-Wert der Weine ihr Maximum erreichen (pH 2,8 – 4,2). Die in der Weinherstellung bedeutenden Milchsäurebakterien, speziell *Oenococcus oeni*, werden dadurch in ihrem Wachstum gehemmt. Lysozym wird daher besonders für die Kontrolle des BSA eingesetzt [Delfini et al., 2004]. Die zugelassene Höchstmenge innerhalb der EU beträgt 50 g/hL Wein, wobei das Lysozym üblicherweise als gefriergetrocknetes Pulver angewendet wird (siehe Abbildung 2.8.).

2.3. Lebensmittelallergien gegen tierische Produkte in der Weinherstellung

Allergische Reaktionen auf Weine, die durch Rückstände tierischer Produkte verursacht wurden, sind nicht bekannt. Diese Produkte selbst enthalten jedoch zum Teil potente Allergene, die in diesem Kapitel beschrieben werden sollen. Somit ist es denkbar, dass auch potentielle Rückstände dieser Allergene in Weinen allergische Reaktionen auslösen können. Da die Verwendung tierischer Produkte in der Weinproduktion in der Regel weder dem Verbraucher, noch dem behandelnden Arzt bekannt sind („versteckte Allergene“), ist zu erwarten, dass allergische Reaktionen auch nicht mit dem Verzehr von Wein bzw. den darin enthaltenen tierischen Proteinen in Verbindung gebracht werden. Möglicherweise wurden daher allergische Reaktionen auf derartige Rückstände bislang nicht publiziert [EFSA, 2005].

2.3.1. Hühnerei-Eiklar und Lysozym

Als Hühnerei wird üblicherweise das Ei des Haushuhns *Gallus gallus domesticus* bezeichnet. Dessen Eiklar stellt eine ca. 10 %ige, wässrige Proteinlösung dar und enthält die wichtigsten Allergene des Hühnereies. Zu ihnen zählt das Ovomuroid, Ovalbumin, Conalbumin (Ovotransferrin) und das Lysozym [Poulsen et al., 2001], wobei Ovomuroid das bedeutendste Hühnerei-Allergen zu sein scheint [Kreft, 1995].

Die Hühnereiallergie betrifft etwa 1 – 2 % der Kinder und gehört damit nach der Kuhmilchallergie (CMA) zu den häufigsten Auslösern allergischer Reaktionen gegen Lebensmittel. Im Erwachsenenalter hingegen ist die Hühnereiallergie selten [Savage et al., 2007], scheint hier aber eine höhere Stellung als die CMA einzunehmen. Unter 241 allergischen Reaktionen bei Erwachsenen auf Lebensmittel, welche innerhalb der EU beobachtet wurden, waren nur 7,5 % auf Hühnerei-Eiklar rückführbar [CICBAA, 2005].

Zur Einschätzung von Schwellendosen, ab welchen allergische Reaktionen bei sensibilisierten Individuen auftreten, wird üblicherweise der „Lowest-observed adverse effect level“ (LOAEL) herangezogen. Dieser kann als die geringste Dosis definiert werden, ab welcher nach Verabreichung des Lebensmittels in einer doppelt-blind, Placebo-kontrollierten Lebensmittel-Expositionsstudie (DBPCFC) objektive allergische Reaktionen beobachtet werden. Für Kinder wurde ein LOAEL von 2 mg Hühnerei-Eiklar (entspricht ca. 0,24 mg Hühnerei-Eiklar-Protein) bzw. 1 mg Hühner-Vollei (entspricht ca. 0,13 mg Vollei- bzw. 0,12 mg Eiklar-Protein) festgestellt [Morisset et al., 2003; Taylor et al., 2002]. Bei Erwachsenen scheint die Schwellendosis höher zu liegen, was vor dem Hintergrund der abgeschlossenen Entwicklung des Gastrointestinaltraktes und des gastrointestinalen Immunsystems auch logisch erscheint. Jedoch muss gleichzeitig darauf hingewiesen

werden, dass aufgrund der geringen Prävalenz bei Erwachsenen die Anzahl und der Umfang entsprechender Studien begrenzt ist. Ein LOAEL wurde bei Erwachsenen mit Hühnereiallergie mit 50 mg Hühner-Vollei (entspricht ca. 6,5 mg Vollei- bzw. 4 mg Eiklar-Protein) beschrieben [Norgaard und Bindslev-Jensen, 1992].

Zwischen 35 – 66 % aller Hühnereiallergiker zeigen *in vitro* Reaktionen speziell auf das Lysozym [Walsh et al., 2005; Hoffman, 1983; Langeland, 1982]. Trotz seines verhältnismäßig geringen Gehaltes im Hühnerei-Eiklar (3,5 % des Gesamtproteins) sind allergische Reaktionen, welche ausschließlich durch Lysozym verursacht wurden, bekannt [Pérez-Calderón et al., 2007; Malmheden, 2004; Frémont et al., 1997; Camp et al., 1988]. Dabei reichten in einer klinischen Studie mit Kindern bereits 3 mg bzw. ein Tropfen einer 1 mg/mL konzentrierten Lösung aus, um allergische Reaktion zu provozieren [Frémont et al., 1997]. Repräsentative LOAEL für Erwachsene fehlen jedoch.

2.3.2. Kasein aus Kuhmilch

Allergische Reaktionen gegen Kuhmilch zählen zu den am meisten verbreiteten und am längsten bekannten Lebensmittelallergien. Sie treten in erster Linie bei Kindern innerhalb der ersten sechs Lebensmonate auf [Wal, 2004]. Ähnlich wie die Hühnereiallergie tritt die CMA jedoch im Erwachsenenalter deutlich zurück [Crespo und Rodriguez, 2003; Anderson et al., 1991]. Unter 241 allergischen Reaktionen bei Erwachsenen auf Lebensmittel, welche innerhalb der EU beobachtet wurden, waren nur 2,5 % auf Kuhmilchproteine rückföhrbar [CICBAA, 2005]. Somit wird die Prävalenz der CMA auf 0,3 – 7,5 % im Kindesalter [FDA, 2006; Eigenmann, 2002; Gerrard et al., 1973] und auf unter 1 % der erwachsenen Bevölkerung geschätzt, wobei eine Häufigkeit von 0,3 % bei dänischen und amerikanischen Erwachsenen ermittelt wurde [FDA, 2006; Osterballe et al., 2005].

Bei den Hauptallergenen der Kuhmilch handelt es sich um die Proteine α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, Rinderserumalbumin (Molkenproteine), sowie die verschiedenen Kaseine. Kaseine gehören zur Gruppe der Phosphoproteine und werden typischerweise hinsichtlich Ihrer Aminosäuresequenz und ihres Molekulargewichtes in α -, β -, γ - und κ -Kasein unterteilt [Wal, 1998; Wal, 2004].

Bei Kindern wurde ein LOAEL von 100 μ L eines Kuhmilchpräparates, was ca. 1,5 mg Milchprotein bzw. 1,3 mg Kasein entspricht, festgestellt [Taylor et al., 2002]. Lam et al. (2008) beschrieben hingegen bei Erwachsenen einen LOAEL von 300 mg Magermilchpulver, was ca. 105 mg Milchprotein bzw. ca. 90 mg Kasein entspricht. Ebenso wie bei der Hühnereiallergie scheint somit die Schwellendosis für Erwachsene höher zu liegen. Jedoch ist auch hier, aufgrund der geringen Prävalenz, die Anzahl und der Umfang entsprechender Studien begrenzt.

Bei den oralen Provokationsstudien bleibt in der Regel unklar, welche der Milchproteine für das Auslösen der allergischen Reaktion verantwortlich waren. Da jedoch bei etwa 75 % der Kuhmilchallergiker eine multiple Sensibilisierung auf die verschiedenen Milchproteine auftritt [Wal, 2004], ist ein Zusammenwirken der unterschiedlichen Milchproteine bei der Auslösung allergischer Reaktionen wahrscheinlich.

2.3.3. Fischgelatine und Hausenblase

Fisch stellt eines der bedeutendsten Lebensmittel dar, welches sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern Allergien auslösen kann. Die Hauptallergene gehören zur Gruppe der Parvalbumine und sind ca. 10 – 12 kDa schwere, wasserlösliche Muskelproteine [Wopfner et al., 2007]. Gegen das Kollagen und seine Fragmente hingegen, welches Hauptbestandteil der Fischgelatine und der Hausenblase ist, sind keine allergischen Reaktionen bekannt. Zwar wurden in diversen *in vitro* Studien antigene Eigenschaften des Fischkollagens auf IgE von Fischallergikern festgestellt, jedoch muss eine Sensibilisierung auf ein Protein nicht zwangsweise auch zur Auslösung einer klinisch manifestierten allergischen Reaktion führen [André et al., 2003, Hamada et al., 2001; Hamada et al., 2003; Sakaguchi et al., 1999; Sakaguchi et al., 2000a; Sakaguchi und Inouye, 2000b]. Bislang fehlt der Beweis, dass die Antigenität des Fischkollagens auch zur Auslösung einer Allergie führen kann. Orale Provokationsstudien mit Fischgelatine und verschiedenen Fischallergikern zeigten keine Allergenität des Fischkollagens [André et al., 2003; Hansen et al. 2004]. Zwar wurden in der Vergangenheit wenige Fälle allergischer Reaktionen, die durch den Verzehr von Gelatine verursacht wurden, beschrieben, jedoch beziehen sich diese entweder auf den Verzehr von Säugetiergelatine oder der Ursprung der Gelatine wurde nicht dargestellt [Kelso et al., 1993; Nakayama et al., 1999; Nakayama et al., 2004; Sakaguchi et al., 1995; Sakaguchi et al., 1996; Sakaguchi et al., 1997; Sakaguchi et al., 1999; Sakaguchi und Inouye, 2001; Wang und Sicherer, 2005; Wahl und Kleinhans, 1989]. Da Säugetier- und Fischgelatine hinsichtlich ihrer chemischen Eigenschaften hinreichend unterschiedlich beschaffen sind, sind „Verwechslungen“ durch das humane Immunsystem (welche auch als „Kreuzreaktivität“ bezeichnet werden) auszuschließen bzw. nur in sehr geringem Ausmaße vorhanden [André et al., 2003; Hamada et al., 2001; Kelso et al., 1993; Sakaguchi et al., 1999; Sakaguchi et al., 2000a; Sakaguchi und Inouye, 2000b].

Zusammenfassend erscheint das allergene Potential des Fischkollagens, welches Hauptbestandteil der Fischgelatine und der Hausenblase ist, nach derzeitiger Erkenntnis nicht gegeben. Jedoch bleibt die Frage offen, inwiefern Reste von Muskelgewebe in Fischgelatinen und Hausenblasen vorhanden sein könnten, die zur Verschleppung des Parvalbumins in diese Produkte führen würden.

2.4. Kennzeichnung tierischer Proteine auf Weinen

Die Kennzeichnung allergener Lebensmittel wurde in der EU durch Erlass der EU-Richtlinie 2000/13/EG im Jahre 2000, welche maßgeblich durch die EU-Richtlinie 2003/89/EG ergänzt wurde, im neuen Umfang geregelt. Hintergrund war die oft undurchsichtige und mangelhafte Kennzeichnung allergener Zutaten auf Verpackungen, weshalb die Erhöhung des Verbraucherschutzes und der Information auf den Verpackungen erforderlich war. Nach diesen Richtlinien müssen Lebensmittelzutaten, die am häufigsten Allergien und bestimmte Unverträglichkeiten auslösen, auf der Etikettierung von Lebensmitteln aufgeführt werden. Von besonderer Bedeutung hierbei ist der in der EU-Richtlinie 2003/89/EG definierte Anhang IIIa, welcher eine Liste von 12 Zutaten und deren Produkte darstellt, die in Europa häufigste Ursachen für Lebensmittelallergien und -unverträglichkeiten sind. Zu ihnen gehören u. a. Fisch und Fischprodukte, Ei und Eiprodukte, sowie Milch und Milchprodukte. Für diese Zutaten gelten besondere Kennzeichnungsvorschriften. Relevant für die Weinproduktion ist dabei Artikel 6, Absatz 10 der EU-Richtlinie 2000/13/EG in Verbindung mit den Ergänzungen durch die EU-Richtlinie 2003/89/EG, Artikel 1, Absatz 1f. Demnach „werden bei der Herstellung eines Lebensmittels verwendete Stoffe, die aus einer Zutat nach Anhang IIIa gewonnen wurden, und die – wenn auch möglicherweise in veränderter Form – im Enderzeugnis vorhanden bleiben, als Zutaten betrachtet und mit einem deutlichen Hinweis auf die Bezeichnung der Zutat angegeben, aus der sie gewonnen wurden“. Somit sind die unter Kapitel 2.2.1.1. beschriebenen, tierischen Produkte in der Weinbereitung gemäß der EU-Richtlinie 2003/89/EC auf Weinen zu kennzeichnen, insofern diese im fertigen Wein verbleiben. Diese Annahme war umstritten, da bislang keine Daten über Rückstände von Schönungsmitteln in Weinen vorlagen. Auf Antrag verschiedener Hersteller und Verbände wurde daher eine vorläufige Aussetzung der Kennzeichnung von Weinschönungsmitteln bis zum 25.11.2007 erwirkt, um wissenschaftliche Erkenntnisse hierzu erlangen zu können. Diese vorläufige Aussetzung wurde durch Erlass der EU-Richtlinie 2005/26/EG festgelegt. Nach Ablauf dieser Frist wurde die EU-Richtlinie 2000/13/EC im November 2007 durch die EU-Richtlinie 2007/68/EC geändert. Hiernach enthält Anhang IIIa nun 14 Zutaten, wobei nur die Verwendung von Fischgelatine und Hausenblase in der Weinherstellung endgültig von der Kennzeichnung ausgenommen ist. Weinschönungsmittel auf der Basis von Kuhmilch und Hühnereiern, sowie Lysozym hingegen sind kennzeichnungspflichtig. Der Anhang IIIa soll jedoch gemäß Artikel 6, Absatz 11 der EU-Richtlinie 2000/13/EG in Verbindung mit den Ergänzungen durch die EU-Richtlinie 2003/89/EG, Artikel 1, Absatz 1f „auf Grundlage der neuesten wissenschaftlichen Erkenntnisse regelmäßig überprüft und erforderlichenfalls aktualisiert“ werden. Diesbezüglich wurde durch die EU-Verordnung 415/2009 eine Änderung der EU-Richtlinie 2007/68/EC erwirkt. Hiernach wird die Kennzeichnung von

Weinen, welche mit Schönungsmitteln auf der Basis von Kuhmilch und Hühnereiern, sowie mit Lysozym behandelt wurden, weiterhin bis zum 31.12.2010 ausgesetzt.

Anders als in der EU unterliegen Schönungsmittel, die aus Fisch oder Fischprodukten, Ei oder Eiprodukte, sowie Milch oder Milchprodukten hergestellt wurden, in den Nationen Australien, Neuseeland (*Australian and New Zealand Food Standards Code of December 2002*) und den USA (*Food Allergen and Labeling and Consumer Protection Act of 2004*) einer Kennzeichnungspflicht auf Weinen. Eine Ausnahme der Kennzeichnung für Fisch oder Fischprodukte, im Speziellen der Fischgelatine und der Hausenblase, wurde in diesen Nationen nicht umgesetzt. In Japan besteht eine Kennzeichnungspflicht nur für Milch und Milchprodukte, sowie Ei und Eiprodukte (*Ordinance No. 23 of 2001 of the Ministry of Health, Labour and Welfare*). Allerdings liegt eine Empfehlung zur freiwilligen Kennzeichnung verschiedener Fischarten, sowie Gelatine vor (*Notice No. 79 of March 2001 of the Ministry of Health, Labour and Welfare*).

3. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Dissertation war die Entwicklung quantitativer Methoden zur Bestimmung der kennzeichnungspflichtigen Weinschönungsmittel Fischgelatine, Hausenblase, Kaliumkaseinat, Hühnerei-Eiklar und des Stabilisators Lysozym in verschiedenen Weiß- und Rotweinen. Im Rahmen der temporären Kennzeichnungsausnahme der EU-Richtlinie 2005/26/EC sollten die Mengen der Schönungsmittel und des Lysozyms in Weinen und das davon ausgehende allergene Potential erfasst werden und somit zur Beurteilung einer permanenten Kennzeichnungsbefreiung durch die EFSA beitragen. In diesem Zusammenhang war es auch Ziel dieser Arbeit, mögliche Gehalte des Fisch-Hauptallergenes Parvalbumin in Fischgelatinen und Hausenblasen zur Weinschönung zu erfassen und das daraus resultierende allergene Potential dieser Schönungsmittel zu beurteilen. Diese Untersuchungen sollten dem Artikel 6, Absatz 11 der EU-Richtlinie 2000/13/EG (in Verbindung mit den Ergänzungen durch die EU-Richtlinie 2003/89/EG, Artikel 1, Absatz 1f), nach welchem „das Verzeichnis in Anhang IIIa auf Grundlage der neuesten wissenschaftlichen Erkenntnisse regelmäßig überprüft und erforderlichenfalls aktualisiert“ werden soll, nachkommen.

Zur Bestimmung von Allergenen hat sich in der Proteinanalytik der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) fest etabliert. In dieser Arbeit sollten daher kompetitive und indirekte ELISA-Systeme entwickelt und validiert werden, um die Rückstände allergener Substanzen zuverlässig und empfindlich detektieren zu können. Als Hilfsmittel hierzu sollte die Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) in Verbindung mit Silber-, Coomassie- und, nach vorangegangenem Western Blot, Immunfärbung angewendet werden. Hierdurch ist es möglich, die Schönungsmittel hinsichtlich ihrer Proteinkomposition und ihrer Antigenität zu charakterisieren. Größere Mengen an proteinogenen Rückständen, die mittels ELISA teilweise nur schwer zu erfassen sind, sollten durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie in Verbindung mit Fluoreszenzdetektion (HPLC-FLD) bestimmt werden.

Mit den entwickelten und validierten ELISA-Methoden sollten verschiedene deutsche Modellweine untersucht werden. Die Jungweine wurden im Jahr 2005 (Lese 2004) im Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Mosel in Trier (Deutschland) durch Behandlung mit unterschiedlichen Schönungsmitteln und Lysozym, sowie verschiedenen Schönungsmittel- und Lysozym-Dosierungen hergestellt. Da Bentonit aufgrund seiner häufigen Anwendung und seiner Eigenschaft, Proteine zu adsorbieren, möglicherweise eine wichtige Rolle in der Entfernung der Schönungsmitteln und dem Lysozym aus Wein spielt, wurden unterschiedliche Dosierungen des Bentonites auf diese Modellweine angewendet. Neben den Modellweinen sollten auch verschiedene Handelsweine aus Deutschland und den

führenden Weinnationen Frankreich und Italien auf Rückstände kennzeichnungspflichtiger Schönungsmittel untersucht werden.

Das allergene Potential nachgewiesener Rückstände sollte anhand publizierter LOAEL, die durch DBPCFC in allergischen Personen erzielt wurden, ermittelt werden. Lagen derartige LOAEL nicht vor, so sollte das allergene Potential *in vitro* durch den Einsatz von Blutseren allergischer Personen in Verbindung mit SDS-PAGE, Western-Blot und Immunfärbung evaluiert werden. Die eindeutige Identifizierung reaktiver Proteine sollte dabei gegebenenfalls massenspektrometrisch durch matrixunterstützte Laser Desorption/Ionisation mit Flugzeit- und Tandem-Massenspektrometer (MALDI-TOF MS/MS), in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Arbeitsgruppe Proteomics, erfolgen. *In vivo* sollten Skin Prick Tests (SPT) in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität München, Department für Dermatologie und Allergologie Biederstein, zur Beurteilung beitragen.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit befassen sich mit der Entwicklung, Validierung und Anwendung von kompetitiven und indirekten ELISA zur Bestimmung von Schönungsmitteln in Weißweinen, sowie der Charakterisierung der Schönungsmittel mittels SDS-PAGE und Western Blot. Nachgewiesene Rückstände an Schönungsmitteln in Weinen wurden mit publizierten Schwellendosen für allergische Reaktionen verglichen und das allergene Potential dieser Rückstände diskutiert. Lysozym wurde mittels kompetitivem ELISA und HPLC-FLD in verschiedenen Weiß- und Rotweinen bestimmt. Mangels publizierter klinischer Schwellenwerte für allergische Reaktion gegen Lysozym wurde dessen allergenes Potential und das ausgewählter Weine *in vitro* mit Seren von Hühnerei-Allergikern und *in vivo* mittels SPT evaluiert.

Da für Fischgelatinen und Hausenblasen folglich zu Kapitel 2.3.3. bislang keine Allergenität bewiesen werden konnte, wird in diesem Kapitel - zusätzlich zu den Weinuntersuchungen - die Evaluierung des allergenen Potentials anhand der Bestimmung des Fisch-Hauptallergens Parvalbumin in diesen Produkten mittels kompetitiven ELISA beschrieben.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in diesem Kapitel in Form von fünf Veröffentlichungen präsentiert.

4.1. Untersuchung des allergenen Potentials von Weinen, welche mit verschiedenen proteinogenen Schönungsmitteln geschönt wurden, mittels ELISA

Die in diesem Kapitel dargestellte Veröffentlichung stellt die Entwicklung und Validierung von kompetitiven ELISA zur Quantifizierung von Fischgelatine, Hausenblase, Kaliumkaseinat, Hühnerei-Eiklar und Lysozym in Weißweinen dar. Die entwickelten und validierten Methoden wurden auf verschiedene Modell-Weißweine, welche mit unterschiedlichen Dosierungen der Schönungsmittel behandelt wurden, angewendet und das allergene Potential nachgewiesener Rückstände beurteilt.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 2007, 55, 3127-3133

Investigation of the allergenic potential of wines fined with various proteinogenic fining agents by ELISA

Weber, Patrick[#]; Steinhart, Hans[#]; Paschke, Angelika^{#,*}

[#] University of Hamburg, Department of Chemistry, Food Chemistry, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

* inquiries should be addressed to: Email: angelika.paschke@uni-hamburg.de; Phone: 0049 40 42838 4353

Fax: 0049 40 42838 4342

4.1.1. Abstract

Hidden allergens are a common problem in food safety that has been known for many years. This is why the European Parliament adopted Directive 2003/89/EC amending 2000/13/EC. In addition to specific ingredients, Directive 2003/89/EC also requests the declaration of specific products that were used in the production and could be a risk for allergic individuals. This also includes the declaration of fining agents and lysozyme used in wines. In fact, it could be assumed that fining agents would be almost completely removed during the manufacturing process; however, until now there has been no necessity to analyze wine for these fining agents. By applying enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), residuals of fining agent proteins and the stabilizer lysozyme were investigated in various German wines. The results showed no detectable amounts of fining agents in wines, except for dried egg white and lysozyme, both derived from hen's egg white. For those products, adverse reactions against treated wines could not be excluded.

4.1.2. Hinweis zum Copyright

Aufgrund des Copyrights ist dieser Artikel nicht in der vorliegenden Dissertation dargestellt. Der Artikel ist im „Journal of Agricultural and Food Chemistry“ der *American Chemical Society* erschienen.

www.pubs.acs.org/JAFC

Print ISSN: 0021-8561

Online ISSN: 1520-5118

DOI:10.1021/jf063436s

4.2. Lysozym in Wein: Eine Risikobewertung für Konsumenten mit Hühnerei-Allergie

Die Ergebnisse dieser Arbeit befassen sich mit dem Nachweis von Lysozym in verschiedenen Modellweinen mittels ELISA und HPLC-FLD und stellen somit die Fortsetzung der Untersuchungen von Kapitel 4.1. dar. Die Evaluierung des allergenen Potentials erfolgte *in vitro* durch Western-Blotting und anschließender Immunfärbung mit Blutseren von Hühnerei-Allergikern. Positive Befunde wurden mittels MALDI-TOF MS/MS abgesichert. *In vivo* erfolgte die Evaluierung des allergenen Potentials von Lysozym in Wein mittels SPT. Das allergene Potential von Lysozym in Weinen wurde anschließend auf Basis der erhaltenen Ergebnisse diskutiert.

Molecular Nutrition and Food Research 2009, 53, 1469-1477

Lysozyme in wine: A risk evaluation for consumers allergic to hen's egg

Patrick Weber¹; Hartmut Kratzin²; Knut Brockow³; Johannes Ring³; Hans Steinhart¹;
Angelika Paschke^{1,*}

¹ University of Hamburg, Department of Chemistry, Institute of Food Chemistry, Hamburg, Germany

² Max-Planck-Institute of Experimental Medicine, Workgroup Proteomics, Göttingen, Germany

³ Department of Dermatology and Allergology Biederstein and Division of Environmental Dermatology and Allergy GSF / TUM, Technical University of Munich, Munich, Germany

* Author who should be contacted:

Dr. Angelika Paschke, University of Hamburg, Department of Chemistry, Institute of Food Chemistry, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany. Phone: +49 40 42838 4353, Fax: +49 40 42838 4342, Email: angelika.paschke@uni-hamburg.de

4.2.1. Abstract

Lysozyme used in wine production could present a risk for consumers allergic to hen's egg. Thus, precautionary labeling of lysozyme on wines has been adopted within the European Community by updating Annex IIIa by Directive 2007/68/EC on November 27, 2007. Since no scientific data are known about the actual amounts and risks of lysozyme in wines, various *in vitro* efforts and skin prick tests were applied in this study to evaluate the presence of lysozyme in wines and the reactivity of those residues in allergic individuals and to fulfill

the claim of updating Annex IIIa announced in Directive 2003/89/EC. Depending on the wine's color (red or white wine) and fining with bentonite, which is known as an important step to remove unstable proteins mainly from white wines, diverse results were obtained concerning the amounts of lysozyme in finished wines and their *in vitro* and *in vivo* reactivity in humans allergic to hen's egg.

4.2.2. Hinweis zum Copyright

Aufgrund des Copyrights ist dieser Artikel nicht in der vorliegenden Disputation dargestellt. Der Artikel ist im Journal „Molecular Nutrition and Food Research“ des Verlages *Wiley-VCH* erschienen.

www.mnf-journal.com

Print ISSN: 1613-4125

Online ISSN: 1613-4133

DOI: 10.1002/mnfr.200800161

4.3. Charakterisierung, Antigenität und Detektion von Fischgelatinen und Hausenblasen, welche als Prozesshilfsstoffe in Weinen verwendet werden

Die in diesem Kapitel dargestellte Veröffentlichung stellt die Charakterisierung von verschiedenen Fischgelatinen und Hausenblasen mittels SDS-PAGE und Western Blot, sowie die Entwicklung eines indirekten ELISA zur Detektion derartiger Stoffe in Weinen dar. Der indirekte ELISA wurde in mehreren Weißwein-Matrices evaluiert und zur Untersuchung verschiedener Modell-Weißweine, welche mit unterschiedlichen Mengen an Fischgelatine, Hausenblase und Bentonit behandelt wurden, verwendet. Darüber hinaus wurde eine Auswahl von 60 Handelsweinen auf Spuren von Fischgelatine oder Hausenblase untersucht. Das allergene Potential dieser Schönungsmittel wurde auf Basis der erhaltenen Ergebnisse, sowie auf Basis einer umfangreichen Literaturrecherche über die Allergenität von Fischgelatine und Hausenblase diskutiert.

Food Additives and Contaminants 2010, 27(3), 273-282

Characterization, Antigenicity, and Detection of Fish Gelatine and Isinglass used as Processing Aids in Wines

Weber, Patrick[#]; Steinhart, Hans[#]; Paschke, Angelika^{#,*}

[#] University of Hamburg, Department of Chemistry, Food Chemistry, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

* inquiries should be addressed to: Email: angelika.paschke@uni-hamburg.de; Phone: 0049 40 42838 4353

Fax: 0049 40 42838 4342

4.3.1. Abstract

Fish gelatine (FG) and isinglass (IG) are widely used in the pharmaceutical industry and as ingredients or processing aids in food production. Both products are the focus of interest since several countries, particularly the member states of the EU and Japan, USA, Australia, and New Zealand, have introduced special labelling regulations for allergenic foodstuffs, such as fish and products thereof. Thus, there is a demand for a reliable and sensitive method for the detection of FG and IG in foodstuffs. In this study, the characterization of various FGs and IGs, polyclonal antibodies raised against fish collagen and the development of a sensitive indirect ELISA for the detection of FG and IG is described. The ELISA method

detected ≤ 0.11 ppm from all FGs and IGs tested. The indirect ELISA was applied to various experimental wines where FG and IG had been used as processing aids and to several commercial wines. No residues of FG and IG were detected in experimental wines additionally treated with bentonite, a strong adsorbent for proteins, and successive filtration. Additionally, no residues were found in the commercial wines. However, amounts of up to 0.33 ppm were found in some experimental wines not treated with bentonite and successive filtration. Therefore, wines may contain traces of FG and IG that were used as processing aids during the wine production. However, treatment with bentonite in combination with additional filtration had a clear impact on these residues.

4.3.2. Hinweis zum Copyright

Aufgrund des Copyrights ist dieser Artikel nicht in der vorliegenden Disputation dargestellt. Der Artikel ist im Journal „Food Additives and Contaminants“ des Verlages *Taylor & Francis* erschienen.

www.tandf.co.uk/journals/tfac

Print ISSN: 0265-203X

Online ISSN: 1464-5122

DOI: 10.1080/02652030903030397

4.4. Bestimmung des Lebensmittelallergens Kasein vom Rind in Weißweinen mittels quantitativem, indirektem ELISA, SDS-PAGE, Western Blot und Immunfärbung

Die in diesem Kapitel dargestellte Veröffentlichung beschreibt die Entwicklung, Validierung und Anwendung eines quantitativen, indirekten ELISA zur Bestimmung der Schönungsmittel Kasein und Kaliumkaseinat in Weißweinen, sowie die Charakterisierung dieser Schönungsmittel mittels SDS-PAGE. Die Anwendung des ELISA erfolgte an Modellweinen, die mit unterschiedlichen Dosierungen an Kaliumkaseinat und Bentonit behandelt wurden. Zusätzlich wurde eine Auswahl von 60 europäischen Handelsweinen mit unbekannter Schönung untersucht. Positive Kasein- bzw. Kaseinat-Nachweise wurden mit Hilfe von SDS-PAGE und Western-Blot hinsichtlich der genauen Art der Milchproteine untersucht.

Neben den *in vitro* Untersuchungen befasst sich diese Veröffentlichung mit der Einführung einer Schwellendosis für Kasein, ab welcher mit keinen allergischen Reaktionen im Großteil der erwachsenen Kuhmilchallergiker zu rechnen ist („no observed adverse effect level“ oder NOAEL). Auf Basis einer umfangreichen Recherche in mehr als 200 Publikationen wird die Repräsentativität, sowie die Anwendbarkeit eines solchen NOAEL auf die erhaltenen Befunde diskutiert.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 2009, 57(18), 8399-8405.

