

---

## 6 Zusammenfassung - Summary

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine umfassende Studie über das allergene Potential der Mango und der Litchi. Beide exotischen Früchte finden beim europäischen Verbraucher eine kontinuierlich steigende Akzeptanz und werden aufgrund ihrer ganzjährigen Verfügbarkeit zunehmend verzehrt.

Das allergene Potential der aus nativen sowie aus behandelten Früchten gewonnenen Proteinextrakte erfolgte mittels etablierter elektrophoretischer und immunologischer Verfahren. Zur immunochemischen Detektion wurde ein Poolserum eines Patientenkollektivs, bestehend aus Probanden mit einer Sensibilisierung gegen Mango und/oder Litchi (EAST-Klasse  $\geq 2$ ), zusammengestellt.

Als Hauptallergene der **Mango** konnten die bereits in der Literatur beschriebenen IgE-bindenden Proteine mit MG von 40 und 30 kDa (Man i 1 und 2), diverse Minorallergene im MG-Bereich zwischen 25 und 94 kDa sowie bei 14 und 16 kDa charakterisiert werden.

Die Untersuchungen der thailändischen Mangovarietäten „Choke Anan“, „Kaew“, „Nam Dok Mai“, „Nang Klang Wan“ sowie der Sorten „Tommy Atkins“ und „Kent“ aus Brasilien, „Keitt“ aus Mexiko und „Eden“ aus Israel ergaben unabhängig von ihrer Herkunft ein nahezu identisches Allergenmuster mit einem vergleichbaren allergenen Potential.

Die Untersuchung von vier verschiedenen Fruchtfleischfraktionen aus drei unterschiedlichen vollreifen Mangosorten ergab eine homogene Verteilung der IgE-bindenden Proteine mit ähnlicher allergener Aktivität. Ferner wurden die Früchte im Verlauf ihres Reifeprozesses über einen Zeitraum von acht Tagen (Reifestadium: „mature green“ bis „vollreif“) untersucht, wobei kein Einfluß des Reifegrades auf das allergene Potential beobachtet werden konnte. Sowohl im IB als auch mittels EAST-Inhibition konnten keine signifikanten Veränderungen der Allergenität nachgewiesen werden.

Die Charakterisierung der Allergene aus dem Meso- und Perikarp der Mango ergaben ein identisches Protein- bzw. Allergenmuster. Mittels EAST-Inhibition konnte eine vergleichbare allergene Potenz der IgE-bindenden Proteine nachgewiesen werden. Die  $pI$  der Allergene aus der Schale sowie des Fruchtfleisches lagen überwiegend im sauren pH-Bereich. Ferner konnten die niedermolekularen Allergene mit MG von 14 und 16 kDa in beiden Fruchtteilen unter Verwendung eines gegen rekombinantes Birnenprofilin gerichteten Antikörpers als Profiline identifiziert werden.

Die Mangoallergene wiesen gegenüber technologischen Verarbeitungsprozessen eine sehr hohe Stabilität auf. In den Extrakten der im Trockenschrank (bis zu 90 min bei 105 °C), im Autoklaven (bis zu 30 min bei 121°C), im Schnellkochtopf (bis zu 30 min) sowie in der Mikrowelle (bis zu 5 min bei 900 W) erhitzten Mangos konnte kein signifikanter Allergenitätsverlust festgestellt werden. In den an der UH hergestellten fluiden und festen Mangoerzeugnissen konnte unabhängig von den Prozeßparametern Erhitzungszeit und -temperatur, Enzymierung und mechanischer Zerkleinerung ein allergenes Restpotential verifiziert werden. Insbesondere zeigten die beiden Hauptallergene sowie die Profiline eine hohe Thermostabilität. Lediglich im „Mangoleder“ – ein getrocknetes

---

Mangopüree – wurde sowohl im IB als auch in der EAST-Inhibition eine leichte Abnahme der Allergenität gefunden. Diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchung handelsüblicher Produkte (Fruchtsaftgetränke, Pürees & Trockenprodukte) bestätigt.

Die in-vitro Verdauung der Mango ergab unter Verwendung von Enzymen des Gastrointestinaltraktes einen Abbau der IgE-bindenden Proteine mit MG >50 kDa. Parallel hierzu konnte durch die Inkubation der zuvor pepsinverdauten Früchte mit Chymotrypsin, Trypsin sowie Pancreatin eine Bildung von Proteinfragmenten mit allergener Aktivität beobachtet werden. Die Hauptallergene Man i 1 und 2 zeigten sich gegenüber der in-vitro Verdauung persistent.