Determination of the bovine food allergen casein in white wines by quantitative indirect ELISA, SDS-PAGE, Western Blot, and Immunostaining

Weber, Patrick[#]; Steinhart, Hans[#]; Paschke, Angelika^{#,*}

[#] University of Hamburg, Department of Chemistry, Food Chemistry, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

* inquiries should be addressed to: Email: angelika.paschke@uni-hamburg.de; Phone: 0049 40 42838 4353

Fax: 0049 40 42838 4342

4.4.1. Abstract

This study describes the characterization of allergic bovine casein and caseinate fining agents by SDS-PAGE analysis and the development of a quantitative indirect ELISA for the detection of these substances in wines. The ELISA was applied to various experimental

wines that were treated with different caseinate dosages and went through different processing steps and to a panel of commercial wines. Positive results were assured by SDS-PAGE, Western Blot, and immunostaining. Comprehensive literature research was done to evaluate the demanded sensitivity of the ELISA. The results showed that α - and β -caseins remain in some wines and are detectable. Estimated amounts were in the range or below an estimated no-observed adverse effect level (NOAEL) of 0.9 ppm, but it was concluded that there is still an uncertainty about this NOAEL. Additional applied processing, referring to bentonite treatment and successive filtration, was determined to contribute to a significant decrease of casein residues in wines.

4.4.2. Hinweis zum Copyright

Aufgrund des Copyrights ist dieser Artikel nicht in der vorliegenden Dissertation dargestellt. Der Artikel ist im „Journal of Agricultural and Food Chemistry“ der *American Chemical Society* erschienen.

www.pubs.acs.org/JAFC

Print ISSN: 0021-8561

Online ISSN: 1520-5118

DOI: 10.1021/jf9013982

4.5. Kompetitiver indirekter ELISA zur Bestimmung von Parvalbuminen verschiedener Fischarten in Fischgelatinen und Hausenblasen zur menschlichen Ernährung mittels PARV-19 Anti-Parvalbumin Antikörpern

Die in diesem Kapitel dargestellte Veröffentlichung beschreibt die präparative Darstellung des Haupt-Fischallergens Parvalbumin aus verschiedenen Fischarten, sowie die Entwicklung, Validierung und Anwendung eines kompetitiven ELISA zur Bestimmung von Parvalbuminen verschiedener Fischarten in Fischgelatinen und Hausenblasen. Basierend auf diesen Ergebnissen, sowie denen anderer Arbeitsgruppen, wurde das allergene Potential von Fischgelatinen und Hausenblasen mit besonderem Augenmerk auf die Weinschönung diskutiert.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 2009, 57, 11328-11334

Competitive indirect ELISA for the determination of parvalbumins from various fish species in food grade fish gelatins and isinglass with PARV-19 anti-parvalbumin antibodies

Weber, Patrick[#]; Steinhart, Hans[#]; Paschke, Angelika^{#,*}

[#] University of Hamburg, Department of Chemistry, Food Chemistry, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

* inquiries should be addressed to: Email: angelika.paschke@uni-hamburg.de; Phone: 0049 40 42838 4353

Fax: 0049 40 42838 4342

4.5.1. Abstract

Parvalbumins are well-known as major fish allergens. However, no quantitative analytical method is currently available for the determination of parvalbumins from different fish species. The aim of this study was the isolation of the various parvalbumins by the application of gel chromatography and dialysis and the development and validation of a competitive indirect ELISA for the determination of parvalbumins from various fish species. This ELISA method was applied to several fish gelatins and isinglass samples. The competitive ELISA was capable of detecting all tested parvalbumins within a range of 0.1 – 0.5 ppm. No parvalbumin was detected in any of the investigated fish gelatins or in a fish skin

used as raw material for the fish gelatin production. Contrarily, isinglass was found to contain parvalbumin amounts of up to 414.7 ± 30.6 ppm.

4.5.2. Hinweis zum Copyright

Aufgrund des Copyrights ist dieser Artikel nicht in der vorliegenden Dissertation dargestellt. Der Artikel ist im „Journal of Agricultural and Food Chemistry“ der *American Chemical Society* erschienen.

www.pubs.acs.org/JAFC

Print ISSN: 0021-8561

Online ISSN: 1520-5118

DOI: 10.1021/jf902470e

5. Zusammenfassende Diskussion

5.1. Diskussion der Methoden zum Nachweis tierischer Schönungsmittel und Lysozym in Weinen

Das allergene Potential tierischer Schönungsmittel und Lysozym in der Weinschönung wird seit Erlass der EU Richtlinie 2003/89/EG im November 2003 in der Weinwirtschaft und in wissenschaftlichen Gremien, speziell der EFSA, umfangreich diskutiert. Dabei galt das Zurückbleiben tierischer Proteine im Wein und ein daraus resultierendes allergenes Potential aus wissenschaftlicher und technologischer Sicht zunächst als zweifelhaft, wie es einleitend dargestellt wurde. Im Rahmen dieser Dissertation konnte jedoch gezeigt werden, dass Weine Rückstände tierischer Proteine aufweisen können, die unter gewissen Umständen ein allergenes Potential besitzen. Hierbei hat sich der ELISA als eine zuverlässige und empfindliche Methode zur Detektion von Allergenen in Weißweinen bewiesen. Speziell im Falle des Lysozyms gelang es zudem, eine empfindliche Bestimmung mittels HPLC-FLD vorzunehmen und somit auch größere Mengen, die den Arbeitsbereich des ELISA überschritten, zu detektieren und eine Untersuchung von Rotweinen vorzunehmen. Dies wurde durch den Gehalt der aromatischen Aminosäure Tryptophan im Lysozym ermöglicht, welche mittels Fluoreszenzmessung direkt in Proteinen detektiert werden kann.

Die Untersuchung von Rotweinen mittels indirektem und kompetitiv indirektem ELISA war im Rahmen dieser Dissertation nicht möglich. Als Ursache hierfür ist der hohe Polyphenolgehalt der Rotweine, zu denen auch die Gerbstoffe wie z. B. Tannine zählen, zu sehen (Tabelle 2.1.). Wie in Kapitel 2.2.1.1. beschrieben, zeigen Polyphenole und Gerbstoffe eine hohe Affinität zu Proteinen und bewirken die Ausbildung komplexer Strukturen. Dies führte bei der Untersuchung von Rotweinen zu einer deutlichen Beeinflussung der Antikörper des ELISA und somit zu unzureichenden Ergebnissen. Eine vorherige Abtrennung der Proteine durch Dialyse, Festphasenextraktion oder Proteinfällung war nicht ohne inakzeptable Verluste möglich, was die Komplexierung von Proteinen und Polyphenolen in Rotweinen nahe legte und aufgrund der Ausführungen in Kapitel 2.2.1.1. als sehr wahrscheinlich anzunehmen ist. Im Falle der Proteinfällung war zudem eine quantitative Fällung der geringen Proteinmengen in Weinen nicht möglich. Eine Verdünnung der Rotweine auf eine akzeptable Polyphenolkonzentration hingegen führte zu einer unzureichenden Empfindlichkeit der ELISA Systeme. Somit wurde die Analytik der Weine mittels ELISA auf Weißweine beschränkt. Für diese kann aufgrund des geringeren Polyphenolgehaltes und der damit verbundenen geringeren „Selbstklärung“ ohnehin ein höherer Gehalt an Schönungsmittelrückständen und Lysozym angenommen werden. Dies konnte im Falle des Lysozyms auch bewiesen werden (siehe Kapitel 4.2. und Tabelle 5.3.).

Alle untersuchten Schönungsmittel und das Lysozym konnten mittels ELISA oder HPLC mit Nachweisgrenzen (nachfolgend definiert als 3-fache Standardabweichung des Blindwertes) von $\leq 1,1$ ppm in Weinen nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenzen der unterschiedlichen analytischen Systeme in der Weinmatrix sind in Tabelle 5.1. zusammengefasst, wobei eventuelle Verdünnungen berücksichtigt wurden. Dabei zeigte sich, dass im Falle der Hausenblasen und des Kaliumkaseinates durch einen indirekten ELISA eine Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit im Vergleich zum kompetitiven indirekten ELISA erreicht werden konnte. Die Empfindlichkeit des kompetitiven indirekten ELISA zur Bestimmung von Lysozym konnte durch die HPLC-FLD Methode hingegen nicht erreicht werden. Die HPLC-FLD Methode zeichnete sich somit einzig durch den Vorteil aus, dass mit ihr die Quantifizierung größerer Lysozym-Mengen und die Vermessung von Rotweinproben möglich waren.

Tabelle 5.1. Zusammenfassung der Nachweisgrenzen analytischer Systeme, definiert als 3-fache Standardabweichung des Blindwertes, zum Nachweis von tierischen Schönungsmitteln in Weinen (bezogen auf die unverdünnte Weinmatrix).

	ELISA		HPLC
	kompetitiv indirekt	indirekt	
Hausenblase	0,5 – 2,8 ppm	0,2 – 1,1 ppm 0,01 – 0,02 ppm *	-
Fischgelatine	0,05 ppm	0,3 – 1,1 ppm	-
Kalium Kaseinat	1 – 3,3 ppm	0,2 – 0,5 ppm	-
Hühnerei-Eiklar	0,2 ppm	-	-
Lysozym	0,01 ppm	-	0,5 ppm

* = Nachweisgrenzen für die Hausenblase, welche für die Produktion der Fischkollagen spezifischen Antikörper verwendet wurde; - = nicht untersucht.

Die Bereiche, in denen eine zuverlässige Quantifizierung der tierischen Proteine mittels der entwickelten ELISA-Systeme und der HPLC Methode im Wein möglich war, sind in Tabelle 5.2. zusammengefasst. Akzeptable Wiederfindungsraten wurden für alle untersuchten Schönungsmittel zwischen 68 und 137 % im Bereich $\geq 0,5$ ppm in verschiedenen Weinmatrices erzielt. Lysozym konnte mit Wiederfindungen zwischen 63 – 106 % im Bereich von 1 – 10 ppm mittels kompetitiv indirektem ELISA und zwischen 4 – 30 ppm mittels HPLC-FLD zuverlässig in Weinen quantifiziert werden. Aufgrund der geringen Schönungsmittel- und Lysozym-Rückstände in den untersuchten Weinen erlaubten diese Arbeitsbereiche jedoch keine genaue Quantifizierung. Ausnahmen stellten Weine ohne Bentonit –

Behandlung dar, die mit einem Hausenblase-Präparat (siehe Kapitel 4.3.4.) oder Lysozym (siehe Kapitel 4.2.4.) behandelt wurden. Durch Vergleich der detektierten Signale mit der Nachweis- und Erfassungsgrenze der jeweiligen Methode (letztere definiert als 6-fache Standardabweichung des Blindwertes) im *t*-Test gelang es jedoch, eine Abschätzung der Proteinmengen mit einer Genauigkeit im Bereich von 10^{-1} bis 10^{-2} ppm in allen positiv getesteten Weinen vorzunehmen. Sowohl mit den entwickelten kompetitiv indirekten als auch mit den indirekten ELISA-Systemen und der HPLC-FLD Methode war es somit im Rahmen dieser Dissertation möglich, Schönungsmittelrückstände und Lysozym in Weinen quantitativ oder zumindest semi-quantitativ zu bestimmen. Die Mengen an Schönungsmitteln und Lysozym, die in Weinen gefunden wurden, sind in Tabelle 5.3. zusammengefasst.

Tabelle 5.2. Zusammenfassung der Arbeitsbereiche analytischer Systeme zur Quantifizierung tierischer Schönungsmittel und Lysozym in Weinen (bezogen auf die unverdünnte Weinmatrix).

	ELISA		HPLC
	kompetitiv indirekt	indirekt	
Hausenblase	5 – 100 ppm [#] (77 – 137 %) [#]	0,03 – 1 ppm ^{#*} (69 – 116 %) ^{#*}	-
Fischgelatine	0,5 – 5 ppm [#] (107 – 124 %) [#]	3 – 20 ppm [#] (73 – 125 %) [#]	-
Kalium Kaseinat	10 – 100 ppm (80 – 113 %)	2 – 20 ppm (68 – 111 %)	-
Hühnerei-Eiklar	1 – 10 ppm (114 – 130 %)	-	-
Lysozym	1 – 10 ppm (63 – 106 %)	-	4 – 30 ppm (-)

Werte in Klammern stellen die Wiederfindungsraten in der Weinmatrix für den jeweiligen Arbeitsbereich da.

= Aufgrund der Heterogenität der untersuchten Präparate ist diese Angabe nur beispielhaft; * = Arbeitsbereich für die Hausenblase, welche zur Produktion der Fischkollagen spezifischen Antikörper verwendet wurde; - = nicht untersucht.

Bei der Bestimmung von Fischgelatine und Hausenblase in Weinen ist anzumerken, dass aufgrund der Heterogenität der verwendeten Produkte nur dann eine quantitative oder semi-quantitative Bestimmung möglich ist, wenn das zur Schönung eingesetzte Produkt bekannt ist. Dies war bei den untersuchten Modellweinen, nicht jedoch bei den Handelsweinen gegeben. Die unterschiedlichen Hydrolysegrade und die Verwendung verschiedenster Fisch-Gattungen (siehe Kapitel 2.2.1.1., 4.3.2 und 4.3.5.) führten zu sehr unterschiedlichen Reaktivitäten der einzelnen Präparate in den immunologischen Methoden. Dies konnte

eindrucksvoll mittels SDS-PAGE, Western-Blot und indirektem ELISA belegt werden (siehe Kapitel 4.3.4.). Der qualitative Nachweis aller untersuchten Produkte gelang zwar in einem schmalen Bereich von 0,2 – 1,1 bzw. 0,5 – 2,8 ppm (siehe Tabelle 5.1.), jedoch waren die Arbeitsbereiche zur Quantifizierung von Produkt zu Produkt sehr unterschiedlich. Die Zusammenfassung der Arbeitsbereiche und Wiederfindungen in Tabelle 5.2. ist daher nur beispielhaft für einige Fischgelatinen und Hausenblasen dargestellt und repräsentiert keinesfalls zu verallgemeinernde Werte. Eine zuverlässige Quantifizierung derartiger Produkte in Weinen ist somit mittels der entwickelten immunologischen Methoden nicht möglich, wenn die Art und Herkunft der eingesetzten Fischgelatine bzw. Hausenblase unbekannt ist. Allerdings wurden in dieser Arbeit trotz niedriger Nachweisgrenzen auch keine positiven Nachweise für Fischgelatine oder Hausenblase in derartigen Weinen (Handelsweine) erzielt.

Tabelle 5.3. Zusammenfassung der Untersuchungs-Ergebnisse von Weinen auf Rückstände tierischer Schönungsmittel und Lysozym mittels ELISA und HPLC-FLD.

	Modellweine		Handelsweine
	ohne Bentonit	mit Bentonit	
Hausenblase	0,01 – 0,33 ppm (8/24)	n.n. (0/24)	n.n. (0/60)
Fischgelatine	n.n. (0/8)	n.n. (0/8)	n.n. (0/60)
Kalium Kaseinat	0,2 ppm * (2/16)	n.n. (0/16)	≤ 0,4 ppm * (3/61)
Hühnerei-Eiklar	-	0,2 ppm * (1/8)	-
Lysozym	123 – 327 ppm	0,01 – 0,06 ppm *	-
- in Weißwein	(8/8)	(7/8)	-
- in Rotwein	27 – 38 ppm (2/2)	-	-

Positive Ergebnisse sind durch Fettschrift markiert. Die Anzahl positiver Weine X von Y untersuchten Proben ist in Klammern dargestellt (X/Y).

n.n. = nicht nachweisbar; * = semi-quantitative Gehaltsabschätzung; - = nicht untersucht

Eine weitere Limitierung der Bestimmung von Fischgelatinen und Hausenblasen in Weinen mittels ELISA wird durch die nachweisbare, wenn auch geringe Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers mit nicht kennzeichnungspflichtiger Schweinegelatine verursacht.