34 von 38 der zur Verfügung stehenden Patientenseren wiesen spezifisches IgE gegen ein Protein der Litchi mit einem MG von 55 kDa auf. Neben diesem vermutlich als Hauptallergen einzuordnenden IgE-bindenden Protein konnten weitere Allergene mit MG von 14 kDa, 20 kDa, 24 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 42 sowie  $\geq 67$  kDa charakterisiert werden.

Die Untersuchung der sieben Litchivarietäten „Kuang Chao“, „Bai Dum“, „Chacapat“, „Hong Huey“ (alle aus Thailand), „Mauritius“, „Cope“ (beide Südafrika) und einer unbekanntem Sorte aus Madagaskar ergaben keine Sortenabhängigkeit des allergenen Potentials. Sowohl im IB als auch in den IB- und EAST-Inhibitionen konnte ein analoges Spektrum der IgE-bindenden Proteine mit vergleichbarer allergener Aktivität verifiziert werden.

Die eingehende Charakterisierung der Allergene des Meso- und Perikarps verdeutlichte signifikante Unterschiede zwischen beiden Fruchtteilen. Die Schale zeigte im Gegensatz zum Fruchtfleisch im Allergenmuster IgE-bindende Proteine mit MG von 16 kDa, 18 kDa, 22 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 80 und 100 kDa. Mittels IB- bzw. EAST-Inhibitionen konnten diese Differenzen bestätigt sowie eine höhere allergene Aktivität der Schale gegenüber dem Fruchtfleisch nachgewiesen werden. Die pI der visualisierten Allergene lagen ähnlich der Mango im sauren pH-Bereich, wobei in der Litchischale hauptsächlich pI-Werte unterhalb 3.5 gefunden wurden. Ferner wurden im Mesokarp der Litchi unter Verwendung eines Anti-Birnenprofilin-Antikörpers vier potentielle Profiline nachgewiesen. Im Profilinblot konnten Banden bei 14 und 12 kDa sowie eine Doppelbande bei 7 kDa detektiert werden. In der Schale wurde kein Profilin identifiziert.

Weiterhin konnte eine 89 %ige Sequenzhomologie des isolierten 40 kDa Allergens aus dem Arillus mit der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase aus weißem Senf ermittelt werden.

Die Untersuchungen zur Kreuzreaktivität der Litchi zu einheimischen Baum- und Gräserpollen sowie zu birkenpollenassoziierten Lebensmitteln erfolgte anhand von Extrakten aus Apfel, Karotte, Kartoffel, Haselnuß, Sellerie und Mango sowie Beifußpollen. Das 35 kDa Allergen sowie das 14 kDa Profilin zeigten in den IB- und EAST-Inhibitionen ein besonders prägnantes kreuzreaktives Potential. Sämtliche Obst/Gemüse/Pollen-Extrakte vermochten das Allergenspektrum der Litchi eindeutig zu inhibieren, lediglich die Haselnuß zeigte eine ausschließliche Inhibition des 35 kDa Allergens. Die Litchiallergene implizierten durch ihr Inhibitionsverhalten eine starke kreuzreaktive Potenz zur Mango, Kartoffel sowie zum Sellerie, dagegen eine etwas schwächer ausgeprägte

---

Kreuzreaktivität zur Haselnuß, zur Karotte sowie zu den Beifußpollen. Ferner konnte keine Kreuzreaktivität der Litchi mit dem Hauptallergen des Apfels nachgewiesen werden.

Analog zu den Ergebnissen der Mango zeigten auch die Litchiallergene eine hohe Stabilität gegenüber thermischen Behandlungen. Die Erhitzung im Autoklaven für 30 Minuten bei 121 °C führte zu keiner Veränderung des Protein- bzw. Allergenmusters sowie zu keiner Abnahme der allergenen Potenz im Vergleich zur nativen Frucht. Die an der UH definiert hergestellten Konserven mit Pasteurisationszeiten bis 20 Minuten wiesen eine Stabilität der IgE-bindenden Proteine mit MG von 14 kDa, 40 kDa, 42 kDa, 55 und 94 kDa auf, die auch gegenüber einer Lagerung von 12 Monaten unverändert blieb. In den EAST-Inhibitionen konnte eine leichte Abnahme der allergenen Aktivität ab einer Pasteurisationsdauer von 10 Minuten festgestellt werden. In einer sterilisierten Variante konnte lediglich das 55 kDa Allergen detektiert und eine korrelierende Schwächung des allergenen Potentials beobachtet werden. In den Handelsprodukten sowie den thailändischen Konserven wurde ebenfalls ein allergenes Restpotential ermittelt. Ferner konnte kein Einfluß des Gefrier-Tau-Prozesses auf die Allergenität der Litchis nachgewiesen werden. Sämtliche untersuchten TK-Waren wiesen ein der nativen Frucht vergleichbares IgE-bindendes Proteinmuster mit unveränderter allergener Potenz auf. Weiterhin zeigte sich die Aktivität der Litchiallergene resistent gegenüber einem enzymatischen Schälverfahren.