Hierdurch könnten Weine, die mit Schweinegelatine geschönt wurden, falsch positive Befunde an Fischgelatine oder Hausenblase verursachen. Somit eignen sich die entwickelten ELISA Methoden nur dann zum zuverlässigen Nachweis von Fischgelatinen oder Hausenblasen in Weinen, wenn der Einsatz von Säugetiergelatinen auszuschließen ist. Eine genaue Quantifizierung hingegen ist nur dann möglich, wenn das genaue Produkt bekannt ist.

Im Gegensatz zu den Fischgelatinen und Hausenblasen stellen Milch- und Eiprodukte, die zur Weinbehandlung verwendet werden, weitestgehend homologe Materialien dar. Diese werden aus gleichen Tierarten mittels ähnlicher technologischer Verfahren gewonnen und zeigen daher, trotz Verwendung unterschiedlicher Präparate, nahezu identische Reaktivitäten im ELISA. Dies konnte im Falle des Kaseinats eindrucksvoll mittels SDS-PAGE, Western-Blot und indirektem ELISA belegt werden (siehe Kapitel 4.4.4.). Somit war die Bestimmung derartiger Produkte unabhängig von dem eingesetzten Präparat sowohl in Modellweinen, als auch in Handelsweinen zuverlässig möglich. Limitierungen des ELISA, wie sie bei der Bestimmung von Fischgelatinen und Hausenblasen in Kauf genommen werden mussten, waren bei dem Nachweis von Milch- und Eiprodukten in Weinen somit nicht gegeben.

5.2. Diskussion zur chemischen Evaluierung des allergenen Potentials tierischer Proteine in Weinen

Die Ergebnisse in Tabelle 5.3. zeigen, dass Schönungsmittel in Mengen von bis zu 0,4 ppm in Weißweinen verbleiben können. Dabei scheinen die Behandlung mit Bentonit und die damit verbundene, anschließende Filtration signifikant zur Verringerung der Schönungsmittelrückstände beizutragen. Mit Ausnahme des Hühnerei-Eiklars konnten in keinen Modellweinen, die mit Bentonit behandelt wurden, Rückstände an Schönungsmitteln mittels ELISA nachgewiesen werden. Hiervon distanziert zu betrachten ist jedoch der Nachweis von Lysozym, welches unabhängig von der Behandlung mit Bentonit in nahezu allen untersuchten Modellweinen in Mengen von 0,01 – 327 ppm nachgewiesen werden konnte. Diese Befunde werden im Einzelnen in den Kapiteln 5.2.1. – 5.2.3. behandelt.

Um das allergene Potential der nachgewiesenen Schönungsmittelrückstände in Wein beurteilen zu können, ist es zunächst erforderlich, die Menge eines Allergenes zu kennen, ab welcher allergische Reaktionen beim Großteil sensibilisierter Personen auslöst werden. Allergische Reaktionen werden im Allgemeinen ab einer bestimmten Dosis eines Allergens ausgelöst. Mengen unterhalb dieser Dosis werden demnach von dem Großteil der Allergiker toleriert. Diese als „Schwellendosis“ oder „lowest-observed adverse effect level (LOAEL)“

bezeichnete Menge zu bestimmen, hat die Allergieforschung bis heute jedoch vor ein großes Problem gestellt. Die Ermittlung von repräsentativen Schwellendosen ist nur durch klinische Expositionsstudien (DBPCFC), die an einem entsprechend umfangreichen und für die jeweilige Bevölkerungsgruppe repräsentativen Panel an allergischen Patienten durchgeführt werden, möglich. Aufgrund der Heterogenität durchgeführter DBPCFC ist es seit Jahren Bestreben verschiedener Forschergruppen, klinische Expositionsstudien weltweit zu vereinheitlichen, um vergleichbare Daten an Allergie auslösenden Dosen zu erhalten und repräsentative Schwellenwerte für Allergene zu ermitteln [Taylor et al., 2002; Taylor et al., 2004]. Bei der Beurteilung geschönter Weine kommt erschwerend hinzu, dass diese in der Regel nur von Erwachsenen konsumiert werden und, wie in Kapitel 2.1.1. dargestellt, Lebensmittelallergien insbesondere gegen Kuhmilch und Hühnerei bei Erwachsenen selten sind. Daher sind, wie nachfolgend diskutiert, Schwellenwerte für Lebensmittelallergene bei Erwachsenen bisher nur von wenigen Studien beschrieben worden. Eine Festlegung repräsentativer Schwellenwerte auf Basis der derzeitigen Datenlage ist weder für Kinder, noch für Erwachsene möglich [Taylor et al. 2002]. Die Erfahrungen aus vergangenen Studien haben jedoch gezeigt, dass Schwellenwerte für die Lebensmittel Hühnerei, Kuhmilch und Fisch für die Gesamtbevölkerung im unteren Milligramm-Bereich (0,1 – 3 mg, bezogen auf den Proteingehalt) zu erwarten sind [Taylor et al., 2002; Moneret-Vautrin und Kanny, 2004]. Die wenigen Expositionsstudien mit Erwachsenen indizieren jedoch, dass für diese Bevölkerungsgruppe möglicherweise von einer höheren Toleranzschwelle im Bereich von 3 – 100 mg ausgegangen werden könnte [Lam et al., 2008; Norgaard und Bindselev-Jensen, 1992]. Auf der Basis dieser Schwellendosen werden Unsicherheitsfaktoren diskutiert, die zur Berücksichtigung intra- und interindividueller Unterschiede, sowie zur Extrapolation vom LOAEL zur Dosis, ab welcher keine allergischen Reaktionen auftreten („no observed adverse effect level; NOAEL“), herangezogen werden können. Diese Unsicherheitsfaktoren liegen in der Größenordnung zwischen 100 - 1000 [FDA, 2006; EFSA, 2004; Taylor et al, 2002].

Nach der Ermittlung von Schwellendosen für Allergene aus Hühnerei, Kuhmilch und Fisch müssen diese der Menge von Wein gegenübergestellt werden, die durchschnittlich zusammenhängend konsumiert wird und somit die kumulative Aufnahmedosis des Allergens beschreibt. Hierdurch kann das allergene Potential von Schönungsmittelrückständen und Lysozym in Weinen mittels *in vitro* Untersuchungen beurteilt werden. In diesem Zusammenhang sind verschiedene Studien publiziert worden, die in unterschiedlichen Bevölkerungsschichten den täglichen Weinkonsum beschreiben. Tabelle 5.4. gibt einen Überblick über den täglichen Weinkonsum bzw. dessen Empfehlungen in verschiedenen Ländern. Basierend auf diesen Angaben erscheint die Annahme eines maximalen zusammenhängenden Konsums von 1 L Wein eine sinnvolle Basis, um selbst Konsumspitzen beim durchschnittlichen Verbraucher abzudecken. Diese Verzehrsmenge

wurde ebenfalls in einer *in vitro* Studie von Rolland *et al.* (2008) über die Allergenität geschöner Weine zugrunde gelegt. Demzufolge liegt die Anforderung an die Empfindlichkeit analytische Systeme zur Untersuchung des allergenen Potentials geschöner Weine verallgemeinert im Bereich von wenigen mg/L (entspricht „ppm“). Bestätigend zu diesen Überlegungen wurden von Morisset *et al.* (2003) Empfindlichkeiten von 2 ppm Hühnerei (entspricht ca. 0,2 ppm Hühnerei-Eiklar-Protein) und 30 ppm Kuhmilch (entspricht ca. 0,9 ppm Kasein) vorgeschlagen. Holzhauser *et al.* (2003) forderten Nachweisgrenzen im Bereich von weniger als 5 ppm. Diesen Anforderungen konnte im Rahmen dieser Dissertation sowohl mit den entwickelten ELISA Systemen, als auch mit der HPLC-FLD Methode zur Bestimmung von Lysozym in Weinen nachgekommen werden (siehe Tabelle 5.1.).

Insgesamt ist festzustellen, dass im Rahmen dieser Dissertation für alle zu untersuchenden Schönungsmittel ausreichend empfindliche Analysemethoden zur chemischen Evaluierung des allergenen Potentials tierischer Proteine in Weinen entwickelt werden konnten. Das allergene Potential soll nachfolgend für die einzelnen Produktgruppen betrachtet werden.

Tabelle 5.4. Täglicher Weinkonsum bzw. dessen Empfehlungen in verschiedenen Nationen.

Quelle	
Gesundheitsbericht- erstattung Wien (2001)	Durchschnittlicher täglicher Weinkonsum in Wien (Österreich): Männer: 99,2 % konsumieren weniger als 0,5 L Frauen: 99,9 % konsumieren weniger als 0,5 L
Australian Bureau of Statistics (1995)	Durchschnittlicher täglicher Weinverzehr in Australien: 312 mL Wein (Maximalwert; Altersschicht: 45 – 64 Jahre)
ICAP (2005) AIM (2007)	Internationale Empfehlungen für einen moderaten täglichen Alkoholkonsum (Schätzwert für Wein): Männer: 20 – 70 g (ca. 200 – 700 mL) Frauen: 10 – 50 g (ca. 100 – 500 mL)

5.2.1. Diskussion zur chemischen Evaluierung des allergenen Potentials von Lysozym und Eiklar in Weinen

5.2.1.1. Lysozym

Lysozym wurde in 17 von 18 untersuchten Modellweinen in Mengen von 0,01 – 327 ppm mittels kompetitiv indirektem ELISA und HPLC-FLD nachgewiesen (siehe Tabelle 5.3.). Dabei konnte ein signifikanter Einfluss der Bentonit-Behandlung und der damit einhergehenden zusätzlichen Filtration beobachtet werden. Weißweine, die nach der Lysozym-Behandlung mit Bentonit geschönt wurden, wiesen bei einer Lysozym-Dosierung von 25 g/hL bis hin zur zugelassenen Höchstdosierung von 50 g/hL nur geringe Rückstände zwischen ca. 0,01 – 0,06 ppm an Lysozym auf. Der Verzicht auf die Bentonit-Behandlung bewirkte signifikant höhere Lysozym-Gehalte zwischen 123 - 327 ppm in Weißweinen und 27 – 38 ppm in Rotweinen.

Die Beurteilung des Risikos allergischer Reaktionen auf die nachgewiesenen Mengen an Lysozym in den Modellweinen gestaltete sich zunächst als schwierig, da keine Studien zu repräsentativen LOAEL bekannt waren. In weitergehenden Untersuchungen wurde daher die Evaluierung des allergenen Potentials anhand von immunologischen *in vitro* Untersuchungen mit Blutseren von Hühnerei-Allergikern, sowie *in vivo* mittels SPT durchgeführt. Hierbei ergab sich weder in den *in vitro*- noch in den *in vivo*-Tests eine Reaktivität auf Weine, welche nach der Lysozym-Behandlung mit Bentonit geschönt und zusätzlich filtriert wurden. Erst eine 100-fache Konzentrierung der Weine, welche mit der zugelassenen Höchstmenge an Lysozym von 50 g/hL Wein behandelt wurden, bewirkte detektierbare Immunreaktionen der Blutseren und eine erhöhte Reaktivität in den SPTs. Eine allergene Potenz der Weine, die nach der Lysozym-Behandlung mit Bentonit behandelt und zusätzlich filtriert wurden, konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Wie im Kapitel 2.2.1.2. beschrieben, wird Bentonit im Großteil der Weißweine zur Verhinderung proteinogener Trübungen angewendet. Die Ergebnisse in Kapitel 4.2. belegen, dass der Zusatz von Lysozym aufgrund dessen guter Löslichkeit deutlich zur Erhöhung des Bentonit-Bedarfs infolge der Erhöhung des Proteingehaltes führt. Somit indizieren diese Untersuchungen, dass die Behandlung von Weißweinen mit Lysozym wahrscheinlich keine Gefährdung für Hühnerei-Allergiker darstellt, da das Lysozym durch die höheren Bentonit-Dosagen ausgeschönt und anschließend durch Filtration abgetrennt wird. Allerdings bedarf diese Annahme klinischer *in vivo* Bestätigung in DBPCFC, welche als „goldener Standard“ in der Diagnose allergischer Reaktionen gelten [Bindslev-Jensen et al., 2004]. Die Schönung mit Kaseinat oder Hausenblase zeigte keinen nennenswerten Einfluss auf die Restmenge an Lysozym in Wein.

Anders verhält es sich für Weine, welche keiner Bentonit-Behandlung unterzogen werden oder bei denen das Bentonit möglicherweise unvollständig (z. B. durch Dekantierung anstatt durch Filtration) von dem Wein abgezogen wird. In derartigen Weißweinen wurden zwischen 34 – 73 % (123 – 327 ppm) und in den Rotweinen zwischen 8 – 11 % (27 – 38 ppm) des eingesetzten Lysozyms wiedergefunden. Somit wird zum einen deutlich, dass Rotweine gegenüber den Weißweinen ein höheres „Selbstklärungsvermögen“ besitzen und Fremdproteine daher durch Wein-eigene Polyphenole in hohem Maße präzipitiert werden. Zum anderen müssen diese Lysozym-Mengen jedoch sowohl in Rotweinen, als auch in Weißweinen als äußerst bedenklich eingestuft werden. *In vitro* als auch *in vivo* wurden deutliche Immunreaktionen bei Weiß- und Rotweinen ohne Bentonit-Behandlung beobachtet, welche eine klare allergene Potenz der Lysozym-Rückstände in Weinen belegen. Da Rotweine generell nur selten mit Bentonit behandelt werden (siehe Kapitel 2.2.1.2.) ist für diese somit eine deutliche Gefährdung für Hühnereiallergiker angezeigt. Jedoch auch Weißweine können folglich zu diesen Ergebnissen eine Gefährdung für Hühnereiallergiker darstellen, wenn diese nicht mit Bentonit behandelt werden oder dieses anschließend nur unzureichend vom Wein abgezogen wird.

5.2.1.2. Hühnerei-Eiklar

Die Rückstände von Hühnerei-Eiklar in Weinen wurden in verschiedenen Modell-Weißweinen, welche nach der Hühnerei-Eiklar-Schönung noch einer Bentonit-Behandlung unterzogen wurden, untersucht. Unter den acht untersuchten Weinen wurde für einen Wein ein positiver Befund erzielt, welcher mit einer unüblich hohen Dosierung von 20 g/hL Hühnerei-Eiklar behandelt wurde und Rückstände im Bereich der Nachweisgrenze des kompetitiven ELISA von 0,2 ppm aufwies (siehe Tabelle 5.3.). Wird diese Menge den Daten von Morisset *et al.* (2003) gegenübergestellt, welche in einer umfangreichen DBPCFC mit 123 Hühnerei-allergischen Kindern und Erwachsenen einen LOAEL von 2 mg Hühnerei-Eiklar (entspricht etwa 0,24 mg Hühnerei-Eiklar-Protein) feststellten, wäre ein Konsum von mehr als 1 L Wein notwendig, um diesen Schwellenwert zu erreichen und somit möglicherweise allergische Reaktionen auszulösen. Basierend auf den Daten von Norgaard und Bindslev-Jensen (1992), welche einen LOAEL von etwa 4 mg Hühnerei-Eiklar-Protein in einer Gruppe von 13 ausschließlich erwachsenen Hühnerei-Allergikern ermittelten, entspräche dies einem Weinkonsum von etwa 20 Litern. Somit scheint, ausgehend von diesen LOAEL und der unüblich hohen Dosierung des Hühnerei-Eiklars, kein allergenes Potential für Weißweine, welche mit Hühnerei-Eiklar und anschließend mit Bentonit behandelt wurden, angezeigt. In Weißweinen mit üblicher Dosierung an Hühnerei-Eiklar (4 - 16 g/hL) konnten, wie in Kapitel 4.1.4. dargestellt, keine Rückstände des Schönungsmittels

nachgewiesen werden. Diese Befunde werden durch klinischen Untersuchungen von Kirschner *et al.* (2009) bestätigt, welche *in vivo* weder mittels SPT noch mittels DBPCFC positive Reaktionen in fünf Hühnerei-allergischen Erwachsenen durch Konsum des in dieser Dissertation positiv getesteten Modell-Weißweines bewirken konnten. Obwohl die Verzehrsmenge in der DBPCFC mit 200 - 300 mL Wein verhältnismäßig gering war, so steht sie zumindest nicht im Widerspruch zu der Schlussfolgerung, dass Hühnerei-Eiklar-Proteine anscheinend im Wein durch Komplexierung mit Oenotanninen, sowie durch die Schönung mit Bentonit und anschließender Filtration, auf tolerierbare Mengen reduziert werden. Ein allergenes Potential Bentonit-behandelter Weine, welche den Großteil der kommerziell erhältlichen Weißweine darstellen, konnte somit weder in dieser chemischen noch in der klinischen Studie gezeigt werden. Der Vollständigkeit halber muss jedoch auf die fehlende Untersuchung von Weinen ohne Bentonit-Behandlung hingewiesen werden. Eiklar wird primär zur Verringerung der Polyphenolfraktion in Weinen, und somit insbesondere in den gerbstoffreichen Rot-, jedoch auch in Weißweinen eingesetzt. Rotweine unterliegen nur selten einer Bentonit-Behandlung (siehe Kapitel 2.2.1.2.) und auch Weißweine bedürfen nicht in jedem Falle einer Bentonit-Behandlung. Im Hinblick auf die Ergebnisse für das Lysozym (Kapitel 5.2.1.1.) und der guten Löslichkeit von Hühnerei-Eiklar sind somit größere Rückstände an Hühnerei-Eiklar in Weinen ohne Bentonit-Behandlung denkbar. Unterstrichen wird diese Annahme durch den Befund von Rolland *et al.* (2008), welche Mengen zwischen 0,4 – 1 ppm des Hauptallergens Ovalbumin in zwei kommerziellen Rotweinen nachweisen konnten. Somit ist die allergene Potenz von Hühnerei-Eiklar in der Weinbehandlung nicht vollständig geklärt. In einer DBPCFC konnten zwar keine negativen Reaktionen nach Konsum von Hühnerei oder Hühnerei-Eiklar behandelten Rotweinen in fünf erwachsenen Hühnerei-Allergikern nachgewiesen werden, jedoch muss hierbei gleichzeitig auf die geringe Verzehrsmenge von 100 mL Rotwein hingewiesen werden [Rolland *et al.*, 2006].

5.2.2. Diskussion zur chemischen Evaluierung des allergenen Potentials von Kaseinat in Weinen

Mittels indirektem ELISA konnte gezeigt werden, dass Rückstände an Kaseinat in geschönten Weißweinen zurückbleiben können. In zwei von insgesamt 16 Modell-Weißweinen, welche mit unterschiedlichen Mengen und Präparaten an Kaliumkaseinat behandelt und mittels indirektem und kompetitiv indirektem ELISA untersucht wurden, konnten Rückstände an Kaliumkaseinat in Höhe von ca. 0,2 ppm nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.4.4. und Tabelle 5.3.). Mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunfärbung konnte dabei gezeigt werden, dass α - und β -Kaseine im Wein verbleiben. Beide Weine wurden mit einer überdurchschnittlichen Kaseinat-Menge von 30 g/hL behandelt und keiner

Bentonit-Schönung mit nachfolgender Filtration unterzogen. Hingegen wurde keiner der Bentonit-geschönten Modellweine, sowie Weine, die einer üblichen Kaseinat-Dosierung unterzogen wurden, positiv auf Kaseinat getestet. Somit ist analog zum Lysozym (Kapitel 5.2.1.1.) auch für Kaseinat ein Einfluss der Bentonit-Behandlung und der damit verbundenen zusätzlichen Filtration auf die Rückstände im Wein bewiesen. Anders als das gut lösliche Lysozym besitzt Kasein bzw. Kaliumkaseinat jedoch eine schlechte Löslichkeit im Wein und führt somit, wie in Kapitel 4.4. dargestellt, zu keiner signifikanten Änderung des Bentonit-Bedarfs. Bei Weinen, die von Natur aus keiner oder nur geringer Bentonit-Behandlung bedürfen und daher auch in geringerem Umfang filtriert werden, besteht somit das Risiko erhöhter Rückstände an Kaseinat, da dieses durch den geringen Bentonit-Einsatz nicht vollständig ausgeschönt wird. Dies ist insbesondere bei Weinen, welche mit überdurchschnittlichen Dosierungen an Kaseinat behandelt wurden (> 20 g/hL), angezeigt und wird durch die Ergebnisse der Handelswein-Untersuchungen bestätigt. In drei von 61 untersuchten Handelsweinen (4,9 %) wurden Kasein bzw. Kaseinat-Rückstände in Mengen von bis zu 0,4 ppm mittels indirektem ELISA, wie in Kapitel 4.4.4. und Tabelle 5.3. dargestellt, nachgewiesen. Auch die Arbeitsgruppe Lifrani *et al.* (2009) konnten kürzlich in 13 von 400 Handelsweinen (3,3 %) positive Nachweise an Kasein erzielen, jedoch wurden keine Aussagen über Eignung und Quantität der verwendeten Methoden in der Weinmatrix getroffen. Dies gilt auch für die Ergebnisse, die von Rolland *et al.* (2008) präsentiert wurden und keine Rückstände an Milchproteinen in Weinen zeigten. Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse beider Studien bleibt somit offen.

Zur Beurteilung der allergenen Potenz der nachgewiesenen Kaseinat-Rückstände wurden auf der Basis einer umfangreichen Literaturrecherche verschiedene LOAEL für Milchproteine in erwachsenen Milchallergikern ausgewertet (siehe Kapitel 4.4.4.). Dies ermöglichte unter Einbezug von Unsicherheitsfaktoren die Abschätzung eines NOAEL von 0,9 ppm Kasein bzw. Kaseinat in Weinen. Ausgehend von diesem NOAEL scheint das allergene Potential nachgewiesener Kaseinat-Mengen in Weinen vernachlässigbar. Gleichzeitig muss jedoch auf die Unsicherheit des ermittelten NOAEL hingewiesen werden, welcher nur auf wenigen bislang publizierten Studien über LOAEL bei erwachsenen Milchallergikern beruht und beim Großteil der untersuchten Probanden für Milchproteine, und nicht speziell für das Kasein ermittelt wurde. Zudem wird die Größe anzuwendender Unsicherheitsfaktoren derzeit noch diskutiert. Das allergene Potential nachgewiesener Kaseinat-Mengen lässt sich somit durch diese *in vitro* Untersuchungen nicht vollständig ausschließen. Erste *in vivo*-Untersuchungen mittels SPT und DBPCFC in erwachsenen Milchallergikern indizieren jedoch, dass keine klinisch relevante allergische Reaktivität aus der Schönung mit Kaseinat zu resultieren scheint [Kirschner *et al.*, 2009; Rolland *et al.*, 2006]. Ob diese Befunde jedoch einem

Konsum von mehr als 100 – 300 mL Wein, wie in den DBPCFC angewandt, standhalten können, bleibt zu klären.

Neben den verschiedenen Kasein-Proteinen, die den Hauptbestandteil der Kaseinat-Schönungsmittel darstellen, konnten im Rahmen der chemischen Untersuchungen noch Rückstände von Molkeproteinen in allen untersuchten Kaseinat-Schönungsmitteln nachgewiesen werden. Molkeproteine, von denen das α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin ebenfalls potente Allergene repräsentieren, stellen im Gegensatz zu den Kaseinen leicht lösliche Proteine dar. Ein Verbleiben signifikanter Mengen an Molkeproteinen im Wein, die zum einen die positiven Ergebnisse im indirekten ELISA (Kapitel 4.4.4.) verursacht haben könnten und zum anderen eine Gefährdung für Kuhmilchallergiker darstellen könnten, konnte jedoch *in vitro* durch SDS-PAGE und Western-Blot Experimente ausgeschlossen werden. α - und β -Kaseine stellen demnach die Haupt-Milchproteine dar, die durch Kaseinat-Schönung im fertigen Wein verbleiben.

5.2.3. Diskussion zur chemischen Evaluierung des allergenen Potentials von Fischgelatine und Hausenblase in Weinen

Fischgelatinen und Hausenblasen stellen eine sehr heterogene Gruppe an Produkten dar, die sich hinsichtlich ihrer Herkunft bzw. Fischart-Komposition, sowie der Herstellungsweise unterscheiden. Entsprechend heterogen präsentierten sich diese Produkte in der chemischen Analyse. In der SDS-PAGE reichte das Spektrum von wenigen distinkten Proteinbanden bis hin zu einem unüberschaubaren Muster vieler verschiedener Polypeptide, je nach Produktart und dessen Hydrolysegrad (siehe Kapitel 4.3.4.). Entsprechend wurden sehr unterschiedliche Reaktivitäten dieser Produkte in der Immunfärbung von Western Blots, jedoch auch, wie zuvor im Kapitel 5.1. dargestellt, im indirekten ELISA erzielt.

Mittels indirektem ELISA konnten trotz hoher Empfindlichkeiten für verschiedenste Fischgelatinen und Hausenblase-Präparate (siehe Tabelle 5.1.) nur für ein Hausenblase-Präparat positive Nachweise in Weinen, die nicht mit Bentonit behandelt wurden, erzielt werden. In Weinen, die mit Bentonit behandelt wurden und entsprechend zusätzlich filtriert wurden, wurden keine Rückstände an Fischprodukten detektiert. Somit ist hinsichtlich des Einflusses der Bentonit-Behandlung und der damit verbundenen, zusätzlichen Filtration, analog zu den Präparaten aus Hühnerei, Kuhmilch und dem Lysozym (siehe Kapitel 5.2.2. und 5.2.3.), ein deutlicher Einfluss auf die Rückstände von Hausenblase im Wein festzustellen. Rückstände des einen Hausenblase-Präparates wurden im Bereich von 0,01 – 0,33 ppm in Weißweinen ohne Bentonit-Behandlung nachgewiesen (siehe Tabelle 5.3.), wobei eine durchschnittliche Dosierung der Hausenblase zu Mengen von weniger als

0,1 ppm führte. Diese Mengen lagen bei der Mehrzahl der anderen untersuchten Fischgelatinen und Hausenblase-Präparate (4 von 7) unterhalb der Nachweisgrenzen und für zwei Präparate im Bereich der Nachweisgrenze. Da die Weinmatrix zusätzlich zu einer geringen, wenn auch nicht signifikanten Verringerung der Empfindlichkeit des indirekten ELISA führte (siehe Kapitel 4.3.4.), wird verständlich, warum nur für das eine Hausenblase-Präparat mit einer sehr geringen Nachweisgrenze (0,01 – 0,02 ppm im Wein) positive Nachweise erzielt wurden. Positive Nachweise wurden auch von der Arbeitsgruppe Lifrani *et al.* (2009) in 19 von 400 Handelsweinen (5 %) erzielt, jedoch wurden keine Aussagen über Eignung und Quantität der verwendeten Methoden in der Weinmatrix getroffen.

Allergische Reaktionen gegen Fischkollagen, welches Hauptbestandteil der Fischgelatine oder Hausenblase ist, sind nicht bekannt. Somit ist gerade im Hinblick auf die geringen nachgewiesenen Rückstände von weniger als 0,4 ppm in Weißweinen kein allergenes Potential des Fischkollagens angezeigt. Dies scheint *in vivo* durch zwei verschiedene klinische Studien mit SPT und DBPCFC in erwachsenen Fischallergikern bestätigt zu werden [Kirschner *et al.*, 2009; Rolland *et al.*, 2006]. Auch bei Konsum von mehr als 100 – 300 mL Wein, wie in beiden DBPCFC angewandt, ist somit aufgrund der bisherigen Kenntnislage von keinem allergenen Potential des Fischkollagens auszugehen. Allerdings bleibt durch diese Untersuchungen ungeklärt, inwiefern mögliche Rückstände des Haupt-Fischallergens Parvalbumin in den Fischgelatinen bzw. Hausenblasen zu einer Gefährdung von Fischallergikern führen könnten, wie es zuvor in Kapitel 2.3.3. dargestellt wurde. Diese Gefährdung würde durch einen Fischkollagen-spezifischen ELISA nicht erkannt werden.

Der Nachweis von Parvalbumin in Fischgelatinen und Hausenblasen wurde ebenfalls mittels ELISA durchgeführt. Der entwickelte kompetitive ELISA zeigte eine hohe Empfindlichkeit bei der Detektion von Parvalbuminen verschiedener Fischarten, die für die Gewinnung von Fischgelatinen und Hausenblasen von Bedeutung sind. Alle untersuchten Parvalbumine wurden mit Nachweisgrenzen zwischen 0,1 – 0,5 ppm im matrixfreien System detektiert (siehe Kapitel 4.5.4.). Die Validierung der Methode mit verschiedenen Fischgelatinen und einer Fischkollagen-Matrix lieferte Ergebnisse, die der Methode eine gute Präzision und Richtigkeit bescheinigten. Der entwickelte kompetitive ELISA ist somit für die Detektion von Parvalbumin verschiedener für die Fischgelatine- und Hausenblase-Gewinnung relevanter Fischarten geeignet. Dennoch konnten in keiner der untersuchten Fischgelatinen Rückstände an Parvalbumin nachgewiesen werden. Selbst eine Fischhaut-Probe, welche als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Fischgelatine verwendet wird, wies keine detektierbaren Mengen an Parvalbumin auf. Diese Ergebnisse legen die Folgerung nahe, dass potentielle Parvalbumin-Rückstände bereits durch die Behandlung des Ausgangsmaterials signifikant reduziert werden. Zusätzlich scheint die intensive

Prozessierung, die zur Gewinnung von Fischgelatinen erforderlich ist, zur weiteren Reduzierung von Parvalbumin im Endprodukt beizutragen. Somit konnte durch diese chemischen Untersuchungen kein allergenes Potential dieser Produkte durch Rückstände von Parvalbumin gezeigt werden. Dies scheint *in vivo* durch zwei unabhängige DBPCFC mit Fischgelatine und insgesamt 33 Fischallergikern bestätigt zu werden [Hansen et al. 2004, Andre et al. 2003].