Die proteolytische Behandlung des Litchifruchtfleisches führte bereits unter Inkubation mit Pepsin zu einer Hydrolyse der Allergene. Lediglich zwei IgE-bindende Proteine mit MG von 14 und 55 kDa überstanden die simulierte Magenverdauung. Die Inkubation mit Enzymen des Intestinaltraktes führten zu einem vollständigen Abbau des Allergenspektrums sowie zur Bildung niedermolekularer Proteinfragmente. Während im Immunoblot keine Banden mehr detektiert wurden, konnte mittels EAST-Inhibition noch ein allergenes Restpotential nachgewiesen werden.

Sowohl die Mango- als auch die Litchiallergene zeigten eine hohe Stabilität gegenüber der technologischen Verarbeitung insbesondere gegen thermische Einflüsse. Die Untersuchungen der in-vitro Verdauung ergaben eine im Vergleich zu den Litchiallergenen höhere Persistenz der Mangoallergene gegenüber proteolytischen Enzymen. Während bei der Litchi signifikante Unterschiede zwischen den IgE-bindenden Proteinen des Perikarps und des Arillus beobachtet wurden, konnte in der Mango in beiden Fruchtteilen ein ähnliches allergenes Potential nachgewiesen werden. Eine Sortenabhängigkeit der Allergenität konnte weder bei der Mango noch bei Litchi gefunden werden. Zusätzlich zeigt die Litchi eine ausgeprägte Kreuzreaktivität mit einheimischen Gräserpollen und birkenpollenassoziierten Lebensmitteln.

The aim of the present study was a detailed investigation of the allergenicity of mango and lychee. Both exotic fruits are increasingly accepted by the consumer due to their continuous availability over the whole season.

The allergenic potentials of native and treated fruit protein extracts were determined by means of common electrophoretic and immunologic methods. The immunochemical detection was carried

---

out using a pooled serum from patients with a sensitisation to mango and/or lychee (EAST-classes  $\geq 2$ ).

Two proteins with molecular weights (MW) of 40 and 30 kDa (Man i 1 and 2) were characterised as the major allergens of mango fruit, furthermore various minor allergens with MWs between 25 and 94 kDa as well as between 14 and 16 kDa were detected.

The investigation of eight mango cultivars - "CA", "Kaew", "NDM", "NKW" from Thailand as well as the varieties "TA" and "Kent" from Brazil, "Keitt" from Mexico and "Eden" from Israel - resulted in an almost identical allergenic potential.

To study the potential connection between the allergenicity and the edible part resp. the peel, four different pulp fractions from three ripe mango cultivars were investigated. The results revealed a homologous distribution of the IgE-binding proteins with a similar allergenic activity. Additionally the fruits were examined during their ripening process for a period of eight days. Neither by immunoblotting nor by means of EAST-inhibition could any influence of the ripe stage on the allergenicity be observed. The characterisation of the protein and allergen patterns from mango extracts of meso- and pericarp revealed no significant differences. The isoelectric points of the allergens from the peel and pulp are located predominantly in the acid pH area.

Furthermore the two low molecular allergens with MW of 14 and 16 kDa were identified as profilines in both fruit sections (peel and pulp) using an antibody against recombinant pear profilin.

The mango allergens showed a very high stability against technological processing. No significant loss of the allergenicity could be determined in extracts of mangoes, which were heated in a drying furnace (up to 90 min at 105 °C), in an autoclave (up to 30 min at 121 °C), in a pressure cooker (up to 30 min), and in the microwave (up to 5 min at 900 W). In fluid and dried mango products produced at the University of Hohenheim (UH) a remaining allergenic potential could be verified independently of the process variables heating time, temperature, enzymatic treatment and mechanical cutting. In particular the two major allergens and the profilines showed a high thermal stability. Only for the product "Mangoleder" (a dried puree) was a slight decrease of the allergenicity detected by immunoblotting as well as by EAST-inhibition. These results were confirmed by investigation of commercial mango products (e.g. beverages, purees and dried slices).

The in-vitro digestion of fresh mangoes resulted in a reduction of all IgE-binding proteins with MWs over 50 kDa. After the incubation of mango pieces with chymotrypsine, trypsin, and pancreatine some new allergen fragments were obtained. For the major allergens Man i 1 and 2 a high resistance to proteolytic enzymes was observed.

34 of 38 available patients' sera revealed specific IgE against a protein of lychee with a MW of 55 kDa. Besides this potential major allergen further IgE-binding proteins with molecular weights of 14 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 42, and  $\geq 67$  kDa were characterized.

---

The investigation of seven different lychee varieties - "KC", "BD", "C", "HH" from Thailand, "Mauritius" and "Cope" from South Africa as well as an unknown cultivar from Madagascar - resulted in no observable relationship between variety and allergenicity. A similar spectrum of the IgE-binding proteins with comparable allergenic activity could be verified both in immunoblotting and in immunoblotting- and EAST-inhibition.

The detailed characterisation of the meso- and pericarp's allergens showed significant differences between the two fruit sections. The peel revealed IgE-binding proteins with MWs of 16 kDa, 18 kDa, 22 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 80 and 100 kDa. By means of immunoblotting- and EAST-inhibition different allergen patterns were found for aril and peel, whereas the pericarp showed a higher allergenic activity. The isoelectric points of the visualised allergens are located in the acid range, which equal to the results of the mango. In the peel mainly allergens with pI below 3.5 were found. Furthermore, by using the anti-pear-profilin-antibody in the aril of the lychee four potential low molecular profilins were identified. No profilins were found in the peel.

Additionally, a sequence homology of 89 % between the isolated 40 kDa allergen from the aril and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from white mustard could be determined.

Investigations of the cross reactivity between lychee fruit and tree and grass pollen as well as birch pollen associated foodstuffs were carried out using extracts from apple, carrot, potato, hazelnut, celery, mango and mugwort pollen. The 35 kDa allergen and the 14 kDa profilin showed a significant cross reactive potential. All fruit/vegetable/pollen extracts were able to inhibit the lychee allergens. Only hazelnut extracts showed an exclusive inhibition of the 35 kDa allergen. Because of their inhibition ability the lychee allergens showed a particular cross reactivity to mango, potato and celery as well as a weaker cross reactivity to hazelnut, carrot and mugwort pollen. In addition, lychee allergens showed no cross reactivity to the major apple allergen.

A high stability to thermal treatment was observed for lychee allergens similar to the results of the mango. The autoclaving process for 30 min at 121 °C led neither to a modification of both the protein and allergen pattern nor to a decrease of the allergenic potential compared to the native fruit. The canned lychee produced at the UH with pasteurisation times up to 20 min revealed a stability of IgE-binding proteins with MWs of 14 kDa, 40 kDa, 42 kDa, 55 and 94 kDa, which remained unchanged even after a storage time up to 12 months.

The EAST-inhibitions resulted in a slight decrease of the allergenic activity after 10 min pasteurisation time. In the sterilised variation only the 55 kDa allergen was detected. In commercial products as well as in canned lychees from Thailand an allergenic potential could be determined. Furthermore no influence of the freezing-melting-process on the allergenicity of the lychees could be proved. All examined frozen products showed an equal IgE-binding protein pattern and a similar allergenic activity compared to the native fruit. Also the lychee allergens were resistant to an enzymatic peeling technique.

---

Just after incubation with pepsin the proteolytic treatment of the lychee aril led to a hydrolysis of most allergens. Only two IgE-binding proteins with MWs of 14 and 55 kDa were resistant to the simulated gastric digestion. The incubation with enzymes of the intestinal tract led to a complete reduction of the allergen spectrum and a formation of low molecular protein fragments. While in the immunoblot no more bands were visible, a remaining allergic potential could be proven by EAST-Inhibition.

Both mango and lychee allergens showed a high stability to technological processing, in particular against thermal influences. In mango fruit a higher resistance of the allergens to in- vitro digestion than in lychee fruit could be observed. While in the lychee significant differences between the IgE-binding proteins of peel and aril could be obtained, in both sections of the mango a similar allergen pattern could be visualized. A variety dependence of the allergenicity could be detected neither in mango nor in lychee. Additionally the lychee shows a strong cross reactivity with grass pollen and birch pollen associated foodstuffs.