Die Untersuchung der Hausenblasen auf Rückstände von Parvalbumin ergab in der Hälfte der untersuchten Materialien nachweisbare Mengen von bis zu $414,7 \pm 30,6$ ppm. Eine Evaluierung des allergenen Potentials derartiger Mengen an Parvalbumin in Präparaten zur Weinschönung gestaltet sich derzeit jedoch als schwierig. Hausenblasen werden in Mengen von bis zu 5 g/hL in der Weinschönung verwendet. Somit könnten nach diesen Ergebnissen theoretisch bis zu 0,02 ppm an Parvalbumin in den Wein gelangen. Allerdings ist unklar, wie viel Parvalbumin tatsächlich während des Schönungsprozesses aus der Hausenblase in den Wein migriert. Weiterhin ist der Einfluss von Gerbstoffen, welche durch ihr Komplexierungsvermögen dem Proteingehalt im Wein entgegenwirken (siehe Kapitel 2.2.1.1.), auf den Gehalt an Parvalbumin im Wein ungeklärt. Somit ist die Größenordnung an Parvalbumin, welche in den Wein eingetragen werden könnte, noch offen. Jedoch liegt bereits der theoretische Gehalt von 0,02 ppm deutlich unter den Schwellendosen, welche von Taylor et al. (2002) für Fischproteine und andere Allergene zusammengetragen wurden. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass allergische Reaktionen nach dem Konsum von Weinen, welche mit Hausenblase behandelt wurden, nicht bekannt sind. In zwei unabhängigen DBPCFC mit insgesamt 13 Fischallergikern traten keine Symptome nach Konsum von 100 – 300 mL Wein auf, welche mit Hausenblasen behandelt wurden [Rolland et al., 2006; Kirschner et al., 2009]. Dies könnte indizieren, dass die Menge an Parvalbumin, welche in den Wein eingetragen wird, nicht zur Auslösung allergischer Reaktionen reicht. Allerdings muss zumindest auf die begrenzte Verzehrsmenge in den beiden DBPCFC hingewiesen werden. Insgesamt ist es derzeit aufgrund der chemischen und klinischen Kenntnislage somit nicht möglich, das allergene Potential der in den Hausenblasen nachgewiesenen Parvalbumin-Mengen für die Weinschönung abschließend zu evaluieren. Erschwerend kommt hinzu, dass klinische Daten speziell über die Menge an Parvalbumin, ab welcher allergische Reaktionen beobachtet werden, nicht bekannt sind. Ein allergenes Potential ist basierend auf diesen Ergebnissen somit nicht zweifelsfrei auszuschließen, erscheint jedoch als unwahrscheinlich.

Aufgrund der nachgewiesenen Gehalte an Parvalbumin in Hausenblasen gibt es seit wenigen Jahren das Bestreben, einen Code of Good Manufacturing Practice (GMP) zu etablieren, welcher das Ziel hat, den Gehalt an Parvalbumin in Hausenblasen zu senken [EFSA, 2007]. Über die ausreichende Effektivität dieses GMP sind derzeit keine Publika-

tionen verfügbar und so erscheint es sinnvoll, diesen Code durch geeignete Methoden, wie den im Rahmen dieser Dissertation entwickelten kompetitiven ELISA, zu überwachen.

5.3. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der verschiedenen Studien, welche im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, zeigen, dass Weine Rückstände an tierischen Schönungsmitteln in Mengen von bis zu 0,4 ppm enthalten können. Dabei weisen insbesondere Weine, welche mit überdurchschnittlichen aber dennoch in der Winzer-Praxis angewendeten Mengen an Schönungsmittel behandelt wurden, die höchsten Rückstände auf. Allerdings unterliegen diese Rückstände einem deutlichen Einfluss durch die weitere Prozessierung des Weines. So konnte für alle untersuchten Schönungsmittel eine starke Abhängigkeit deren Rückstände von der Behandlung mit Bentonit und dessen anschließendem Abzuges durch Filtration festgestellt werden. Es ist somit möglich, Rückstände allergener Schönungsmittel in Weinen durch geeignete technologische Verfahren signifikant zu reduzieren. Neben der Behandlung mit Bentonit und der Filtration könnten daher auch andere in der Winzerpraxis gängige Behandlungsmittel wie Aktivkohle, Diatomit, Kieselgur oder Metaweinsäure das Potential bergen, den Gehalt allergener Schönungsmittelrückstände in Weinen zu verringern. Unabhängig von der Prozessierung oder der Dosierung der Schönungsmittel konnte jedoch weder im Rahmen dieser Dissertation, noch in Studien anderer Arbeitsgruppen ein allergenes Potential der nachgewiesenen Schönungsmittelrückstände gezeigt werden. Gleichzeitig muss aber darauf hingewiesen werden, dass das chemisch ermittelte allergene Potential nicht unbedingt einer klinisch relevanten Gefährdung für Lebensmittelallergiker gleichzusetzen ist, welche nur *in vivo* durch klinische Expositionsstudien (DBPCFC) beurteilt werden kann. Jedoch ergab auch keine der bislang publizierten DBPCFC ein klinisch relevantes allergenes Potential der Weinschönung für Lebensmittelallergiker. Die Konsummengen an Wein in diesen DBPCFC waren allerdings begrenzt und stellten wahrscheinlich keine repräsentativen Werte für den tatsächlichen Weinkonsum dar.

Die für die Schönungsmittel erzielten Befunde lassen sich teilweise auch auf das Lysozym übertragen. Neben der Behandlung mit Bentonit scheint dabei auch die Behandlung mit Metaweinsäure einen potenten Prozessierungs-Schritt zur Reduzierung der Lysozym-Rückstände darzustellen, wie es bereits durch eine andere Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte [Weiland, 2004]. Anders als bei den Schönungsmitteln können jedoch Lysozym-behandelte Weine, welche anschließend nicht mit Bentonit prozessiert wurden, ein deutliches allergenes Potential bergen. Im Rahmen dieser Dissertation konnte somit einzig für die Behandlung mit Lysozym, nicht jedoch für die eigentliche Weinschönung ein klares allergenes Potential gezeigt werden.

Die Vielfalt an Möglichkeiten, die Rückstände allergener Schönungsmittel in Weinen durch entsprechende Prozessierungstechniken zu senken, stellt die chemische und klinische Diagnostik gleichzeitig vor ein komplexes Problem. Die Weinproduktion ist weder zwischen verschiedenen Nationen noch innerhalb gleicher Weinbauregionen standardisiert, sondern verfolgt sehr individuelle Praktiken. Prozesse wie Schönung oder Separation werden nicht einheitlich sondern in ihrer Art und Weise sehr unterschiedlich gehandhabt, wodurch die Rückstandsmengen allergener Schönungsmittel und Lysozym von Winzer zu Winzer sehr unterschiedlich sein könnten. Zur endgültigen Klärung des allergenen Potentials geschöner Weine ist es daher erforderlich, verschiedene Schönungs- und Separationspraktiken genauer zu untersuchen. Die Sicherstellung hypoallergener, nicht kennzeichnungspflichtiger Weine könnte anschließend durch Verfassung von geeigneten GMPs erreicht werden. Hinsichtlich der gesetzlichen Kennzeichnung der Schönungsmittel auf dem Weinetikett erscheint es daher derzeit zu früh, eine sichere Evaluierung der permanenten Kennzeichnungsaussetzung vorzunehmen. Nicht zuletzt wird dies ebenfalls durch die limitierte klinische Kenntnislage eingeschränkt. Diese Dissertation beschreibt einige der ersten Studien, die sich mit den Rückständen allergener Schönungsmittel und Lysozym und dem Einfluss technologischer Parameter auf diese Rückstände befassen. Weitergehende chemische und klinische Arbeiten basierend auf diesen Ergebnissen sind daher angemessen, um das allergene Potential und die Kennzeichnung abschließend beurteilen zu können. Insbesondere die Definition repräsentativer klinischer NOAEL ist zur Beurteilung dieser, aber auch vieler anderer Fragestellungen in der chemischen Diagnostik allergener Risiken unumgänglich und in Zukunft höchst wünschenswert. Basierend auf der derzeitigen chemischen und klinischen Kenntnislage und der Tatsache, dass allergische Reaktionen auf Rückstände von Schönungsmitteln in Weinen bislang nicht beobachtet wurden, erscheint ein allergenes Potential unwahrscheinlich, auch wenn derzeit das allergene Potential von Schönungsmitteln aus Hühnerei- und Kuhmilch-Proteinen, sowie der Hausenblase nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden kann. Es überrascht daher nicht, dass trotz dieser Unklarheiten im Laufe dieser Dissertation durch Erlass der EU Richtlinie 2007/68/EC die Kennzeichnung von Fischgelatine und Hausenblasen auf dem Weinetikett, basierend auf diesen und den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [EFSA, 2007], in der EU permanent ausgenommen wurde. Hingegen besteht für die Behandlung von Weinen mit Lysozym unter bestimmten Umständen ein klares allergenes Potential. Eine generelle Aussetzung der Kennzeichnung ist daher ohne weitergehende Untersuchungen und Standardisierung technologischer Verfahren zur Reduktion der Lysozymrückstände im Sinne des Verbraucherschutzes vorerst unumgänglich. In diesem Sinne wurde durch Erlass der EU-Verordnung 415/2009 eine temporäre Aussetzung der Kennzeichnung von Weinen, welche

mit Proteinen aus Kuhmilch oder Hühnereiern behandelt wurden, bis zum 31.12.2010 erlassen, um weitere wissenschaftliche Erkenntnisse zu gewinnen.

Das Streben nach hypoallergenen Weinen bzw. der permanenten Kennzeichnungsvermeidung von Schönungsmitteln ist aus zweierlei Gründen sinnvoll: Zum einen aus wirtschaftlichen Gründen, um befürchtete Umsatzeinbußen bzw. Imageschäden der Weinproduzenten zu verhindern. Zum wesentlich wichtigeren Teil jedoch, um eine unnötige Einschränkung der Lebensgewohnheiten und Lebensqualität von Lebensmittelallergikern, die Schätzungen zur Folge bis zu 4 % der erwachsenen Bevölkerung ausmachen, zu vermeiden. Wie in dieser Dissertation gezeigt wurde, ist die Kennzeichnung von Schönungsmitteln vermeidbar und eine präventive Kennzeichnung der Schönung („kann Spuren von ... enthalten“) keinesfalls sinnvoll. Diese führt aus Verbraucher-orientierter Sicht zu einer mitunter unnötigen Irritation und Verunsicherung von Lebensmittelallergikern und wird daher von Verbraucher-orientierten Organisationen zunehmend kritisiert.

6. Literatur

- AIM (Alcohol in moderation). Drinking & You. **2007**, www.aim-digest.com.
- Anderson, J. A. The clinical spectrum of food allergy in adults. *Clin. Exp. Allergy* **1991**, *21 Suppl 1*, 304-315.
- André, F., Cavagna, S., André, C. Gelatin prepared from tuna skin: a risk factor for fish allergy or sensitization? *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2003**, *103*, 17-24.
- Aulepp, H., Vieths, S. Probleme der Nahrungsmittelallergie. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **1992**, *88(6)*, 171-179.
- Australian Bureau of Statistics. National Nutrition Survey: Foods Eaten. *Statistics* **1995**, www.abs.gov.au.
- Baltes, W. *Lebensmittelchemie*, 5. Auflage, Springer Verlag: Berlin, Deutschland, **2000**.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 5. Auflage, Springer Verlag: Berlin, Deutschland, **2001**.
- Bindslev-Jensen, C., Ballmer-Weber, B. K., Bengtsson, U., Blanco, C., Ebner, C., Hourihane J., Knulst, A. C., Moneret-Vautrin, D. A., Nekam, K., Niggemann, B., Osterballe, M., Ortolani C., Ring, J., Schnopp, C., Werfel, T. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods -- position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* **2004**, *59(7)*, 690-697.
- BFR (Bundesinstitut für Risikobewertung). Allergien durch verbrauchernahe Produkte und Lebensmittel. *Stellungnahme Nr. 001/2007*, **2006**, Berlin, Deutschland.
- Burks, A. W., Laubach, S., Jones, S. M. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: Implications for future treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2008**, *121(6)*, 1344-1350.
- Camp, P., Pichler, W. J., De Weck, A. L. Allergic reactions to egg lysozyme. *N. Engl. Reg. Allergy Proc.* **1988**, *9*, 254.
- Cheyrier, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81(1S)*, 223S-229S.
- CICBAA (Circle of Clinical and Biological Investigations in Food Allergy). Frequency of allergens responsible of food allergy by adults. *CICBAA Database* **2005**, www.cicbaa.com.
- Coombs, R. R., Gell, P. G. *The classification of allergic reactions underlying disease. Clinical aspects of immunology*, Blackwell Scientific Publications: Oxford, England, **1963**.
- Crespo, J. F., Rodriguez, J. Food allergy in adulthood. *Allergy* **2003**, *58(2)*, 98-113.

- Delfini, C., Cersosimo, M., Del Prete, V., Strano, M., Gaetano, G., Pagliara, A., Ambro, S. Resistance screening essay of wine lactic acid bacteria on lysozyme: efficacy of lysozyme in unclarified grape musts. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52(7), 1861-1866.
- Dirks, C. G., Pedersen, M. H., Platzer, M. H., Bindslev-Jensen, C., Skov, P. S., Poulsen, L. K. Does absorption across the buccal mucosa explain early onset of food-induced allergic systemic reactions? *J. Allergy Clin. Immunol.* **2005**, 115(6), 1321-1323.
- EFSA. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission relating the evaluation of allergenic foods for labelling purposes. *EFSA J.* **2004**, 32, 1-197.
- EFSA. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to a notification from DWV on milk products, egg products and fish products used in the manufacture of wine pursuant to Article 6 paragraph 11 of Directive 2000/13/EC. *EFSA J.* **2005**, 185, 1-7.
- EFSA. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to a notification from brewers of Europe and BFBi on isinglass used as clarifying agent in brewing pursuant to Article 6 paragraph 11 of Directive 2000/13/EC – for permanent exemption from labelling. *EFSA J.* **2007**, 536, 1-10.
- Eigenmann, P. A. Anaphylaxis to cow's milk and beef meat proteins. *Annals Allergy Asthma Immunol.* **2002**, 89(6, Suppl. 1), 61-64.
- Elsayed, S., Apold, J. Immunochemical analysis of cod fish allergen M: Location of the immunoglobulin binding sites as demonstrated by the native and synthetic peptides. *Allergy* **1983**, 38, 449-459.
- Enrique, E., Pineda, F., Malek, T., Bartra, J., Basagana, M., Tella, R., Castello, J. V., Alonso, R., de Mateo, J. A., Cerda-Trias, T., San Miguel-Moncin, M., Monzon, S., Garcia, M., Palacios, R., Cistero-Bahima, A. Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: A randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2005**, 116(5), 1073-1079.
- FDA (U.S. Food and drug administration). Approaches to establish thresholds for major food allergens and for gluten in food. *The Center for Food Safety and Applied Nutrition* **2006**, www.cfsan.fda.gov.
- Franzke, C. *Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 3. Auflage, Behrs Verlag: Hamburg, Deutschland, **1996**.

- Frazier, R. A., Papadopoulou, A., Mueller-Harvey, I., Kisson, D., Green, R. J. Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*(18), 5189-5195.
- Frémont, S., Kanny, G., Nicolas, J. P., Moneret-Vautrin, D. A. Prevalence of lysozyme sensitization in an egg-allergic population. *Allergy* **1997**, *52*, 224-228.
- Fulcrand, H., Remy, S., Souquet, J. M., Cheynier, V., Moutounet, M. Study of wine tannin oligomers by on-line liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*(3), 1023-1028.
- Gerrard, J. W., MacKenzie, J. W., Goluboff, N., Garson, J. Z., Maningas, C. S. Cow's milk allergy: prevalence and manifestations in an unselected series of newborns. *Acta Paed. Scan.* **1973**, *234* (Suppl.), 1-21.
- Gesundheitsberichterstattung Wien. *Wiener Gesundheits- und Sozialsurvey*. Magistrat der Stadt Wien, Gesundheitsberichterstattung: Wien, Österreich, **2001**.
- Gollmick, F., Bocker, H., Grünzel, H. *Das Weinbuch*, 3. Auflage, VEB Fachbuchverlag: Leipzig, Deutschland, **1970**.
- Hamada, Y., Nagashima, Y., Shiomi, K. Identification of collagen as a new fish allergen. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*(2), 285-291.
- Hamada, Y., Nagashima, Y., Shiomi, K., Shimojo, N., Kohno, Y., Shibata, R., Nishima, S., Ohsuna, H., Ikezawa, Z. Reactivity of IgE in fish-allergic patients to fish muscle collagen. *Allergol. Int.* **2003**, *52*, 139-147.
- Hansen, T. K., Poulsen, L. K., Stahl Skov, P., Hefle, S. L., Hlywka, J. J., Taylor, S. L., Bindslev-Jensen, U., Bindslev-Jensen, C. A randomized, double-blinded placebo-controlled oral challenge study to evaluate the allergenicity of commercial, food-grade fish gelatin. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 2037-2044.
- Hayakawa, K., Linko, Y. Y., Linko, P. Mechanism and control of food allergy. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie* **1999**, *32*(1), 1-11.
- Helm, R. M., Burks, A. W. Mechanisms of food allergy. *Curr. Opin. Immunol.* **2000**, *12*(6), 647-653.
- Hoffman, D. R. Immunochemical identification of the allergens in egg white. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1983**, *71*(5), 481-486.
- Hoffmann, K. M. *Weinkunde in Stichworten*, 1. Auflage, Verlag Ferdinand Hirt: Zug, Schweiz, **1970**.

- Holzhauser, T., Mergemeier, S., Kuhn, M. Significance and detection of hidden allergens in processed foods. *Aktuel. Ernähr. Med.* **2003**, 28, 93-98.
- Host, A., Halken, S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy* **1990**, 45(8), 587-596.
- ICAP (International Center for Alcohol Policies). Drinking guidelines (updated April 2005). **2005**, www.icap.org.
- Jackson, W. F. *Food allergy*, 1. Auflage, International Life Science Institute (ILSI) Europe: Brüssel, Belgien, **2003**.
- Jansen, J. J., Kardinaal, A. F., Huijbers, G., Vlieg-Boerstra, B. J., Martens, B. P., Ockhuizen, T. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1994**, 93(2), 446-456.
- Johansson, S. G., Hourihane, J. O., Bousquet, J., Brujnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M. L., Mygind, N., Ring, J., van Cauwenberge, P., van Hage-Hamsten, M., Wuthrich, B. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* **2001**, 56(9), 813-824.
- Johansson, S. G. O., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P. S., Lanier, B. Q., Lockey, R. F., Motala, C., Ortega, M. J. A., Platts-Mills, T. A. E., Ring, J., Thien, F., Van Cauwenberge, P., Williams, H. C. Revised nomenclature for allergy for global use: report of the nomenclature review committee of the world allergy organization, October 2003. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, 113(5), 832-836.
- Kelso, J. M., Jones, R. T., Yunginger, J. W. Anaphylaxis to measles, mumps, and rubella vaccine mediated by IgE to gelatin. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1993**, 91(4), 867-872.
- Kirschner, S., Belloni, B., Kugler, C., Ring, J., Brockow, K. Allergenicity of wine containing processing aids: a double-blind, placebo controlled food challenge. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* **2009**, 19(3), 210-217.
- Kownatzki, E. Cellular and humoral elements of allergic reactions. *Immun. Infekt.* **1985**, 13, 165-170.
- Krämer, J. *Lebensmittelmikrobiologie*, 4. Auflage, Verlag Eugen Ulmer: Stuttgart, Deutschland, **2002**.
- Kreft, D., Bauer, R., Goerlich, G. *Nahrungsmittelallergene: Charakteristika und Wirkungsweisen*, 1. Auflage, Walter de Gruyter Verlag: Berlin, Deutschland, **1995**.

- Lam, H. Y., van Hoffen, E., Michelsen, A., Guikers, K., van der Tas, C. H. W., Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M., Knulst, A. C. Cow 's milk allergy in adults is rare but severe: both casein and whey proteins are involved. *Clin. Exp. Allergy* **2008**, *38*(6), 995-1002.
- Langeland, T. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. II. Antigens in hen's egg white studied by crossed immunoelectrophoresis (CIE). *Allergy* **1982**, *37*(5), 323-333.
- Lehrer, S. B., Horner, W. E., Reese, G. Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1996**, *36*(6), 553-564.
- Lichtenstein, L. W. Allergy and the immune system. *Sci. Am.* **1993**, *269*(3), 116-124.
- Lifrani, A., Dos Santos, J., Dubarry, M., Rautureau, M., Blachier, F., Tome, D. Development of animal models and sandwich-ELISA tests to detect the allergenicity and antigenicity of fining agent residues in wines. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 525-534.
- Malmheden, Y. I. Detection of inadequate labeling and contamination as causes of allergic reactions to food. *Acta Alimentaria* **2004**, *33*, 347-357.
- Moneret-Vautrin, D. A., Kanny, G. Update on threshold doses of food allergens: implications for patients and the food industry. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, *4*, 215-219.
- Morisset, M., Moneret-Vautrin, D. A., Kanny, G., Guenard, L., Beaudouin, E., Flabbee, J., Hatahet, R. Thresholds of clinical reactivity to milk, egg, peanut and sesame in immunoglobulin E-dependent allergies: evaluation by double-blind or single-blind placebo-controlled oral challenges. *Clin. Exp. Allergy* **2003**, *33*(8), 1046-1051.
- Nakayama, T., Aizawa, C., Kuno-Sakai, H. A clinical analysis of gelatine allergy and determination of its causal relationship to the previous administration of gelatin-containing acellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1999**, *103*(2), 321-325.
- Nakayama, T., Kumagai, T., Pool, V., Mootrey, G., Chen, R. T., Gargiullo, P. M., Braun, M. M., Kelso, J. M., Yunginger, J. W., Jacobson, R. M. Gelatin allergy. *Pediatrics* **2004**, *113*, 170-171.
- Norgaard, A., Bindslev-Jensen, C. Egg and milk allergy in adults. Diagnosis and characterization. *Allergy* **1992**, *47*(5), 503-509.
- OIV (Internationale Organisation für Rebe und Wein). Statistiken: Lage des weltweiten Weinbausektors im Jahr 2005. *OIV Bulletins* **2005**, www.oiv.int.

- Osterballe, M., Hansen, T. K., Mortz, C. G., Host, A., Bindslev-Jensen, C. The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults. *Ped. Allergy Immunol.* **2005**, *16*(7), 567-573.
- Pérez-Calderón, R., Gonzalo-Garijo, M. A., Lamilla-Yerga, A., Mangas-Santos, R., Moreno-Gestón, I. Recurrent angioedema due to lysozyme allergy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **2007**, *17*(4), 264-266.
- Poulsen, L. K., Hansen, T. K., Norgaard, A., Vestergaard, H., Stahl Skov, P., Bindslev-Jensen, C. Allergens from fish and egg. *Allergy* **2001**, *56* (Suppl. 67), 39-42.
- Ring, J., Brockow, K., Behrendt, H. Adverse reactions to foods. *J. Chrom. B* **2001**, *756*, 3-10.
- Rolland, J. M., Apostolou, E., Deckert, K., de Leon, M. P., Douglass, J. A., Glaspole, I. N., Bailey, M., Stockley, C. S., O'Hehir, R. E. Potential food allergens in wine: Double-blind, placebo-controlled trial and basophil activation analysis. *Nutrition* **2006**, *22*(9), 882-888.
- Rolland, J. M., Apostolou, E., de Leon, M. P., Stockley, C. S., O'Hehir, R. E. Specific and sensitive enzyme-linked immunosorbent assays for analysis of residual allergenic food proteins in commercial bottled wine fined with egg white, milk, and nongrape-derived tannins. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*(2), 349-354.
- Sakaguchi, M., Ogura, H., Inouye, S. IgE antibody to gelatine in children with immediate-type reactions to measles and mumps vaccines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1995**, *96*, 563-565.
- Sakaguchi, M., Nakayama, T., Inouye, S. Food allergy to gelatine in children with systemic immediate-type reactions, including anaphylaxis, to vaccines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1996**, *98*, 1058-1061.
- Sakaguchi, M., Yoshida, T., Asahi, T., Aoki, T., Miyatani, Y., Inouye, S. Development of IgE antibody to gelatine in children with systemic immediate-type reactions to vaccines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1997**, *99*, 720-721.
- Sakaguchi, M., Hori, H., Ebihara, T., Irie, S., Yanagida, M., Inouye, S. Reactivity of the immunoglobulin E in bovine gelatine-sensitive children to gelatins from various animals. *Immunol.* **1999**, *96*, 286-290.
- Sakaguchi, M., Toda, M., Ebihara, T., Irie, S., Hori, H., Imai, A., Yanagida, M., Miyazawa, H., Ohsuna, H., Ikezawa, Z., Inouye, S. IgE antibody to fish gelatine (type I collagen) in patients with fish allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2000a**, *106*, 579-584.
- Sakaguchi, M., Inouye, S. Systemic allergic reactions to gelatin included in vaccines as a stabilizer. *Jpn. J. Infect Dis.* **2000b**, *53*, 89-95.

- Sakaguchi, M., Inouye, S. Anaphylaxis to gelatine-containing rectal suppositories. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2001**, *108*, 1033-1034.
- Savage, J. H., Matsui, E. C., Skripak, J. M., Wood, R. A. The natural history of egg allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2007**, *120(6)*, 1413-1417.
- Shao, L., Serrano, D., Mayer, L. The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. *Seminars Immunol.* **2001**, *13(3)*, 163-176.
- Sigler, J. Der Einsatz von Lysozym in der Weinbereitung. *Der Badische Winzer* **2004**, *Juli*, 31-33.
- Taylor, S. L., Hefle, S. L., Bindslev-Jensen, C., Bock, S. A., Burks, A. W. Jr., Christie, L., Hill, D. J., Host, A., Hourihane, J. O'b., Lack, G., Metcalfe, D. D., Moneret-Vautrin, D. A., Vadas, P. A., Rance, F., Skrypec, D. J., Trautman, T. A., Yman, I. M., Zeiger, R. S. Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *J. Allergy Clin. Immunol.* **2002**, *109(1)*, 24-30.
- Taylor, S. L., Hefle, S. L., Bindslev-Jensen, C., Atkins, F. M., Andre, C., Bruijnzeel-Koomen, C., Burks, A. W., Bush, R. K., Ebisawa, M., Eigenmann, P. A., Host, A., Hourihane, J. O'B., Isolauri, E., Hill, D. J., Knulst, A., Lack, G., Sampson, H. A., Moneret-Vautrin, D. A., Rance, F., Vadas, P. A., Yunginger, J. W., Zeiger, R. S., Salminen, J. W., Madsen, C., Abbott P. A consensus protocol for the determination of the threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *Clin. Exp. Allergy* **2004**, *34(5)*, 689-695.
- Troost, G. *Handbuch der Kellerwirtschaft 1: Technologie des Weines*, 4. Auflage, Verlag Eugen Ulmer: Stuttgart, Deutschland, **1972**.
- Untersmayr, E., Jensen-Jarolim, E. Mechanism of type I food allergy. *Pharm. Therap.* **2006**, *112*, 787-798.
- Vally, H., Thompson, P. J. Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. *Add. Biol.* **2003**, *8(1)*, 3-11.
- Vogt, E., Ludwig, J., Lemperle, E., Weiss, E. *Der Wein*, 6. Auflage, Verlag Eugen Ulmer: Stuttgart, Deutschland, **1974**.
- Wahl, R., Kleinhans, D. IgE-mediated allergic reactions to fruit gums and investigation of cross-reactivity between gelatine and modified gelatine-containing products. *Clin. Exp. Allergy* **1989**, *19*, 77-80.
- Wal, J. M. Cow's milk allergens. *Allergy* **1998**, *53(11)*, 1013-1022.
- Wal, J. M. Bovine milk allergenicity. *Annals Allergy Asthma Immunol.* **2004**, *93 (5, Suppl. 3)*, S2-S11.

- Walker, D. M. Oral mucosal immunology: an overview. *Ann. Acad. Med. Singapore* **2004**, *33* (4 Suppl.), 27-30.
- Walsh, B. J., Hill, D. J., Macoun, P., Cairns, D., Howden, M. E. H. Detection of four distinct groups of hen egg allergens binding IgE in the sera of children with egg allergy. *Allergol. Immunopathol.* **2005**, *33*(4), 183-191.
- Wang, J., Sicherer, S. H. Anaphylaxis following ingestion of candy fruit chews. *Annals Allergy Asthma Immunol.* **2005**, *94*, 530-533.
- Weiland, J. Gärstörung: Bakterienkontrolle durch Lysozym. *Das Deutsche Weinmagazin* **2004**, *22*, 24.
- Wopfner, N., Dissertori, O., Ferreira, F., Lackner, P. Calcium-binding proteins and their role in allergic diseases. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* **2007**, *27*(1), 29-44.
- Yunginger, J. W., Sweeney, K. G., Sturner, W. Q., Giannandrea, L. A., Teigland, J. D., Bray M., Benson, P. A., York, J. A., Biedrzycki, L., Squillace, D. L., Helm, R. M. Fatal food-induced anaphylaxis. *J. Am. Med. Assoc.* **1988**, *260*, 1450-1452.
- Zuberbier, T., Edenharter, G., Worm, M., Ehlers, I., Reimann, S., Hantke, T., Roehr, C. C., Bergmann, K. E., Niggemann, B. Prevalence of adverse reactions to food in Germany - a population study. *Allergy* **2004**, *59*(3), 338-345.

7. Zusammenfassung

Tierische Proteine werden seit hunderten von Jahren in der Produktion von Weinen eingesetzt. In einem Prozess, der als *Schönung* bezeichnet wird, dienen sie der Verhinderung von Trübungen, sowie der Ausformung und Verfeinerung des Weincharakters durch Adsorption unerwünschter Stoffe. Hierfür werden Schwimmblasen verschiedener Fische, Kuhmilch- oder Hühnereiproteine eingesetzt. In neuerer Zeit haben jedoch auch Fischgelatinen, sowie das zur Kontrolle der Mikroflora geeignete Enzym *Lysozym*, welches aus Hühnerei-Eiklar gewonnen wird, in der Weinherstellung an Bedeutung gewonnen.

Obwohl für die Verwendung tierischer Proteine in der Weinproduktion keinerlei negative Auswirkungen auf die Gesundheit des Verbrauchers bekannt sind, sind diese in den letzten Jahren durch den Erlass verschiedener rechtlicher Regelungen in der Europäischen Union (EU), Australien, Neuseeland, Japan und den USA in den Fokus des Interesses gerückt. Diese Regelungen verfolgen den Zweck der Kennzeichnung allergener Stoffe auf Lebensmitteln, wozu auch die in der Schönung eingesetzten tierischen Proteine aus Fisch, Kuhmilch und Hühnerei gehören. Allerdings gilt ein allergenes Potential durch Schönungsmittel tierischer Herkunft im Wein aus wissenschaftlicher und technologischer Sicht als zweifelhaft, da Schönungsmittel mit den zu entfernenden Substanzen zu unlöslichen Verbindungen reagieren, welche im Laufe der Weinproduktion präzipitieren und aus dem Wein durch geeignete Maßnahmen entfernt werden. Zudem wirken weitere Behandlungsmethoden wie die Schönung mit Bentoniten, die der Vermeidung proteinogener Trübungen in Weinen dient, dem Proteingehalt in Weinen entgegen. Der Sinn der Weinkennzeichnung gilt somit als zweifelhaft und eine unnötige Verunsicherung und Irritation des Verbrauchers durch die Kennzeichnung derartiger Stoffe auf Weinen wird befürchtet. Aus Verbraucher-orientierter Sicht würde eine unter Umständen überflüssige Kennzeichnung zudem mit einer unnötigen Einschränkung der Lebensgewohnheiten und Lebensqualität von Lebensmittelallergikern einhergehen.

Da keine wissenschaftlichen Erkenntnisse über Rückstände allergener, tierischer Proteine in Weinen vorlagen, war es Ziel dieser Dissertation, Methoden zur Bestimmung von Schönungsmitteln auf der Basis von Fisch-, Milch- und Eiproteinen, sowie dem Hühnerei-Allergen Lysozym, in Weinen zu entwickeln und deren allergenes Potential zu evaluieren. Hierzu hat sich in der Proteinanalytik der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) fest etabliert. Als Hilfsmittel wurde die *Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese* (SDS-PAGE) in Verbindung mit verschiedenen Färbemethoden und Western-Blotting angewendet. Hierdurch war es möglich, die Schönungsmittel hinsichtlich ihrer Proteinkomposition und ihrer Antigenität genauer zu charakterisieren. Für die Bestimmung

des Lysozyms wurde neben dem ELISA die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) in Verbindung mit einer empfindlichen Fluoreszenzdetektion angewendet.

Im Rahmen dieser Dissertation gelang es, empfindliche, präzise und richtige Nachweismethoden zu entwickeln, mit welchen alle untersuchten Schönungsmittel und das Lysozym mit Nachweisgrenzen zwischen 0,01 – 1,1 ppm in Weinen detektiert werden konnten. Mit Hilfe dieser Methoden wurden verschiedene Modell- und Handelsweine untersucht, welche Rückstände an tierischen Schönungsmitteln in Mengen von bis zu 0,4 ppm aufwiesen. Dabei wurden insbesondere in Weinen, welche mit überdurchschnittlichen aber dennoch in der Winzer-Praxis angewendeten Mengen an Schönungsmittel behandelt wurden, die höchsten Rückstände an Schönungsmitteln nachgewiesen. Diese Rückstände unterlagen allerdings einem deutlichen Einfluss durch die weitere Prozessierung des Weines. So konnte für alle untersuchten Schönungsmittel eine starke Abhängigkeit der Rückstände von der Behandlung mit Bentonit und dessen anschließendem Abzug durch Filtration festgestellt werden. Es ist somit möglich, Rückstände allergener Schönungsmittel durch geeignete technologische Verfahren signifikant zu reduzieren. Unabhängig von der Prozessierung oder der Dosierung der Schönungsmittel konnte jedoch kein allergenes Potential für die in Weinen nachgewiesenen Schönungsmittelrückstände gezeigt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen, denen anderer Arbeitsgruppen und der Tatsache, dass allergische Reaktionen auf Rückstände von Schönungsmitteln in Weinen bislang nicht beobachtet wurden, erscheint ein allergenes Potential in Weinen durch die Schönung mit tierischen Proteinen somit unwahrscheinlich. Eine Kennzeichnung von Schönungsmitteln auf Weinen wird durch diese Studien somit nicht unterstützt, auch wenn das allergene Potential nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden konnte.

Die Befunde für die Schönungsmittel lassen sich teilweise auf das Lysozym übertragen. So stellt auch hier die Behandlung mit Bentonit und dessen anschließende Abtrennung durch Filtration einen potenten Prozessierungs-Schritt zur Reduzierung der Lysozym-Rückstände dar. Anders als bei den Schönungsmitteln wurden jedoch in Lysozym-behandelten Weinen, welche anschließend nicht mit Bentonit prozessiert wurden, Rückstände von bis zu 327 ppm nachgewiesen. Für diese Rückstände konnte *in vitro* und *in vivo* ein deutliches allergenes Potential diagnostiziert werden. Bentonit-prozessierte Weine hingegen wiesen nur Gehalte von maximal 0,06 ppm Lysozym auf, für welche kein allergenes Potential festgestellt werden konnte. Somit konnte für die Behandlung mit Lysozym, nicht jedoch für die eigentliche Schönung unter bestimmten Umständen ein klares allergenes Potential gezeigt werden. Eine Kennzeichnung von Lysozym ohne weitergehende Untersuchungen und Standardisierung technologischer Verfahren zur Reduktion der Lysozymrückstände ist im Sinne des Verbraucherschutzes somit vorerst unumgänglich.

8. Summary

Proteins derived from animals are used in the production of wines since many centuries. They serve for the removal of haze and for the development and improvement of the wine's character due to the adsorption of undesired substances. This process is known as *fining*. Traditionally, proteins derived from bovine milk and hen's egg as well as swim bladders from various fishes are used as fining agents. However, further materials such as fish gelatine have recently been introduced and the hen's egg derived enzyme lysozyme has been allowed for the microbial control of the wine production since some years.

Until now, no impairment of the consumer's health has been reported as a result of the fining with animal proteins. Nevertheless, these fining agents are currently in the spotlight of interest due to the introduction of new labeling rules within the European Union, Australia, New Zealand, Japan, and the USA. According to these labeling rules, fining agents must be indicated on the respective food package because they are derived from allergic foods, such as fish, milk, and hen's egg. No evidence exists that fining agents actually remain in the wine because they react with wine components to insoluble compounds that are removed from the wine during the fining process. Furthermore, additional processing steps such as the treatment with bentonite, a strong adsorbent for proteins that is used for the prevention of proteinogenic haze, may contribute to the removal of fining agents from the wine. Thus, the application of the labeling rules to wines is doubtfully discussed from the scientific and technological point of view. An unjustified wine labeling could lead to uncertainty, irritation, and deterrence of the consumer and would lead to an avoidable limitation of the habits and the quality of life of consumers allergic to foods.

The objective of this dissertation was the development of methods for the determination of fining agents derived from allergenic foods and lysozyme in wines and the evaluation of their allergenic potential. Therefore, the *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) is a well-known and commonly used method that was applied in these studies. *Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamide gel-electrophoresis* (SDS-PAGE) in combination with different staining methods and Western-Blotting was additionally applied to characterize the composition and antigenicity of the various fining agents. Furthermore, high performance liquid chromatography (HPLC) in combination with a sensitive fluorescence detection was used for the determination of lysozyme in wines beside the ELISA.

Sensitive, precise, and accurate methods were developed and were capable to detect traces of all investigated fining agents in wines. Limits of decision were found to be between 0.01 – 1.1 ppm. The investigation of various experimental and commercial wines revealed residues of animal fining agents of up to 0.4 ppm. Thereof, wines that were fined with excessive but commercially applied dosages of fining agents showed the highest residues. All these

residues were found to be in strong relation to the further wine processing. Processing with bentonite and the subsequent bentonite removal by filtration led to a significant decrease of fining agent residues in the finished wines. Thus, it is possible to reduce the amounts of allergenic fining agents by technological processing. However, an allergic potential of the detected fining agent residues was not recognized regardless of which fining agent dosage or wine processing was applied. Consequently, an allergic potential of wines due to the fining process appears unlikely based on these and other studies, as well as due to the fact that adverse reactions caused by fining agent residues in wines have not been reported. Thus, the labeling of fining agents on wines is not supported by these studies even though the allergic potential could not be fully excluded.

Most of the results that were achieved for the fining agents were transferable to lysozyme. The processing with bentonite and the subsequent bentonite removal by filtration appear to be proper methods for the significant decrease of residual lysozyme in wines. Anyhow, wines that were treated with lysozyme but not with bentonite revealed residues of lysozyme of up to 327 ppm. These residues showed a clear allergic potential *in vitro* and *in vivo*. Contrarily, wines that were treated with lysozyme and bentonite showed amounts of maximal 0.06 ppm lysozyme with no detectable allergic potential in *in vitro* and *in vivo* tests. Consequently, lysozyme was the only investigated material that was proven to present a clear allergic potential for persons allergic to foods. Labeling of lysozyme without further research and standardization of technological processes, in order to reduce the residues of lysozyme in wines and to assure the consumer's safety, is inevitable for the present.

9. Anhang

9.1. Liste verwendeter Chemikalien

Stoffbezeichnung	Gefahrenmerkmale (R-Sätze)	Sicherheitsratschläge (S-Sätze)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Xi, R36/37/38	S26-36
4-Morpholinethansulfonsäure	Xi, R36/37/38	S26-36
Aceton	F, Xi, R11-36-66-67	S 9-16-26
Acetonitril	F, Xn, R11-R20/21/22-36	S 16-36/37
Ameisensäure	C, R 35	S 23-26-45
Calciumchlorid	Xi, R 36	S 22-24
Natriumdioctylsulfosuccinat	Xn, R 22-38-41-22-41-38	S 26-39
Ethylendiamintetraessigsäure	Xi, R36-52/53	S 26-61
Ethanol	F, R11	S 7-16
Formaldehyd	T, R 23/24/25-34-40-43	S 26-36/37/39-45
Kaliumhydroxid	C, R22-35	S 26-36/37/39-45
Methanol	F, T, R11-23/24/25 -39	S 7-16-36/37-45
Natriumazid	T+, N, R 28-32-50/53	S 28-60-45-61
Natriumcarbonat	Xi, R36	S 22-26
Natriumdodecylsulfat	F, Xn, R11-21/22-36/37/38	S 26-36/37
Natriumhydroxid	C, R35	S 26-37/39-45
o-Phosphorsäure, 85 %	C, R34	S 26-45
Ponceau rot	Xn, R40	S 36
Salzsäure, 37 %	C, R 34-37	S 26-36/37/39-45
Schwefelsäure,95-99 %	C, R 35	S 26-30-45
Trichloressigsäure	C, N, R35-50/53	S 26-36/37/39-45-60-61
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Xi, R36/37/38	S 26-36
Wasserstoffperoxid, 30 %	Xn, R 22-41	S 26-39
Zitronensäure-Monohydrat	Xi, R41	S 26-39

9.2. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Patrick Weber, an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel „Chemische Evaluierung des allergenen Potentials tierischer Proteine in Weinen durch immunologische, elektrophoretische und chromatographische Verfahren“ selbstständig und allein von mir unter den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde.

Hamburg, den 15. November 2009

Patrick Weber

9.3. Lebenslauf

- **Persönliche Angaben**

Name Patrick Weber
 Geburtsdatum: 20. Februar 1979
 Geburtsort: Hamburg

- **Ausbildung**

Studium

Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. Steinhart, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg	2005 - 2010
Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. Steinhart, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg	2004 - 2005
Studium der Lebensmittelchemie, Universität Hamburg	2000 - 2005

Schule

Gymnasium Rahlstedt (Abschluss: Abitur), Hamburg	1989 - 1998
Grundschule Am Heegen, Hamburg	1985 - 1989

- **Akademische Abschlüsse**

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)	2010
Zweites Staatsexamen in Lebensmittelchemie	2010
Erstes Staatsexamen in Lebensmittelchemie	2005
Diplom in Lebensmittelchemie	2005

- **Berufliche Tätigkeiten:**

Praktikant in der Analytik und rechtlichen Beurteilung von Lebensmitteln, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen, Institut für Hygiene und Umwelt der freien und Hansestadt Hamburg	2009
Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg	2005 - 2009
Selbstständige Tätigkeit im Bereich Import, Einzel- und Großhandel, Hamburg	seit 2004
Hilfswissenschaftler in der Analytik von Aromastoffen mittels GC/MS, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg	2004

Hilfswissenschaftler in der Analytik von Körperfetten mittels GC/FID, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg 2003

9.4. Liste der Publikationen

Weber, P., Steinhart, H., Paschke, A. Investigation of the allergenic potential of wines fined with various proteinogenic fining agents by ELISA. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55(8)*, 3127-3133.

Weber, P., Steinhart, H., Paschke, A. Allergenic potential of fining agent residues in German wines related to their dosage and an ordinary bentonite treatment. *Agro Food Industry Hi-Tech* **2007**, *18(5)*, 22-24.

Kleeberg, K. K., Dobberstein, D., Hinrichsen, N., Müller, A., Weber, P., Steinhart, H. Sampling procedures with special focus on automatization. In: *Advances in food diagnostics*, 1. Auflage, Nollet, L. M., Toldra, F., Hui, Y. H. Blackwell Publishing: Chichester, UK, **2007**; 253-293.

Weber, P., Kratzin, H., Brockow, K., Ring, J., Steinhart, H., Paschke, A. Lysozyme in wine: a risk evaluation for consumers allergic to hen's egg. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 1469-1477.

Weber, P., Steinhart, H., Paschke, A. Characterization, antigenicity, and detection of fish gelatine and isinglass used as processing aids in wines. *Food Addit. Contam.* **2010**, *27(3)*, 273-282.

Weber, P., Steinhart, H., Paschke, A. Determination of the bovine food allergen casein in white wines by quantitative indirect ELISA, SDS-PAGE, Western Blot, and Immunostaining. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57(18)*, 8399-8405.

Weber, P., Paschke, A. Fish allergens. In: *Chemical and biological properties of food allergens*, 1. Auflage, Jedrychowski, L., Wicher, J. Taylor and Francis Group: London, UK, **2009**; 223 – 232.

Weber, P., Steinhart, H., Paschke, A. Allergenic potential of wines fined with various proteins. *Euro Food Chem XV Proceeding* **2009**, *1*, 238-241.

Weber, P. Detektion von Allergenen mittels ELISA – Methode zur Bestimmung von Molkenproteinen. In: *Lebensmittelanalytik*, 4. Auflage, Matissek, R., Steiner, G., Fischer, M. Springer Verlag: Berlin, Deutschland, **2010**; 115-118.

Weber, P., Steinhart, H., Paschke, A. Competitive indirect ELISA for the determination of parvalbumins from various fish species in food grade fish gelatins and isinglass with PARV-19 anti-parvalbumin antibodies. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11328-11334.

9.5. Liste der Vorträge

Weber, P., Steinhart, H., Paschke, A. Bestimmung von Rückständen allergener Schönungsmittel in Weinen mittels kompetitivem ELISA. GDCh Regionalverbandstagung Nord, Hannover, Deutschland, 2007.

Weber, P. Nachweis von allergenen Stoffen in Wein. 4. Anwendertreffen Weinanalytik, Weinsberg, Deutschland, 2008.

Weber, P., Paschke, A. Investigation of the allergenic potential of wines fined with various proteinogenic fining agents by ELISA, Western-blot, and skin prick tests. 10th International symposium on immunological, chemical, and clinical problems of food allergy, Parma, Italien, 2008.

Weber, P. Kennzeichnung und Nachweis allergener Schönungsmittel in der Weinherstellung. Erbslöh Oeno-Seminar Jungwein 2008, Wiesloch, Deutschland, 2008.

9.6. Liste der Poster

Weber, P., Steinhart, H., Paschke, A. Allergenes Potenzial eiweißgeschönter Weine. 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, Deutschland, 2006.

Weber, P., Steinhart, H., Paschke, A. Lysozym in Wein: Ein Risiko für Lebensmittelallergiker? 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Nürnberg, Deutschland, 2007.

Moulliet, C., Prêtet-Lataste, C., Berger, J. L., Lifrani, A., Dubarry, M., Tomé, D., Paschke, A., Weber, P., Fradera, C., Caillet, M. M. Detection and quantification of residues of fining agents containing egg, milk, or fish in wines with two ELISA methods. 31. World congress of vine and wine and 6th general assembly of the O.I.V., Verona, Italien, 2008.

Weber, P., Steinhart, H., Paschke, A. Das allergene Potential von Lysozym in Wein. 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Kaiserslautern, Deutschland, 2008.

Weber, P., Steinhart, H., Paschke, A. Allergic potential of wines fined with various proteins.
Euro Food Chem XV, Kopenhagen, Dänemark, 2009.